



FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Programa de doctorado en Inmunología
Bienio 2006-2008

IDENTIFICACIÓN Y EXPANSIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS.

**Memoria presentada por Sonia Pereira Méndez para optar al título de
doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.**

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Ramón Gimeno Martínez

TUTORA DE TESIS
Dra. Dolores Jaraquemada Pérez de
Guzmán

DOCTORANDA
Sonia Pereira Méndez

Sonia Pereira Méndez
Barcelona 2012

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Ramón Gimeno, director de esta tesis doctoral, la confianza depositada en mí desde el primer momento. En los inicios, por su ímpetu y perseverancia en conseguir una beca predoctoral; durante todos estos años, por ayudarme a llevar a cabo las diferentes líneas de investigación; y por apoyarme en la última etapa de doble vida. También quiero agradecerle la libertad brindada en el desarrollo del proyecto siempre contando con sus ideas y consejos, y por fomentar el “do it yourself”.

A Jordi Barquiner, responsable del laboratorio, por sus aportaciones científicas a esta tesis, por su ayuda constante, por fomentar el trabajo en equipo, y por su optimismo que, en muchas ocasiones, nos ha llevado a hacer apuestas de bocadillos.

A Francisco Vidal, por su ayuda en la parte molecular de la tesis. Por hacer que las cosas difíciles parezcan sencillas. Y por dar soporte informático a todo el laboratorio.

A Joan García, por ayudarme en los primeros pasos, y a los miembros del *Banc de Sang i Teixits*. Al personal del *Banc de Sang de Cordó*, Sergi Querol, Marta Torradella, Carmen Azqueta y Carlos Torrico, por proporcionarnos las unidades de sangre de cordón umbilical.

A Àlex e Irene, de la *Unitat Científico-Tècnica de Suport*, por su ayuda en citometría de flujo. A Marta Rosal y Àlex Rojo, veterinarios del estabulario, por su experiencia y ayuda con el modelo murino de trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos. Y al *Institut de Recerca de l'HUVH* por el apoyo recibido.

A Dolores Jaraquemada, tutora de mi tesis, por su ayuda instantánea.

Y como no, a mis compañeros de laboratorio y amigos. Rebeca, por que sólo tú puedes entender lo que nos ha costado. Melanie, por tu ayuda y las risas fuera del laboratorio. Herena, por enriquecernos de tu experiencia, y por modelo a seguir. Alba, por estar siempre dispuesta a ayudar y por las horas en el estabulario, sobretodo con mis ratones histéricos. Lorena, por la energía y la alegría que transmites. Irene, por ser mi guía del ocio y callejero particular, y por tu “buenos días” de los lunes por la mañana. Luís, por tus combinaciones extrañas de colores y tus canciones personalizadas. Sergio, Silvia y Maria José, por seguir en el camino.

Y por último a las personas más importantes en mi vida:

A mi familia y amigos, por que ellos tienen más ganas de acabar esta tesis que yo.

A mis padres, Antonio y Maruja, gracias por estar siempre a mi lado, por vuestro apoyo en todos los pasos de mi vida, y por que todo lo que soy os lo debo a vosotros. A mi hermano Jose, por su cariño y cuidado, y por acompañarme en la vida. Y por supuesto, a Suso, por dejarlo todo atrás para compartir su vida conmigo, por soportar mis ataques de nervios, y por darme ánimos y fuerzas para seguir adelante.

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	19
1. LA HEMATOPOYESIS	21
1.1. <i>Modelos de hematopoyesis</i>	21
1.1.1. <i>Modelo jerárquico</i>	22
1.1.2. <i>Modelo de determinación secuencial</i>	23
2. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (HSC)	24
2.1. <i>Características de las células madre hematopoyéticas</i>	24
2.1.1. <i>Automantenimiento</i>	24
2.1.2. <i>Multipotencialidad</i>	25
2.1.3. <i>Quiescencia</i>	25
2.2. <i>Identificación y caracterización de las células madre y los progenitores hematopoyéticos</i>	26
2.2.1. <i>Células madre y progenitores hematopoyéticos murinos</i>	26
2.2.2. <i>Células madre y progenitores hematopoyéticos humanos</i>	28
2.3. <i>Fuentes de progenitores hematopoyéticos</i>	32
2.3.1. <i>Médula ósea y sangre periférica movilizada</i>	32
2.3.2. <i>Sangre de cordón umbilical</i>	33
3. EL NICHOS HEMATOPOYÉTICO	33
3.1. <i>El nicho osteoblástico</i>	34
3.2. <i>El nicho vascular</i>	35
3.3. <i>Homeostasis hematopoyética</i>	36
3.3.1. <i>Supervivencia y apoptosis</i>	36
3.3.2. <i>Automantenimiento</i>	37
3.3.3. <i>Proliferación y quiescencia</i>	38
3.3.4. <i>Migración</i>	43
3.3.5. <i>Anidamiento de las HSCs</i>	43
4. REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS	44
4.1. <i>Reguladores intrínsecos</i>	45
4.1.1. <i>Regulación epigenética</i>	46
4.2. <i>Reguladores extrínsecos</i>	50
4.2.1. <i>Citoquinas y factores de crecimiento</i>	50
4.2.2. <i>Vías de señalización celular</i>	52
5. VÍA DE NOTCH	54
5.1. <i>Componentes de la vía de Notch</i>	55
5.2. <i>Vía de Notch en la hematopoyesis</i>	57
PRESENTACIÓN	63
OBJETIVOS	67

MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. OBTENCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS	73
1.1. <i>Separación de células mononucleares de sangre de cordón umbilical mediante centrifugación en gradiente de densidad.....</i>	<i>73</i>
1.2. <i>Separación inmunomagnética de células mononucleares CD34⁺ de sangre de cordón umbilical.....</i>	<i>74</i>
1.3. <i>Separación de células CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical por citometría de flujo</i>	<i>74</i>
1.4. <i>Separación de células Lin⁻CD34⁺ y Lin⁻CD34⁺CD150⁺ por citometría de flujo de sangre periférica movilizada.....</i>	<i>75</i>
2. LÍNEAS CELULARES ESTROMALES OP9	76
3. CARACTERIZACIÓN, EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	77
3.1. <i>Ensayos de formación de colonias en metilcelulosa.....</i>	<i>77</i>
3.2. <i>Ensayos de diferenciación celular.....</i>	<i>78</i>
3.3. <i>Cultivos de expansión de progenitores hematopoyéticos</i>	<i>80</i>
3.3.1. <i>Cultivos de expansión sin estroma.....</i>	<i>80</i>
3.3.2. <i>Co-cultivos de expansión de progenitores hematopoyéticos con células estromales.....</i>	<i>81</i>
4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	82
4.1. <i>Análisis fenotípico de progenitores hematopoyéticos de linaje (CMP, CLP, GMP Y MEP).....</i>	<i>82</i>
4.2. <i>Análisis fenotípico de poblaciones hematopoyéticas de células maduras (células mieloides, NK, B y T).....</i>	<i>83</i>
5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	85
5.1. <i>Extracción de ARN.....</i>	<i>85</i>
5.2. <i>Reacción de retrotranscripción y obtención del cADN.....</i>	<i>86</i>
5.3. <i>PCR de Hes1.....</i>	<i>87</i>
5.4. <i>Reacción de retrotranscripción y PCR (RT-PCR) de una célula utilizando el sistema AmpliGrid.....</i>	<i>88</i>
6. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS EN RATONES NOD-RAG1^{NULL}IL2RG^{NULL}	90
6.1. <i>Ratones.....</i>	<i>90</i>
6.2. <i>Acondicionamiento de los ratones.....</i>	<i>91</i>
6.3. <i>Trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos.....</i>	<i>92</i>
6.4. <i>Seguimiento del trasplante.....</i>	<i>92</i>
6.4.1. <i>Análisis del injerto mediante citometría de flujo.....</i>	<i>92</i>
6.4.2. <i>Análisis del injerto mediante PCR.....</i>	<i>95</i>

7. TRASPLANTE SECUNDARIO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS EN RATONES NOD-<i>RAG1^{NULL}IL2RG^{NULL}</i>	98
8. CITÓMETROS DE FLUJO	98
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	100
RESULTADOS	101
PARTE I. LA EXPRESIÓN DE CD150 EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS DEFINE UNA POBLACIÓN CON CAPACIDAD MULTIPOTENCIAL	103
1. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS CD150⁺CD135^{low} EN LA POBLACIÓN CD34⁺CD38⁻ AISLADAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	103
2. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS CD150⁺ EN LA POBLACIÓN LIN⁺CD34⁺ DE SANGRE PERIFÉRICA MOVILIZADA	105
3. LA EXPRESIÓN DE CD150 IDENTIFICA UNA SUBPOBLACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CON BAJA CAPACIDAD CLONOGÉNICA ..	106
4. LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ TIENEN CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN MIELOIDE Y LINFOIDE	107
5. LA SUBPOBLACIÓN CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ ESTÁ FORMADA POR CÉLULAS CON BAJA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN	111
6. EL CO-CULTIVO CON CÉLULAS ESTROMALES AUMENTA LA EFICIENCIA CLONOGÉNICA DE LA POBLACIÓN CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻	113
7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GAPDH, p21 Y TGFβ1 EN CD34⁺CD38⁻ Y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ POR RT-PCR MULTIPLEX	114
8. ANÁLISIS DE LA RECONSTITUCIÓN DE LAS POBLACIONES CD34⁺CD38⁻ Y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ EN RATONES NOD-<i>Rag1^{null}IL2rg^{null}</i>	116
8.1. Análisis del quimerismo celular en sangre periférica	117
8.2. Análisis del quimerismo celular en médula ósea	120
8.3. Trasplante secundario	123
8.4. Quimerismo molecular	125
PARTE II. EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS	127
1. EFECTO DEL ESTROMA Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE NOTCH	127
1.1. Análisis de los progenitores hematopoyéticos tras el cultivo	128
1.2. Análisis de progenitores hematopoyéticos de linaje tras el cultivo	132
2. EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO (VPA)	134
2.1. Análisis del efecto del VPA sobre progenitores hematopoyéticos tras el cultivo	134
2.2. Análisis del efecto del VPA sobre progenitores hematopoyéticos de linaje tras el cultivo	138
2.3. Análisis de la expresión de Hes1 en progenitores hematopoyéticos tras el cultivo con VPA y la activación de la vía de Notch	141
DISCUSIÓN	143

PARTE I. LA EXPRESIÓN DE CD150 EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS DEFINE UNA POBLACIÓN DE HSC CD34⁺CD38⁻ CON BAJA PROLIFERACIÓN	145
PARTE II. NOTCH Y VPA FAVORECEN LA EXPANSIÓN Y EL MANTENIMIENTO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS CD34⁺CD38⁻ <i>IN VITRO</i>	156
CONCLUSIONES.....	163
BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

5azaD: 5aza 2'deoxicitidina
5-FU: 5-fluorouracilo
7-AAD: 7-aminoactinomicina D
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
AGM: región aorta-gonadal-mesonefros
ALDH: aldehído deshidrogenasa
Ang-1: angiopoietina 1
APC: aloficocianina
ARN: ácido ribonucleico
BFU-E: unidad formadora de colonia eritroide
BrdU: bromodesoxiuridina
BSA: albúmina sérica bovina
cDC: células dendríticas comunes
CDK: quinasa dependiente de ciclina
CFU o CFC: unidades o células formadoras de colonias
CFU-GM: unidad formadora de colonia granulomonocítica
CLP: progenitor común linfoide
CMP: progenitor común mieloide
CNT: células nucleadas totales
CSF: factores estimulantes de colonias
CSL: CBF1/Su(H)/LAG1
CXCL: ligando de quimiocina
DC: célula dendrítica
Dkk1: Dickkopf1
DL-1: Delta-like1
DNMT: ADN metiltransferasa
DSL: dominio Delta, Serrate y Lag-2
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGF: *epidermal growth factor*
EP: progenitor eritroide
EPO: eritropoyetina
FCS: suero fetal bovino
FITC: fluoresceína isotiocianato
FLT3/FLK2: receptor tirosina kinasa de tipo III
Flt3L: ligando del receptor Flt3
FS: *forward scatter*
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G-CSF: *granulocyte-colony stimulating factor*
GFP: proteína verde fluorescente
GM-CSF: *granulocyte macrophage colony stimulating factor*
GMP: progenitor granulo-monocítico
GP: progenitor granulocítico
GSK3β: quinasa glucógeno sintasa 3β

HAT: histona acetiltransferasa
hCh17: cromosoma 17 humano
HDAC: histona deacetilasa
HDM: histonademetilasa
Hes: Hairy y Enhancer de Split
Hh: Hedgehog
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α
HLA: antígenos leucocitarios humanos
HMT: histona metiltransferasa
HPC: progenitor hematopoyético
HSC: células madre hematopoyética
IFN: interferón
IL: interleuquina
IMDM: medio de cultivo Dulbecco modificado de Iscove
Lin: marcadores de linaje
LSK: Lin⁻Sca1⁺cKit⁺
LT-HSC: célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a largo plazo
MacP: progrenitor monocítico
MAML: Mastermind
M-CSF: *macrophage colony stimulating factor*
MEM α : *Minumum Essential Medium Alpha*
MEP: progenitor megacariocítico-eritrocítico
MkP: progenitor megacariocítico
MLPs progenitores con potencial multilinfoide
MO: médula ósea
MPL: receptor de TPO
MPP: progenitor multipotencial
MSC: células madre mesenquimales
NaN₃: acida sódica
NICD: dominio intracelular de los receptores Notch
NK: células *Natural Killer*
NRG: NOD-*Rag1^{null}IL2rg^{null}*
OB: osteoblastos
OP9: línea celular estromal de ratón
OP9-DL1: línea celular estromal de ratón que expresa Delta-like 1
Opn: osteopontina
pb: pares de bases
PBA-azida: PBS 1x + BSA 1% (albúmina sérica bovina) + acida sódica (NaN₃) 0,1%
PBS: solución salina tamponada con fosfato
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PCR2: complejo represor Polycomb 2
pDC: células dendríticas plasmacitoides
PE: ficoeritrina
PE-Cy7: ficoeritrina-cianina 7
PRC1: complejo represor Polycomb 1
PS: presenelinas
Ptch: Patched

Abreviaturas

PTH: hormona paratiroidea
ROS: especies reactivas del oxígeno
RPMI: medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa inversa
SCF: *Stem Cell Factor*
SD: modelo de determinación secuencial
SDF-1: factor 1 derivado de células estromales
SLAM: *Signaling Lymphocytic Activation Molecule*
Smo: Smoothened
SP: sangre periférica
SP: *Side Population*
SPF: zona libre de patógenos específicos
SS: *side scatter*
ST-HSC: célula madre hematopoyética con capacidad de reconstitución a corto plazo
TGF β 1: factor β 1 de crecimiento tumoral
TNF α : factor α de necrosis tumoral
TPO: trombopoyetina
TSA: tricostatina A
VPA: ácido valproico

Nota: en la mayoría de abreviaturas se ha mantenido la nomenclatura en inglés por ser la de uso habitual.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LA HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es el proceso por el cual se generan todos los linajes celulares de la sangre. El sistema sanguíneo de los mamíferos está formado por más de diez tipos diferentes de células maduras que incluyen eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células mieloides (monocitos/macrófagos y granulocitos), mastocitos, células T, células B, células NK y células dendríticas.

Tiene lugar a través de un desarrollo jerárquico que se inicia a partir de las células madre hematopoyéticas (en adelante abreviado como HSC, de sus siglas de su descripción en inglés *Hematopoietic Stem Cell*), dando lugar progresivamente a progenitores más comprometidos hacia un determinado linaje hematopoyético, y finalizando en células sanguíneas totalmente diferenciadas.

En los mamíferos, las HSC residen en la médula ósea que es el principal órgano donde tiene lugar la hematopoyesis en el adulto y es el responsable de la generación de todos los diferentes tipos celulares hematopoyéticos. Sin embargo, durante el desarrollo embrionario y fetal, las HSCs se localizan en múltiples órganos y regiones. En estadios tempranos del desarrollo embrionario, los precursores hematopoyéticos se encuentran en el saco vitelino y en la región aorta-gonadal-mesonefros (AGM). En estadios posteriores del desarrollo embrionario, la hematopoyesis tiene lugar principalmente en el hígado fetal, donde las HSCs se expanden y diferencian para colonizar el timo y el bazo. Cerca del final de la gestación, la hematopoyesis del hígado y el bazo concluyen con la migración de las HSCs a la médula ósea, y es este tejido el que permanecerá como principal órgano hematopoyético durante toda la vida adulta del individuo .

Las células hematopoyéticas derivan de HSC pluripotentes. Estas células dan lugar a células hematopoyéticas maduras a través de varios estadios intermedios definidos por la expresión de antígenos de superficie.

1.1. Modelos de hematopoyesis

El análisis del desarrollo hematopoyético es la base para el conocimiento de la diversificación hacia los diferentes linajes. Existen diferentes modelos que intentan explicar como tiene lugar la hematopoyesis.

1.1.1. Modelo jerárquico

Durante muchos años, la hematopoyesis se ha explicado como una cascada de decisiones binarias. Los modelos convencionales como el modelo jerárquico, postulan que un número limitado de células madre hematopoyéticas es la base de la jerarquía hematopoyética, y que éstas tienen la capacidad de automantenerse y de diferenciarse a progenitores mieloides o linfoides. A medida que se diferencian, se restringe el potencial de diferenciación de las células madre mediante una sucesión de divisiones simétricas y asimétricas.

El primer paso en el desarrollo hematopoyético es la diferenciación de las HSCs hacia los progenitores multipotenciales (MPP), que no poseen capacidad de automantenimiento pero si conservan la capacidad de diferenciación a todos los linajes del sistema hematopoyético. Los MPPs generan progenitores oligopotentes: el progenitor común linfóide (CLP) y el progenitor común mieloide (CMP). Así, a partir del CLP se obtienen las células de linaje linfóide como las células NK, B, T y pDC (Kondo, Weissman et al. 1997). Este progenitor posee capacidad de diferenciación linfóide y no de decisiones de linaje mieloeritroide. Y a su vez, el CMP da lugar a células dendríticas (DC), al progenitor granulomonocítico (GMP) y megacariocítico-eritrocítico (MEP) (Akashi, Traver et al. 2000). A partir de los cuales se obtienen células de los linajes granulomonocítico (macrófagos y granulocitos) y eritromegacariocítico (eritrocitos y plaquetas), respectivamente.

La generación de células dendríticas puede tener lugar a partir del CMP o del CLP según si se trata de células dendríticas convencionales (cDC) o de células dendríticas plasmacitoides (pDC), respectivamente (figura 1).

En este modelo, los progenitores intermedios dan lugar a progenitores comprometidos específicos de linaje que se diferencian a células maduras. Cada progenitor monopotencial posee un patrón de expresión génica diferente, que es mantenido por una combinación determinada de factores de transcripción y componentes de remodelación de la cromatina. En general, se ha asumido que una vez una célula está comprometida a un linaje específico y adquiere un fenotipo maduro, ya no es posible cambiar su estado de diferenciación debido a que pierde la capacidad de automantenimiento y su plasticidad disminuye.

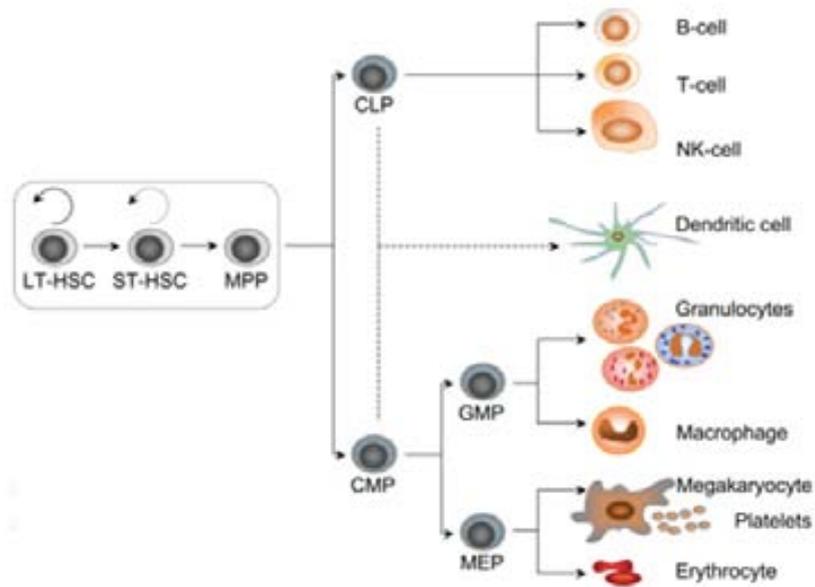


Figura 1. Modelo jerárquico del desarrollo hematopoyético (Soderberg, Karlsson et al. 2009).

1.1.2. Modelo de determinación secuencial

Existen estudios recientes en ratón que describen que progenitores linfoides podrían generar tanto células mieloides como linfoides (Bell and Bhandoola 2008; Wada, Masuda et al. 2008). Lo que sugiere la existencia de progenitores de linaje con diferentes potencialidades de diferenciación dependiendo del contexto en el que se encuentren.

A partir de estas evidencias, el modelo convencional requería ser revisado y se han propuesto nuevos modelos hematopoyéticos. En los últimos años, se ha propuesto el modelo de determinación secuencial (SD) basado en la idea de que existe una secuencia preferente de decisiones de linaje con un solapamiento de dos opciones en cada decisión (figura 2). En cada decisión, las células podrían comprometerse con una vía de diferenciación o avanzar hacia la siguiente opción. Las opciones de diferenciación megacariocítica y eritroide son las primeras que se pierden, y el orden de las decisiones posteriores no está claro (Brown, Hughes et al. 2007).

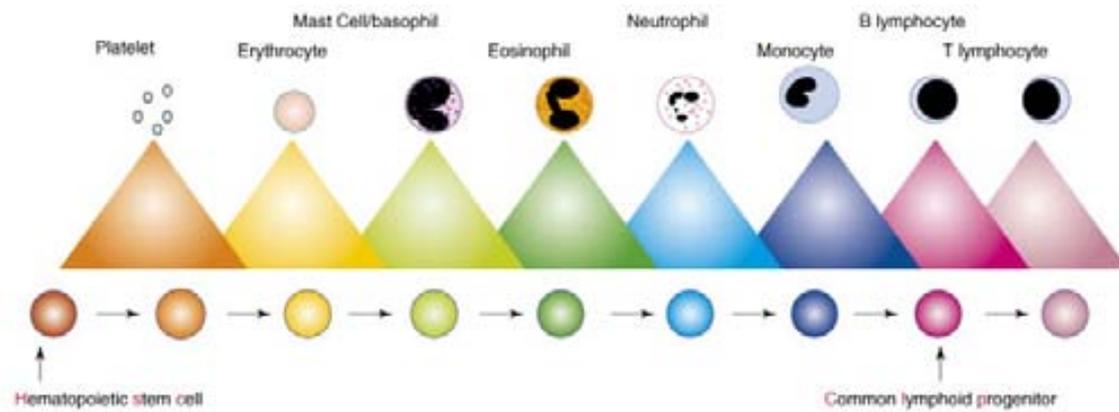


Figura 2. Modelo de determinación secuencial del desarrollo hematopoyético (Brown, Hughes et al. 2007).

Por otro lado, algunos investigadores postulan que las decisiones de linaje son procesos estocásticos. Así, concentraciones de varios factores de transcripción que regulan la especificidad de linaje, fluctúan continuamente dirigiendo la diferenciación celular (Graf 2002).

2. LAS CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS (HSC)

2.1. Características de las células madre hematopoyéticas

Las principales características que definen las células madre hematopoyéticas (HSC) son la capacidad de automantenimiento a lo largo de divisiones celulares de carácter asimétrico; su multipotencialidad, dando origen a todos los tipos celulares sanguíneos a través de divisiones asimétricas y, su estado de quiescencia.

En la división asimétrica, factores específicos del citoplasma se redistribuyen de forma desigual en las células hijas generadas. Así se forman dos células hijas diferentes, una que permanece en el nicho conservando las características de la célula madre y la otra que entra en procesos de diferenciación. Por el contrario, la división simétrica consiste en la obtención de dos células hija idénticas que permanecen en el nicho como células madre (Blank, Karlsson et al. 2008).

2.1.1. Automantenimiento

La capacidad de automantenimiento de las HSCs es la habilidad de generar células hijas idénticas sin diferenciarse, en los procesos de división celular. Las células madre hematopoyéticas pueden dividirse según su capacidad de automantenimiento y su capacidad de reconstitución en: células con capacidad de reconstitución a largo plazo (LT-HSC) y células con capacidad de reconstitución a corto plazo (ST-HSC). Las LT-

HSCs tienen una elevada capacidad de automantenimiento y son capaces de mantener la hematopoyesis de forma continua en el tiempo. En cambio, las ST-HSCs tienen el potencial de automantenimiento restringido y sólo son capaces de mantener la hematopoyesis *in vivo* durante un periodo limitado de tiempo.

2.1.2. Multipotencialidad

La multipotencialidad es la capacidad de las HSCs de diferenciarse y generar todos los tipos celulares funcionales de la sangre. En el desarrollo hematopoyético, la multipotencialidad se va restringiendo progresivamente a medida que los progenitores hematopoyéticos se van diferenciando y comprometiendo hacia los diferentes linajes hematopoyéticos. Las HSCs inicialmente dan lugar a los progenitores multipotenciales (MPPs) que mantienen el potencial de diferenciación a todos los linajes hematopoyéticos. Los MPPs avanzan en la diferenciación hacia los progenitores oligopotentes (CLP y CMP) que pueden generar varios pero no todos los linajes celulares de la sangre. Los progenitores oligopotentes se diferencian a células comprometidas a un linaje específico del sistema hematopoyético. Como por ejemplo, los CMPs dan lugar a los MEPs y a los GMPs.

2.1.3. Quiescencia

Las HSCs también pueden clasificarse según el estado del ciclo celular en el que se encuentren en: células quiescentes o latentes, y células activadas. Las células madre hematopoyéticas pueden permanecer quiescentes, o entrar en ciclo para automantenerse o diferenciarse. En situaciones de homeostasis hematopoyética, las HSCs se dividen infrecuentemente. En cambio, en situaciones de estrés, las HSCs salen de su estado quiescente, se expanden y diferencian rápidamente hasta recuperar la homeostasis hematopoyética. Cuando en situaciones de estrés, el reestablecimiento del estado de quiescencia celular de las HSCs falla, éstas no pueden mantenerse en fase G_0 del ciclo celular. Esto conlleva a la extinción del reservorio de HSCs, pérdida de la capacidad de automantenimiento y de reconstitución, causando finalmente un fallo hematológico. Por ejemplo, se ha observado que en modelos murinos deficientes en p21, la proporción de progenitores hematopoyéticos en fase G_0 disminuía, perdiendo la capacidad de reconstitución de la médula ósea tras el tratamiento con 5-FU (Cheng, Rodrigues et al. 2000; van Os, Kamminga et al. 2007). La quiescencia de las HSCs no sólo es crítica en la protección y el mantenimiento del reservorio de HSCs, sino que también es crítica en la protección de las HSCs frente a la acumulación de mutaciones asociadas a la

replicación del ADN celular, confiere resistencia frente a agentes tóxicos externos, etc (Orford and Scadden 2008).

Anteriormente se pensaba que el reservorio de células madre se autorenovaba cada pocas semanas. Recientemente, este paradigma ha cambiado. Wilson y colaboradores (Wilson, Laurenti et al. 2008) identificaron dos poblaciones funcionalmente diferentes, las HSC en estado latente y las HSC activas. Mediante modelaje computacional sugirieron que las células latentes se dividían cada 145 días, o aproximadamente 5 veces durante toda la vida de un ratón. De forma similar, Foudi y colaboradores (Foudi, Hochedlinger et al. 2009) mediante el análisis de retención de la histona 2B-GFP en varias células madre y progenitores, encontraron una población de células que ciclaban muy lentamente. Estas células representan del 5-20% del total de HSCs.

2.2. Identificación y caracterización de las células madre y los progenitores hematopoyéticos

2.2.1. Células madre y progenitores hematopoyéticos murinos

La primera aproximación a la purificación de HSCs de médula ósea murinas se realizó mediante la utilización de técnicas de separación celular por citometría de flujo multicolor. En ratón, las primeras HSCs aisladas tenían el fenotipo de marcadores de superficie Thy-1^{low} Lin⁻ Sca-1⁺, y representaban un 0.5% del total de células de la médula ósea de un individuo adulto (Spangrude, Heimfeld et al. 1988).

Tanto Sca-1 como c-kit (Ikuta and Weissman 1992) fueron identificados como marcadores de HSCs. Las células madre hematopoyéticas murinas con capacidad de reconstitución a largo plazo se definen por la falta de expresión de marcadores de linaje, y la expresión de las moléculas c-kit (CD117) y Sca-1 (un miembro de la familia CD59/Ly6). Así, este subtipo celular de la médula ósea enriquecido en HSCs se conoce como LSK (Lin⁻Sca1⁺cKit⁺). La población LSK es una población heterogénea formada por células con capacidad de reconstitución a corto (ST-HSC) y largo plazo (LT-HSC).

Las HSCs de médula ósea de ratones adultos, se encontraban en la fracción CD34⁻ (Osawa, Hanada et al. 1996). En ratón, el receptor tirosina kinasa de tipo III (FLT3/FLK2) ha sido identificado como uno de los marcadores útiles en la discriminación de las células madre hematopoyéticas. Diversos autores han observado que la combinación de los marcadores LSK (CD34⁻) Flt3⁻ define la población de LT-

HSC en ratón, y que la expresión de FLT3 va asociada a una pérdida en la capacidad de automantenimiento de las HSCs (Adolfsson, Borge et al. 2001; Christensen and Weissman 2001; Yang, Bryder et al. 2005).

A partir de estos estudios iniciales, las HSCs murinas se han ido redefiniendo debido a la incorporación y la ampliación de marcadores de superficie. Sólo algunas LSK tienen capacidad de reconstitución a largo plazo, por lo que el grupo de Weissman propuso que la población LT-HSC podía corresponderse con células LSK CD34⁻Fli2⁻Thy^{low}, las ST-HSCs como células LSK CD34⁺Fli2⁻Thy^{low} con capacidad de automantenimiento limitada, y los MPPs como células LSK CD34⁺Fli2⁻Thy⁻ con pérdida completa de la capacidad de automantenimiento pero que mantienen la multipotencialidad (Seita and Weissman 2010).

Recientemente, se ha demostrado que los miembros de la familia SLAM se expresan de forma diferencial entre las diferentes subpoblaciones de células madre y progenitores hematopoyéticos murinos. En ratón, según el código SLAM, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea se caracterizan por los marcadores CD150⁺CD244⁻CD48⁻, los progenitores multipotenciales (MPPs) por CD150⁻CD244⁺CD48⁻, y los progenitores oligopotenciales por CD150⁻CD244⁺CD48⁺ (Kiel, Yilmaz et al. 2005). En el hígado fetal, se ha demostrado que los receptores de la familia SLAM CD150, CD244 y CD48; también se expresan de forma diferencial entre los progenitores hematopoyéticos fetales, y de forma similar a los patrones de expresión descritos previamente, en las HSCs de la médula ósea de ratones adultos (Kim, He et al. 2006). La expresión de la molécula CD150 está regulada durante el desarrollo de las HSC embrionarias. No se ha detectado su expresión a día 9 embrionario (E9) en el saco vitelino, ni a E11.5 en la región AGM, ni a E12.5 en HSCs de la placenta; pero sí a E14.5 en HSCs de hígado fetal y de médula ósea (McKinney-Freeman, Naveiras et al. 2009). Por otro lado Morita y colaboradores han descrito que dentro de la población LSK CD34⁻ existen diferentes niveles de expresión de CD150, estableciendo una jerarquía de HSCs en la cual la población LSK CD150^{high}CD34⁻ está altamente enriquecida en LT-HSCs y posee una elevada capacidad de automantenimiento respecto a las poblaciones LSK CD150^{med}CD34⁻ y LSK CD150^{low}CD34⁻ (Morita, Ema et al. 2010).

En los últimos años, el inmunofenotipado de células madre hematopoyéticas de ratón ha ido mejorando hasta niveles en los que es posible aislar células madre hematopoyéticas funcionales, con una pureza de una cada 1.3 células (Kiel, Yilmaz et al. 2005; Yilmaz, Kiel et al. 2006).

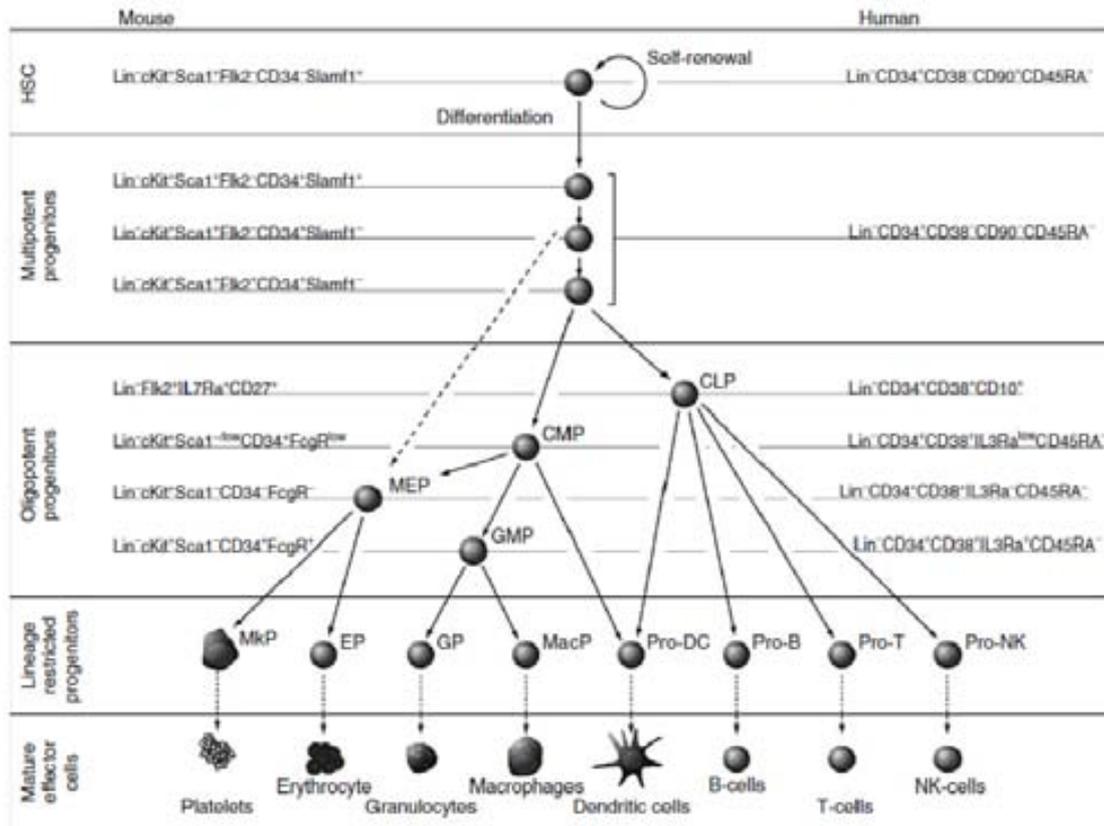


Figura 3. Modelo jerárquico del desarrollo hematopoyético. En el esquema se muestran definidas mediante marcadores de superficie, las diferentes poblaciones de células madre y progenitores hematopoyéticos en humano y en ratón. CLP, progenitor común linfocítico; CMP, progenitor común mieloide; DC, células dendríticas; EP, progenitor eritroide; GMP, progenitor granulo-monocítico; GP, progenitor granulocítico; HSC, célula madre hematopoyética; MacP, progenitor monocítico; MEP, progenitor eritro-megacariocítico; Mkp, progenitor megacariocítico; NK, células *Natural Killer*; Lin, marcadores de linaje (Seita and Weissman 2010).

2.2.2. Células madre y progenitores hematopoyéticos humanos

Las HSCs humanas han sido aisladas siguiendo los mismos procedimientos aplicados en el aislamiento de HSCs murinas utilizando marcadores de superficie y mediante ensayos funcionales. La capacidad de reconstitución a largo plazo de las HSCs humanas se evalúa mediante modelos de xenotrasplante utilizando ratones inmunodeficientes.

Las células madre y los progenitores hematopoyéticos no expresan un conjunto de marcadores asociados con la maduración final de tipos celulares sanguíneos específicos. La no expresión de estos marcadores de linaje (Lin) puede ser utilizada para diferenciar las células inmaduras de las células más diferenciadas. La selección de células Lin⁻ puede llegar a enriquecer la población en progenitores hematopoyéticos de 20-500 veces, dependiendo de la combinación de marcadores utilizada (Wognum,

Eaves et al. 2003). Un ejemplo de combinación de marcadores de linaje utilizados es glicoforina A, CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD56 y CD66b.

El marcador más ampliamente utilizado en el aislamiento de progenitores hematopoyéticos humanos es CD34 (ligando de la L-selectina). Las células CD34⁺ tienen la capacidad de reconstituir la hematopoyesis humana pero es una población muy heterogénea. Estas células representan entre un 0.5 y un 5% de las células sanguíneas del hígado fetal, la sangre de cordón y la médula ósea de individuos adultos (DiGiusto, Chen et al. 1994; Krause, Fackler et al. 1996). Los ensayos *in vitro* revelaron que la población de células CD34⁺ era muy heterogénea. Por lo que se inició la búsqueda de nuevos marcadores de superficie que permitieran mejorar la identificación de poblaciones enriquecidas en HSCs. Algunas de las moléculas identificadas fueron HLA-DR (Srouf, Brandt et al. 1991), CD45RA (Mayani, Dragowska et al. 1993), CD90 (Baum, Weissman et al. 1992; Craig, Kay et al. 1993) y CD38 (Hao, Shah et al. 1995; Bhatia, Wang et al. 1997), en las diferentes fuentes de progenitores hematopoyéticos, la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y la sangre periférica movilizada.

Posteriormente, tras el desarrollo de modelos murinos humanizados capaces de generar células hematopoyéticas humanas maduras tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos, se han identificado marcadores capaces de enriquecer poblaciones de HSCs. Mediante estos experimentos, células CD34⁺Thy1(CD90)⁺Lin⁻ aisladas de médula ósea, sangre de cordón umbilical, hígado fetal y sangre periférica movilizada, fueron capaces de reconstituir a largo plazo modelos murinos de trasplante de progenitores (McCune, Namikawa et al. 1988; Baum, Weissman et al. 1992).

Se consiguió enriquecer la población CD34⁺ de HSCs humanas según la expresión del marcador de superficie CD38. La mayoría de las células CD34⁺ (90-98%) co-expresan el marcador CD38, sin embargo la población CD34⁺CD38⁻ está muy enriquecida en células con capacidad de reconstitución de los modelos murinos NOD/SCID (Bhatia, Wang et al. 1997). En cambio, las células CD34⁺CD38⁺ dan lugar a una reconstitución temprana y transitoria cuando son trasplantadas en ratones inmunodeficientes (Hogan, Shpall et al. 2002). Otra población identificada con capacidad de reconstitución de modelos murinos es la definida como Lin⁻CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica movilizada.

CD133 también ha sido propuesto como un marcador eficiente en el aislamiento de HSCs tanto en médula ósea, hígado fetal, sangre de cordón umbilical y sangre periférica movilizada (Yin, Miraglia et al. 1997). Está expresado en la mayoría de las

células CD34⁺ (Gallacher, Murdoch et al. 2000), e incluye células con capacidad de reconstitución, progenitores inmaduros, progenitores de granulocitos y monocitos.

En 2007, Majeti y colaboradores (Majeti, Park et al. 2007) identificaron una población enriquecida en HSCs humanas con fenotipo Lin⁻CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻, donde una de cada diez células poseía capacidad de reconstitución del sistema hematopoyético en modelos murinos. El uso de estos marcadores también permitió establecer la población de MPP en sangre de cordón umbilical como Lin⁻CD38⁻CD90⁻CD45RA⁻, con capacidad multipotencial pero con una incompleta capacidad de automantenimiento, estableciendo una jerarquía de células madre y progenitores hematopoyéticos utilizando los marcadores CD45RA y CD90.

Recientemente, se ha demostrado que la población CD90⁻ sólo contiene una pequeña fracción de células con capacidad de reconstitución y que la mayoría de células presentan una actividad similar a la de los MPPs. Estos autores han propuesto la molécula de adhesión CD49f como un marcador específico de HSCs, demostrando que la pérdida de expresión de CD49f identificaba un conjunto de MPPs con capacidad de reconstitución transitoria (Notta, Doulatov et al. 2011).

Los progenitores hematopoyéticos humanos CMP, GMP y MEP han sido caracterizados en la fracción CD34⁺CD38⁺ de médula ósea y sangre de cordón umbilical, según la expresión de los marcadores CD45RA y IL3R α . Igual que en el ratón, CMP (CD45RA⁻ IL3R α ^{lo}) da lugar a GMP (CD45RA⁺ IL3R α ^{lo}) y MEP (CD45RA⁻ IL3R α ^{lo}) (Manz, Miyamoto et al. 2002). En humanos también se describió un progenitor en médula ósea con potencial de diferenciación linfoide caracterizado por los marcadores CD34⁺CD38⁺Lin⁻CD10⁺CD45RA⁺ que podía generar células T, B, NK y células dendríticas (Galy, Travis et al. 1995). En sangre de cordón umbilical, la población de células CD34⁺CD38⁻CD7⁺ también daba lugar a células B, NK y células dendríticas (Hoebeke, De Smedt et al. 2007). Sin embargo, esta población no existe en médula ósea. Se ha mostrado que la población CD34⁺CD38⁺Lin⁻CD10⁺CD45RA⁺ descrita por Galy y colaboradores se encuentra incluida dentro del subtipo CD34⁺CD38⁺LIN⁻IL7R α ⁺ de médula ósea, incluyendo tanto células CD10⁺ como CD10⁻ (Weissman and Shizuru 2008). Estos estudios sugieren la existencia de progenitores con potencial multilinfoide (MLPs), definidos como un progenitor capaz de generar células B, T y NK. Recientemente, análisis clonales realizados bajo múltiples condiciones de diferenciación, han sido realizados para el estudio de MLPs en siete tipos de progenitores diferentes de muestras de sangre de cordón umbilical y médula ósea. Este estudio concluyó que los MLPs son una población CD34⁺CD38⁻CD90⁻IL3R α ^{lo}CD45RA⁺ que da lugar a todos los tipos celulares linfoides, así como a monocitos,

macrófagos y células dendríticas. Estos resultados sugieren un origen común de un progenitor con potencial mieloide y linfoide en la hematopoyesis temprana de humanos. Además, estos autores han demostrado que la población $CD34^+CD38^-CD90^{low}CD45RA^+$ se corresponde con MPLs independientemente de la expresión de CD7 y con una generación de células maduras igual tanto en MPL- $CD7^+$ como en MPL- $CD7^-$ (Doulatov, Notta et al. 2010).

En humanos, se ha estudiado el efecto de la expresión de Flt3 (CD135) en la caracterización fenotípica de las HSCs en diferentes fuentes de progenitores hematopoyéticos. Aurrán-Schleinitz y colaboradores encontraron que Flt3 se expresaba a niveles bajos en células $CD34^+$ de sangre periférica movilizada y que incluso, en algunos casos no se detectó expresión. Además, observaron que la expresión de Flt3 y CD38 aumentaba de forma paralela en estas células (Aurrán-Schleinitz, Imbert et al. 1999). Rappold y colaboradores estudiaron la expresión de Flt3 en progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ de sangre de cordón umbilical y médula ósea, y observaron que la población $CD34^+CD38^{low/-}$ expresaba niveles muy bajos de Flt3 en ambas fuentes de progenitores hematopoyéticos. Por lo que la expresión de Flt3 estaba restringida a la población doble positiva para los marcadores CD34 y CD38 (Rappold, Ziegler et al. 1997). Otro estudio observó que progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ de médula ósea que expresaban niveles bajos de Flt3, se encontraban en fase G0. Este estado es característico de los progenitores hematopoyéticos más inmaduros. Mientras que las células $CD34^+Flt3^+$ se encontraban en un estado activado del ciclo celular (Gotze, Ramirez et al. 1998). Por el contrario, Xiao y colaboradores encontraron que más del 90% de las células $CD34^+CD38^-$ expresaban el antígeno de superficie Flt3. Y que tanto el porcentaje de células $CD34^+$ que expresaban Flt3 como la intensidad del marcaje de Flt3, disminuían a la vez que la expresión de CD38 aumentaba (Xiao, Oppenlander et al. 1999).

En los estudios realizados en poblaciones de progenitores hematopoyéticos existen controversias tanto a nivel fenotípico como funcional del papel de CD135 en el desarrollo hematopoyético.

Recientemente, diferentes autores han observado en humano, expresión de CD150 en poblaciones de células madre y progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical y de sangre periférica movilizada (Boussaad, Varagnolo et al. 2011; Larochelle, Savona et al. 2011). Sin embargo, en otro estudio que analiza la expresión de moléculas de la familia de receptores SLAM en diferentes fuentes de células madre y progenitores hematopoyéticos humanos, no se observa una expresión significativa de CD150 en células $Lin^-CD34^+CD38^-$ de sangre de cordón umbilical (Sintes, Romero et al. 2008).

Tanto en humano como en ratón, las diferencias en el marcaje con colorantes vitales como Rhodamina-123 o Hoechst 33342, han sido utilizadas para enriquecer la población de HSCs con capacidad de reconstitución a largo plazo (Spangrude, Heimfeld et al. 1988; Trevisan and Iscove 1995; McKenzie, Takenaka et al. 2007). El flujo de exclusión de la Rhodamina-123 es un criterio funcional que refleja el estado metabólico de la célula ya que es un colorante que se une a las mitocondrias que están activas (Kim, Cooper et al. 1998). Las células con la habilidad de excluir Hoechst 33342, visualizadas usando dos longitudes de onda de emisión diferentes, definen la población *Side Population* (SP) (Goodell, Brose et al. 1996).

Otra estrategia utilizada para identificar las células madre hematopoyéticas humanas ha sido el análisis de enzimas intracelulares como la aldehído deshidrogenasa (ALDH), positiva en progenitores hematopoyéticos y útil en la detección de células con capacidad de reconstitución a largo plazo (Storms, Green et al. 2005).

2.3. Fuentes de progenitores hematopoyéticos

2.3.1. Médula ósea y sangre periférica movilizada

Las células madre hematopoyéticas se localizan en la médula ósea en individuos adultos. Por lo que inicialmente la médula ósea fue la principal fuente de progenitores hematopoyéticos. La médula ósea se extrae mediante la punción de la cresta ilíaca posterior y previa anestesia general del donante. La dosis de células CD34⁺ recogidas se encuentra entre 2 y 3 x 10⁶ células/kg (Couban, Simpson et al. 2002; Schmitz, Beksac et al. 2002).

Las HSCs de sangre periférica se obtienen mediante aféresis. Normalmente, cuatro días antes de la recogida se inicia la movilización con G-CSF de las HSCs de la médula ósea a la sangre periférica. La recolección de las células se realiza mediante punción venosa y la sangre es procesada en un equipo de aféresis. La sangre se centrifuga de forma continua y la fase celular que contiene las HSCs se selecciona y retira. El resto de células y plasma se retorna al donante. La dosis de células CD34⁺ recogidas es mayor que la que se obtiene directamente de la médula ósea, y normalmente se encuentra entre 5 y 10 x 10⁶ células/kg (Blaise, Kuentz et al. 2000; Bensinger, Martin et al. 2001). Mientras que dosis más altas de CD34⁺ hacen que el injerto sea más rápido, el aumento de la dosis de células T puede llevar a un aumento de la posibilidad de aparición de la enfermedad de injerto contra el huésped.

Los donantes se recuperan antes, después de la obtención de células de sangre periférica que de médula ósea. Los trasplantes de células de sangre periférica injertan más rápido lo que se traduce en una mejora en la supervivencia particularmente en pacientes en un estado avanzado de la enfermedad.

La elección del tipo de fuente de HSCs a utilizar depende del donante, del estado de la enfermedad del paciente, del riesgo de enfermedad de injerto contra el huésped y del riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante.

2.3.2. Sangre de cordón umbilical

La sangre de cordón umbilical se obtiene mediante la canulación de la vena umbilical antes o después de la liberación de la placenta durante el parto. Comparado con la obtención de células de sangre periférica movilizada o de médula ósea, no existe ningún riesgo para el donante.

Las ventajas del uso de sangre de cordón umbilical como fuente de HSCs son la facilidad de la obtención de las células, su disponibilidad debido a que permite una mayor disparidad en la compatibilidad de HLA, y el reducido riesgo de aparición de enfermedad de injerto contra el huésped. La principal desventaja es la baja dosis celular obtenida que puede llevar a retrasar el injerto y aumentar la mortalidad relacionada con el trasplante. En los últimos años, la infusión de más de una unidad de cordón umbilical y la expansión de progenitores de sangre de cordón umbilical han sido las aproximaciones más prometedoras para aumentar la dosis de progenitores trasplantados y mejorar la eficiencia del injerto (Tung, Parmar et al. 2010).

3. EL NICHO HEMATOPOYÉTICO

Las células madre hematopoyéticas se localizan en zonas concretas de la médula ósea llamadas nichos. Los nichos más representativos, candidatos a albergar las HSCs, son el endostio del hueso esponjoso donde se localizan osteoblastos especializados, y los sinusoides localizados de forma distante al endostio.

Una de las funciones más importantes del nicho es regular el balance entre el automantenimiento y la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Esto se consigue mediante el equilibrio entre divisiones simétricas y asimétricas de las células madre hematopoyéticas. En adultos, en condiciones homeostáticas, el número de HSC permanece constante ya que cuando proliferan lo hacen tanto para mantenerse como para generar células diferenciadas. Existe una forma alternativa de generar dos células asimétricas, exponiendo las células madre hijas a diferentes señales

procedentes de diferentes localizaciones del microambiente medular. Así, la célula madre se dividiría de forma simétrica generando dos células madre idénticas. Una de las dos células permanecería en el microambiente del nicho conservando sus características de célula madre, y la otra recibiría señales de otro microambiente que no preservaría su fenotipo de célula madre y enviaría señales de iniciación de los procesos de diferenciación. De este modo, se obtendrían dos células hija diferentes generadas después de la división y no durante la división celular tal y como ocurre en la división asimétrica.

La sinapsis entre las células madre hematopoyéticas y el nicho tiene lugar a través de un gran número de moléculas de adhesión y señalización celular.

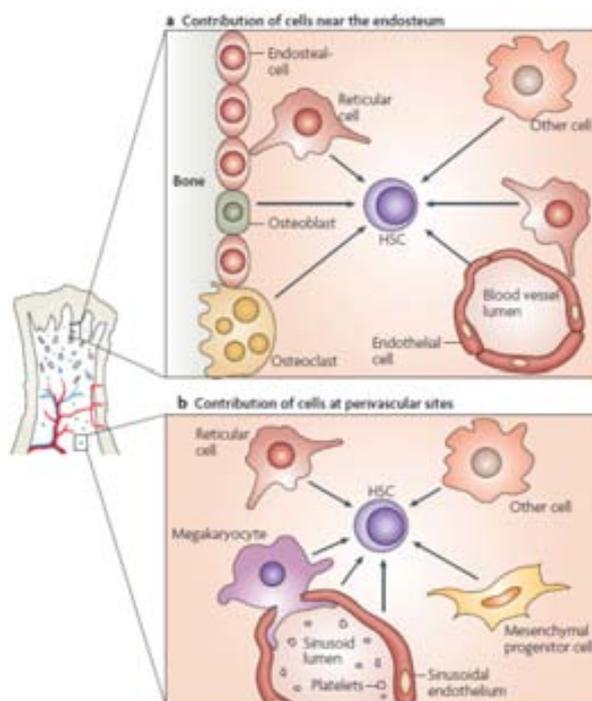


Figura 4. Tipos celulares que constituyen el nicho osteoblástico y el vascular. A) Células presentes en la región del endostio, incluyendo células relacionadas en la formación de hueso, células vasculares y perivascular. B) En adultos, las HSC también han sido localizadas en los sinusoides, donde las células endoteliales secretan factores que participan en la regulación de las HSC (Kiel and Morrison 2008).

3.1. El nicho osteoblástico

Los primeros estudios indicaban que las células hematopoyéticas indiferenciadas se localizan en el endostio cerca de la superficie ósea, y que estas células son movilizadas hacia la zona central de la médula ósea (Gong 1978; Nilsson, Johnston et al. 2001). Aunque más adelante fue cuando se demostró que existen factores secretados por células del endostio, que participan en la regulación de las HSC. En 2003, se realizaron dos estudios en los que se observó que en ratones modificados genéticamente, el aumento de los osteoblastos y del endostio trabecular hacía aumentar el número de HSC en la médula ósea (Calvi, Adams et al. 2003). Además,

Zhang y colaboradores observaron que las HSC con capacidad de retener BrdU a largo plazo, es decir, las HSCs más quiescentes, se localizaban en la superficie del endostio trabecular mediante adhesiones de tipo N-cadherina (Zhang, Niu et al. 2003). Estos estudios sugieren que la localización específica de las HSC cerca del endostio favorece la hipótesis de que esta región de la médula ósea podría ser un nicho específico de progenitores hematopoyéticos.

El concepto de nicho osteoblástico del endostio también está respaldado por el hecho de que los osteoblastos producen factores que tienen la capacidad de regular la quiescencia y el mantenimiento de las HSCs como la angiopoietina-1 (Arai, Hirao et al. 2004), la osteopontina (Nilsson, Johnston et al. 2005), o la CXCL-12 (Petit, Szyper-Kravitz et al. 2002). Por el contrario, se ha visto que los osteoclastos que presentan activado el receptor del ligando NF-kappa B, disminuyen la expresión de SCF, CXCL-12 y osteopontina en el endostio, causando la salida del nicho de las HSC (Kollet, Dar et al. 2006). Esto sugiere que el balance del endostio osteoblástico está relacionado con la producción de factores implicados en las funciones de regulación de las HSC del nicho.

Las células que forman el nicho osteoblástico son células que participan en la formación de hueso como los osteoblastos o los osteoclastos, y células vasculares.

3.2. El nicho vascular

Se ha observado que las HSC también residen a una cierta distancia del endostio por lo que el nicho vascular de la médula ósea es otra alternativa de nicho de las HSC. El análisis histoquímico de secciones de la médula ósea utilizando marcadores de la familia SLAM muestra que un 60% de las HSC de la familia SLAM estaban localizadas en los alrededores de las células endoteliales sinusoidales (Kiel, Yilmaz et al. 2005; Kiel, Radice et al. 2007). Esto sugiere la existencia de un nicho adicional en la zona vascular.

El nicho vascular está formado por una compleja combinación de tipos celulares diferentes. Uno de los tipos celulares que lo constituyen son las células reticulares localizadas cerca de los sinusoides, que derivan de células madre mesenquimales, y funcionan como bloques activos en la formación del nicho vascular (Sacchetti, Funari et al. 2007; Chan, Chen et al. 2009). Además se ha observado que estas células expresan elevados niveles de CXCL-12 y que interaccionan con casi el 90% de las HSC (Sugiyama, Kohara et al. 2006).

Otro tipo celular son las células endoteliales con capacidad de mantenimiento de las HSC y funciones de regeneración hematopoyética (Salter, Meadows et al. 2009). Las

células endoteliales sinusoidales de la médula ósea expresan citoquinas como CXCL-12, y moléculas de adhesión celular como E-selectina y VCAM-1, que son importantes para la movilización, injerto y alojamiento de las HSCs en la médula ósea (Butler, Nolan et al. 2010; Oh and Kwon 2010).

3.3. Homeostasis hematopoyética

La médula ósea es un ambiente complejo, que incluye una amplia variedad de tipos celulares hematopoyéticos y no hematopoyéticos, donde se producen diferentes tipos de moléculas que actuarán de forma local o sistémica. Este conjunto, permite una regulación estricta de la producción celular sanguínea y permite responder de forma rápida a altos requerimientos celulares en situaciones de estrés para mantener la homeostasis. Frecuentemente, en la regulación externa de la hematopoyesis intervienen mecanismos de comunicación intercelular mediante factores de crecimiento. La activación de la señalización mediante factores de crecimiento es interpretada por otras moléculas de señalización intracelular, que dependiendo del repertorio de factores de transcripción y el estado de la cromatina de la célula diana, determinarán el estado de expresión génica. En la regulación de la hematopoyesis participan una combinación de señales intrínsecas y extrínsecas. Una amplia variedad de factores críticos para la regulación han sido identificados, incluyendo: citoquinas, factores de crecimiento, moduladores de la conformación de la cromatina y reguladores del ciclo celular; que participan en la supervivencia, proliferación, automantenimiento y diferenciación celular.

3.3.1. Supervivencia y apoptosis

El principal control del mantenimiento de las características que definen las HSCs tiene lugar a nivel de la proliferación a través de las interacciones entre las HSCs y el nicho. Sin embargo, el control de la apoptosis también juega un papel importante.

La apoptosis o la muerte celular programada es un proceso necesario durante el desarrollo o el mantenimiento normal de los tejidos. Existen señales específicas que pueden inducir apoptosis como células que no reciben las señales adecuadas para evitar las señales de apoptosis o la exposición a agentes infecciosos. Para expandir las HSCs no sólo se tiene que estimular la proliferación sino que también prevenir la diferenciación y la apoptosis.

Existen estudios que demuestran que las HSCs son susceptibles a la apoptosis. La sobreexpresión de *bcl-2* hacía disminuir la muerte de las HSCs en respuesta a

diferentes señales de inducción de apoptosis como la irradiación (Domen, Gandy et al. 1998), la exposición a agentes quimioterápicos (Domen and Weissman 2003) y la privación de factores de crecimiento (Domen, Cheshier et al. 2000). La delección inducible de *mcl-1* resultó en la pérdida de las células hematopoyéticas más primitivas (Opferman, Iwasaki et al. 2005). La sobreexpresión de *bcl-2* en combinación con la señalización de SCF era suficiente para prevenir de la apoptosis y permitir la proliferación de las HSCs en medios libres de suero (Domen and Weissman 2000). Esto no alteró el automantenimiento de las células, indicando que el control de la supervivencia, proliferación, automantenimiento y diferenciación son procesos diferentes. Sin embargo, otros factores pueden afectar a múltiples procesos. La trombopoyetina puede promover la supervivencia (Matsunaga, Kato et al. 1998) pero también la proliferación de las HSCs y la diferenciación de los progenitores multipotenciales (Sitnicka, Lin et al. 1996).

3.3.2. Automantenimiento

La capacidad de automantenimiento de las HSCs requiere el control de las señales de supervivencia y proliferación junto con el mantenimiento de un estado indiferenciado. Uno de los mecanismos que explican el mantenimiento constante del reservorio de HSCs durante el tiempo, es la división asimétrica. De este modo, los números de HSCs se mantienen constantes y la división asimétrica constituye un mecanismo homeostático de control del automantenimiento de las HSCs modulado por señales externas. La polarización de varias moléculas ha sido descrita en progenitores hematopoyéticos en mitosis (Beckmann, Scheitza et al. 2007). La localización de Numb, modulador negativo de la señalización de Notch, en progenitores hematopoyéticos estaba más enriquecida en una célula hija que en la otra. Esto sugiere que Numb puede ser segregado de forma diferente en progenitores en división y puede inhibir las señales de Notch induciendo la diferenciación (Wu, Kwon et al. 2007; Cheng, Huber et al. 2008).

Los programas genéticos que regulan los procesos de división asimétrica y el automantenimiento de las HSCs no están establecidos. Se ha observado que Bmi-1, proteína del grupo Polycomb, es absolutamente necesaria para el mantenimiento de HSCs adultas (Iwama, Oguro et al. 2004). Datos recientes sugieren que la expresión de Notch podría estar correlacionada con la capacidad de división simétrica y asimétrica (Wu, Kwon et al. 2007). Se ha propuesto que en adultos, la vía de señalización de Notch afectaría al automantenimiento, proliferación y diferenciación celular, mediante el aumento de expresión de Hes1 lo que facilitaría el

automantenimiento de los progenitores tanto *in vitro* como *in vivo* (Kumano, Chiba et al. 2003; Kunisato, Chiba et al. 2003).

También han sido identificadas otras señales que regulan el automantenimiento de las HSCs como Mcl-1, Tel/Etv6, Gfi-1, Pten y Stat-5, que se explicarán más adelante en el capítulo 4.

3.3.3. Proliferación y quiescencia

El balance entre los estados de quiescencia y proliferación de las HSCs está finamente regulado por mecanismos tanto intrínsecos de las HSC como por interacciones con su microambiente en el nicho, que posteriormente activan la maquinaria intracelular.

Los osteoblastos (OB) expresan moléculas esenciales para el mantenimiento de la quiescencia y la función de las HSCs. Como por ejemplo, el SCF expresado en los osteoblastos, se une al receptor c-kit expresado por las HSCs (Zhu, Ji et al. 2011). El ligando Ang-1 expresado por OBs, se une al receptor Tie2 de las HSCs activando la vía de señalización PI3K/Akt, que a su vez regula diversos reguladores del ciclo celular como los inhibidores de las CDK y p21 (Gomei, Nakamura et al. 2010).

La interacción entre la trombopoyetina (TPO) liberada por los OB, y su receptor MPL expresado en las HSCs, modula la progresión del ciclo celular de las HSCs en la superficie del endostio, manteniendo las LT-HSCs en un estado quiescente dentro del nicho (Yoshihara, Arai et al. 2007).

Por otro lado, los componentes de la matriz extracelular como las N-cadherinas, las integrinas y la osteopontina, también están implicadas en la regulación del estado del ciclo celular de las HSCs. Las moléculas de adhesión celular como las cadherinas y las integrinas son importantes en las interacciones entre las HSCs y el nicho osteoblástico. En HSCs, la N-cadherina y la β 1-integrina han sido definidas como dianas después de las interacciones Tie2/Ang-1 y TPO/MPL, respectivamente (Arai, Hirao et al. 2004) (Yoshihara, Arai et al. 2007). Aunque en estudios de delección condicional de la N-cadherina, se ha observado que la regulación del automantenimiento de las HSC no depende de la N-cadherina (Kiel, Radice et al. 2007; Kiel, Acar et al. 2009). Esto sugiere que las moléculas de adhesión no sólo contribuyen a la unión de las HSCs con el nicho, sino que también regulan la quiescencia de las HSCs en el nicho. La osteopontina (Opn) que se expresa en los OB, media la migración de las HSCs a través de la médula ósea hacia la región del endostio, e inhibe la proliferación promoviendo la quiescencia de las HSCs (Nilsson, Johnston et al. 2005).

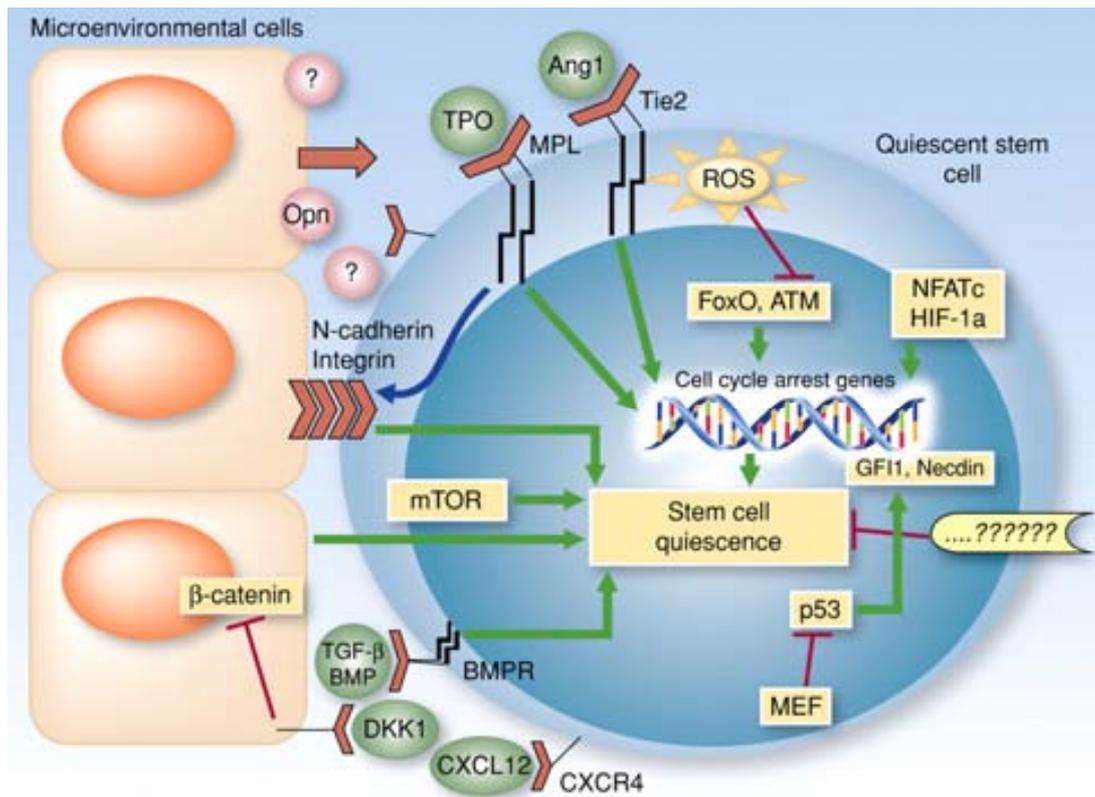


Figura 5. Mecanismos que participan en el control de la quiescencia de las HSC. La quiescencia está controlada tanto por mecanismos de regulación intrínseca como por señales externas del microambiente (Li and Bhatia 2011).

La vía de señalización de Wnt participa en la proliferación, migración y polaridad celular, y en el mantenimiento de las células madre (Reya, Morrison et al. 2001). La activación constitutiva de la señalización nuclear de β -catenina, reduce la quiescencia afectando al automantenimiento de las HSCs, y bloquea la diferenciación (Kirstetter, Anderson et al. 2006). Por otro lado, la expresión de un inhibidor de la vía canónica de Wnt, resulta en un aumento de HSCs en ciclo y reduce la capacidad de regeneración (Fleming, Janzen et al. 2008). Estos hallazgos sugieren que la activación de la vía de Wnt en el nicho, limita la proliferación y preserva la capacidad de automantenimiento de las HSCs.

A parte de las señales extrínsecas que intervienen en la regulación de la quiescencia, existen numerosas moléculas implicadas en la regulación de la quiescencia mediante mecanismos intrínsecos. Estudios recientes han demostrado que la señalización de p53 a parte de participar en la respuesta celular frente a daños en el ADN, también es crítica en la regulación de la quiescencia de las HSCs en condiciones de homeostasis hematopoyética (Lacorazza, Yamada et al. 2006; Liu, Elf et al. 2009). p53 se expresa

preferentemente en HSCs, en comparación con progenitores hematopoyéticos más comprometidos, y promueve la quiescencia en las HSCs (Liu, Elf et al. 2009). El factor de transcripción MEF/ELF4 modula la expresión de p53 y facilita la entrada en ciclo de las HSCs quiescentes (Lacorazza, Yamada et al. 2006). Una de las principales dianas de p53 es p21. Algunos estudios sugieren que p53 y p21 tienen un papel importante en la inhibición de la entrada en ciclo de las HSCs y en la regulación del reservorio de HSCs bajo condiciones de estrés (Cheng, Rodrigues et al. 2000). Por otro lado, estudios más recientes indican que p21 participa mínimamente en la regulación de la quiescencia de las HSCs en condiciones de homeostasis (van Os, Kamminga et al. 2007). A parte de p21, han sido identificados otros dos genes diana de p53, *Gfi-1* y *Necdin*, como importantes reguladores de la quiescencia (Hock, Hamblen et al. 2004; Liu, Elf et al. 2009).

La médula ósea presenta un ambiente con bajos niveles de oxígeno, lo que protege a las células de la exposición a estrés oxidativo. Se han identificado varios factores implicados en el mantenimiento de bajos niveles oxidativos en las HSCs. Las especies reactivas de oxígeno están implicadas en la regulación del mantenimiento de las HSCs (Ito, Hirao et al. 2004; Tothova, Kollipara et al. 2007). El grupo FoxO incluye cuatro miembros (FoxO1, FoxO3a, FoxO4 y FoxO6). Las proteínas FoxO son activadas en respuesta a estrés oxidativo, y activan la expresión de genes que participan en procesos de detoxificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), y parada del ciclo celular. Las HSCs obtenidas de un modelo de ratón deficiente en FoxO1, FoxO3 y FoxO4, muestran elevados niveles de ROS, aumento de la actividad del ciclo celular y de la apoptosis, y fallo en la capacidad de reconstitución a largo plazo (Tothova, Kollipara et al. 2007). Los efectos provocados por la ausencia de FoxO pueden ser revertidos mediante la administración de antioxidantes. ATM es un regulador de los puntos de control del ciclo celular, activado después de daños en el ADN y que también regula los niveles de ROS (Ito, Hirao et al. 2004). ATM se expresa principalmente en HSCs en ciclo, y los modelos murinos deficientes en ATM muestran elevados niveles de ROS, ausencia de HSCs quiescentes, y fallos en la médula ósea (Ito, Hirao et al. 2004). El tratamiento con antioxidantes reestablece la quiescencia y la capacidad de repoblación de la médula ósea de las HSCs ATM^{-/-}.

En la médula ósea, existe un gradiente de oxígeno que varía entre el 1% en nichos hipóxicos y el 6% en la cavidad de los sinusoides. En las zonas de la médula ósea en las que se mantiene un ambiente hipóxico, se ha observado que se localizan la mayoría de las células con baja actividad mitótica, cercanas a la superficie del hueso y

alejadas de los capilares (Kubota, Takubo et al. 2008). En estas zonas, las concentraciones de oxígeno son bajas (0.1-5 %) y el aporte de nutrientes es limitado. En el microambiente de hipoxia de la médula ósea, se generan las condiciones óptimas para el mantenimiento de las HSCs, donde se encuentran la mayoría de células hematopoyéticas con tasas de división bajas, sugiriendo que los nichos hipóxicos son necesarios para reducir la proliferación de las HSCs (Guitart, Debeissat et al. 2011).

Diferentes estudios muestran que el mantenimiento y la expansión de las HSC se ve favorecido en cultivos a concentraciones de oxígeno del 1% y 1.5%, y también se reduce su proliferación respecto a cultivos realizados a concentraciones de oxígeno del 20%. Estas células mejoran su capacidad de injerto en modelos NOD-SCID por el mantenimiento de células con capacidad de repoblación a largo plazo del modelo SCID (Danet, Pan et al. 2003). Las HSCs del nicho hipóxico expresan niveles más altos de Notch-1, telomerasa, y p21 que las células que se localizan próximas a la vasculatura (Jang and Sharkis 2007). Esta observación ha sido respaldada por el trabajo en el que se trasplantó la población CD34⁺CD38⁻ de células de sangre de cordón umbilical cultivadas bajo concentraciones de oxígeno del 1%. Se observó injerto con una significativa reducción en la proliferación y un aumento de expresión de p21 (Shima, Takubo et al. 2009). Además se ha observado que condiciones extremas de concentraciones bajas de oxígeno (0.1%), llevan a las células CD34⁺ a un estado de quiescencia (Hermitte, Brunet de la Grange et al. 2006). Estas evidencias sugieren que la hipoxia es un factor crítico en el nicho hematopoyético, y la exposición a elevadas concentraciones de oxígeno afecta negativamente al automantenimiento de las HSC promoviendo la entrada en ciclo celular.

El factor de transcripción heterodimérico HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1 α) constituye la mayor respuesta molecular a hipoxia. Está formado por dos subunidades, la subunidad α sensible al oxígeno y la β (también llamada Arnt) insensible al oxígeno. El heterodímero HIF se une a elementos de respuesta a hipoxia que regulan múltiples genes implicados en glucólisis, metabolismo energético, transporte de glucosa, angiogénesis y eritropoyesis.

En los mecanismos moleculares implicados en el efecto de la hipoxia sobre las HSCs, interviene la regulación de los niveles de factor HIF-1 α que mantiene las HSCs en un estado quiescente (Takubo, Goda et al. 2010).

Múltiples estudios relacionan TGF β 1 con el control de la quiescencia y la inhibición de la proliferación de las HSCs (Goey, Keller et al. 1989; Keller, McNiece et al. 1990; Lu, Xiao et al. 1993; Sitnicka, Ruscetti et al. 1996; Batard, Monier et al. 2000; Fan,

Valdimarsdottir et al. 2002; Chabanon, Desterke et al. 2008). Estos estudios sugieren que TGF β 1 es importante en el control de la quiescencia de las HSCs tanto *in vitro* como *in vivo*, y que tanto la producción autocrina de TGF β 1 por parte de las HSCs como la producción de TGF β 1 por las células estromales del nicho, contribuyen en el mantenimiento de las HSCs (Kim and Letterio 2003; Ruscetti, Akel et al. 2005).

En la activación de la vía mediada por TGF β se ha descrito que las diferentes isoformas de TGF β son sintetizadas en forma de precursor biológicamente inactivo. Requieren un procesamiento de la proteína precursora para dar lugar a formas maduras de la proteína. Una vez sintetizados y procesados, son liberados por las células como TGF β latentes, que son biológicamente inactivos. Tras ser liberados, los TGF β latentes pueden ser activados mediante diferentes mecanismos y actuar de forma autocrina o paracrina (Fortunel, Hatzfeld et al. 2000). Yamazaki y colaboradores demostraron que células LSK CD34⁺ en presencia de la forma activa de TGF β eran incapaces de generar colonias mientras que la forma latente de TGF β no afectaba a la formación de colonias (Yamazaki, Iwama et al. 2009).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la inhibición de la proliferación mediada por TGF β 1 como por ejemplo, alteraciones en la expresión de los receptores de citoquinas (Dubois, Ruscetti et al. 1990; Jacobsen, Ruscetti et al. 1991; Dubois, Ruscetti et al. 1994) o el aumento de la expresión de inhibidores de CDKs como p21 (Datto, Li et al. 1995; Ducos, Panterne et al. 2000), p27 (Pierelli, Marone et al. 2000), p15 (Dao, Hwa et al. 2002) y p57 (Scandura, Boccuni et al. 2004; Umemoto, Yamato et al. 2005). Ducos y colaboradores demostraron que el mRNA de p21 está controlado por el TGF β 1 endógeno en células madre y progenitores hematopoyéticos quiescentes (Ducos, Panterne et al. 2000). Sin embargo, existen otros estudios en los que p21 y p27 parece que no son necesarios en la inhibición de la proliferación de progenitores hematopoyéticos mediada por TGF β (Cheng, Shen et al. 2001).

Otro nivel de regulación de la quiescencia y la proliferación de las HSC es a nivel de la membrana celular. Existen microdominios lipídicos en la membrana plasmática de la célula, enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos llamados *lipid rafts*, dentro de los cuales se distribuyen moléculas con funciones diversas como por ejemplo la señalización celular, el tráfico a través de la membrana o la organización del citoesqueleto celular. Yamazaki y colaboradores (Yamazaki, Iwama et al. 2006), postularon un modelo en el que la hibernación o la entrada en ciclo celular de las HSCs dependen de la regulación de los *lipid raft*. Se ha observado que la reorganización de los microdominios lipídicos inducida por las citoquinas, es esencial para aumentar el nivel de la señal de las citoquinas y que las HSCs entren en ciclo.

TGF β inhibe las señales de las citoquinas de reorganización de los microdominios, manteniendo las HSCs en hibernación. Las dianas de TGF β , Smad2 y Smad3, están activadas de forma específica en LSK CD34⁻ en hibernación pero no en progenitores más maduros LSK CD34⁺ (Yamazaki, Iwama et al. 2009).

3.3.4. Migración

La migración de las HSCs tiene lugar durante el desarrollo hematopoyético y, en determinadas condiciones, durante la vida del individuo adulto. En adultos, en condiciones fisiológicas, la hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea donde las HSCs residen en nichos especializados. Sin embargo, las HSCs tienen la habilidad de migrar ya que se han encontrado en el bazo y en la circulación sanguínea periférica, entre otros tejidos. Se desconocen los mecanismos implicados en la migración desde la médula ósea a la sangre periférica. Sin embargo, se ha observado que la administración de factores como citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y hormonas pueden forzar la movilización de los progenitores aumentando su presencia en la circulación sanguínea (Zlotoff and Bhandoola 2011).

Se desconoce el papel que juegan las LT-HSC en la circulación sanguínea. La mayoría de las HSCs circulantes son células que no se dividen y permanecen en un estado de arresto en el ciclo celular. Se ha propuesto que la migración de las HSCs podría ser importante para la redistribución de las LT-HSCs en la médula ósea (Wright, Cheshier et al. 2001). Esto aseguraría la ocupación de las zonas vacías del nicho tras la muerte o diferenciación de las HSCs y podría ayudar al mantenimiento de la homeostasis hematopoyética. La presencia de HSCs también podría ser un reservorio hematopoyético disponible de forma inmediata en situaciones de pérdida sanguínea.

Las moléculas de adhesión de las células estromales constituyen un elemento importante en la regulación de la movilización de las HSCs, así como las citoquinas y las quimiocinas. Un ejemplo de señalización implicada en la movilización es la mediada por el receptor CXCR4, que se une a la quimiocina SDF-1 α (CXCL-12). Además, se ha observado que la interacción de la señalización CXCL-12/ CXCR-4 con otras vías como la señalización de Flt3, podría aumentar la migración de las HSCs (Fukuda, Broxmeyer et al. 2005). Como ejemplos de citoquinas implicadas en la migración, se ha observado que SCF y G-CSF son capaces de movilizar las HSCs (To, Haylock et al. 1997).

3.3.5. Anidamiento de las HSCs

Las HSCs circulantes tienen que ser reconocidas por el endotelio sinusoidal de la médula ósea. Un conjunto de interacciones moleculares participan en este proceso de

reconocimiento y permiten la extravasación de las HSCs circulantes. Las integrinas $\alpha 4$ y $\alpha 6$ están expresadas en las HSCs y contribuyen en el anidamiento de los progenitores (Katayama, Hidalgo et al. 2004; Qian, Tryggvason et al. 2006). Se ha observado que la inhibición de las $\alpha 4$ integrinas, selectinas o VCAM-1, reducía el anidamiento de las HSCs de forma significativa (Scott, Priestley et al. 2003; Ulyanova, Scott et al. 2005). Mientras que $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 son importantes para el arresto de los progenitores, las selectinas de las células endoteliales contribuyen en las interacciones iniciales del movimiento de los progenitores hematopoyéticos en el endotelio de la médula ósea (Papayannopoulou 2003). El movimiento mediado por las selectinas también se ha observado en células CD34⁺ de sangre de cordón umbilical, y está más limitado en CD34⁺ aisladas de médula ósea o sangre periférica movilizada (Hidalgo, Weiss et al. 2002). Las moléculas de adhesión también están implicadas en los procesos de anidamiento y su acción está coordinada por la quimiocina CXCL-12, presente en la superficie de las células endoteliales. En células humanas CD34⁺CD38⁻, el bloque del receptor CXCR-4 inhibía la migración y el injerto de las HSCs (Peled, Petit et al. 1999). Durante el arresto de las células CD34⁺ en el endotelio, CXCL-12 media la activación de otras integrinas (LFA-1, $\alpha 4$ y VLA-5) (Peled, Kollet et al. 2000). La activación de la vía CXCR-4, activa otras moléculas que finalmente inducen la activación de Pyk2 y ERK, lo que resulta en la quimiotaxis y la adhesión de los progenitores (Petit, Goichberg et al. 2005). Tras los procesos de adhesión, CXCL-12 induce la transmigración de los progenitores a través del endotelio, donde participarían otras moléculas de adhesión como CD31/PCAM-1 (Yong, Watts et al. 1998).

Tras atravesar la barrera del endotelio, las HSCs tienen que hospedarse en un lugar que asegure su supervivencia, proliferación y diferenciación. Se han identificado algunas moléculas importantes para el mantenimiento de las HSCs en el endostio como por ejemplo PTH, mediante el aumento de expresión de CXCL12 en los osteoblastos (Jung, Wang et al. 2006), y la presencia de CaR en las HSCs (Adams, Chabner et al. 2006). La forma transmembrana de SCF ha sido propuesta como una molécula importante en el mantenimiento de las HSCs en el endostio (Driessen, Johnston et al. 2003).

4. REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

Las HSCs, para automantenerse, requieren la activación de señales de proliferación junto con la represión de las vías de inducción de apoptosis y diferenciación. Las decisiones de las HSCs de automantenerse o diferenciarse, están controladas por una

interacción compleja de señales autónomas (regulación intrínseca) y estímulos externos procedentes del microambiente que las rodea (regulación extrínseca).

4.1. Reguladores intrínsecos

En los mecanismos moleculares involucrados en el automantenimiento de las HSCs participan múltiples receptores, transductores de señales, factores de transcripción, entre otras proteínas intracelulares. Estas redes de señalización han ido descifrándose gracias al uso de modelos murinos *knockout*, estrategias de inactivación condicional, activación constitutiva o el uso de dominantes negativos, entre otras técnicas. Sin embargo, hasta el momento, han sido identificadas y caracterizadas relativamente pocas proteínas ya que la regulación del automantenimiento de las HSCs es un proceso complejo. A continuación se exponen algunos ejemplos.

El factor de transcripción *Tel/Etv6* es necesario para el mantenimiento de las HSCs pero no para el mantenimiento de células menos primitivas. La inactivación condicional del gen *Tel/Etv6* en células B, T y progenitores eritroides no afectaba a su diferenciación. Sin embargo, cuando la inactivación tenía lugar en las HSCs, se observaba una depleción de toda la médula ósea durante varias semanas (Hock, Meade et al. 2004). Tal y como se esperaba, la médula ósea con el gen *Tel/Etv6* inactivado no competía frente a células de la médula ósea no modificadas, cuando estas eran co-trasplantadas.

Gfi1 es un represor transcripcional que controla el automantenimiento de las HSCs limitando su proliferación. Las HSCs con *Gfi1* deletado, proliferan más rápido y pierden sus capacidades de radioprotección y reconstitución competitiva cuando son trasplantadas (Zeng, Yucel et al. 2004). Su mecanismo de actuación no está claro pero se postula que sería mediante la regulación de p21 ya que su expresión está reducida en HSCs deficientes en *Gfi1* (Hock, Hamblen et al. 2004), o protegiéndolas de la apoptosis (Khandanpour, Kosan et al. 2011).

Pten es un supresor tumoral que actúa como regulador negativo de la vía AKT, que participa en múltiples procesos celulares incluyendo proliferación, supervivencia, y decisiones de linaje. Aparte de aumentar la probabilidad de que tenga lugar una transformación leucémica, la inactivación condicional de *Pten* en HSCs de médula ósea, también afecta de forma negativa al automantenimiento de las HSCs. Después del trasplante, las HSCs deficientes en *Pten* inicialmente injertaban de forma normal pero eran incapaces de mantener la producción de células hematopoyéticas a largo plazo. Se observó una expansión inicial transitoria de HSCs *Pten*^{-/-} después del trasplante pero con el tiempo la reserva de HSCs se agotó (Yilmaz, Valdez et al.

2006). El análisis del estado del ciclo celular reveló que pocas de las HSCs *Pten*^{-/-} se encontraban en G₀, sugiriendo que *Pten* podría tener un papel en el bloqueo de la progresión del ciclo celular. Además se ha observado que la interacción entre la vía de Wnt y Pten/PI3K/Akt, favorece el automantenimiento y la expansión de las HSC (Perry, He et al. 2011).

La vía de señalización JAK-STAT es una vía de convergencia común en la señalización inducida por citoquinas. La activación constitutiva de *Stat5* en HSCs promovía el automantenimiento *in vitro* de las HSCs y una dramática amplificación de progenitores más comprometidos (Kato, Iwama et al. 2005). Por el contrario, su delección disminuía la celularidad en la médula ósea y en sangre periférica, y su competitividad cuando eran trasplantadas (Snow, Abraham et al. 2002). La inhibición de la expresión de *Stat5* provocaba una reducción del número de progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺CD38⁻ y su expansión (Schepers, van Gosliga et al. 2007). Se obtuvieron resultados similares en los estudios de *Stat3*. Cuando se reducía la actividad de *Stat3* en HSCs a través de la expresión de un dominante negativo, la capacidad de reconstitución competitiva de las células transducidas disminuía. Por el contrario, la expresión constitutiva de una forma activada de *Stat3*, favorecía el automantenimiento y la actividad de regeneración de las HSCs trasplantadas durante la fase de recuperación hematológica, y esto se repetía hasta el trasplante terciario (Chung, Park et al. 2006). Estos estudios sugieren que la vía JAK-STAT juega un papel importante en la regulación del automantenimiento de las HSCs.

El gen *HOXB4*, de la familia de genes *homeobox*, codifica para un factor de transcripción que está expresado en células hematopoyéticas primitivas y que rápidamente disminuye su expresión en poblaciones celulares más diferenciadas (Sauvageau, Lansdorp et al. 1994; Pineault, Helgason et al. 2002). La sobreexpresión de *HOXB4* en HSCs, inducía una marcada expansión de las HSCs tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo que podría actuar como un regulador positivo del automantenimiento de las HSCs.

4.1.1. Regulación epigenética

La modulación de la expresión génica a través de modificaciones del ADN o la estructura de la cromatina se denomina regulación epigenética, y se refiere a cambios estables o heredados en la expresión génica. Estos cambios incluyen la metilación del ADN, modificaciones en las histonas (por acetilación, metilación, fosforilación, SUMOilación y ubiquitinación), modificaciones post-traduccionales y silenciamiento por miRNA antisentido. Estas modificaciones afectan a la estructura de la cromatina y a la

transcripción génica mediante la regulación del acceso de los factores de transcripción.

La organización del ADN en nucleosomas es el componente central de la regulación epigenética. Cada nucleosoma está formado por 147 pb de ADN envuelto alrededor de un núcleo de ocho histonas que incluyen dos moléculas de H2A, H2B, H3 y H4. Los nucleosomas se unen entre ellos a través de la histona H1 y un fragmento corto de ADN de 200 ± 40 pb formando la fibra de ADN de 10nm.

Los genes activos se localizarían en zonas libres de nucleosomas quedando accesibles a los factores de transcripción, o en regiones de la cromatina hiperacetiladas debido a la acción de las histona acetiltransferasas (HATs) (Eberharther and Becker 2002). Por otro lado, las regiones de heterocromatina, donde se localizan los genes silenciados, tienden a encontrarse hipoacetiladas debido a la acción de las histona deacetilasas (HDAC) y la metilación de las islas de dinucleótidos CpG por las ADN metiltransferasas (DNMTs) (Bird 2002). Los cambios en la organización de la cromatina provocados por las histona deacetilasas y por las histona acetiltransferasas pueden modular el patrón de expresión de genes implicados en la proliferación y diferenciación celular. La deacetilación por las histonas deacetilasas provoca un cambio en la conformación de la cromatina que tiene como efecto final el silenciamiento génico (Jones and Takai 2001). En cambio, la acetilación de las histonas por las histona acetiltransferasas, está asociada con la activación de regiones del genoma (Kass, Pruss et al. 1997; Moazed 2001) (figura 6).

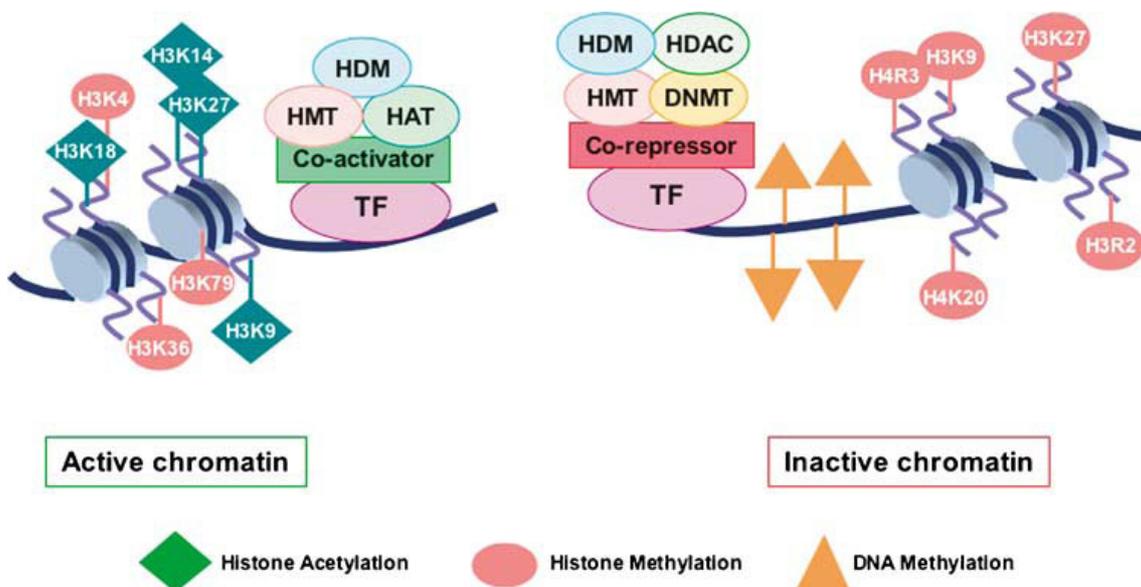


Figura 6. Los factores de transcripción actúan como moléculas de unión para los agentes modificadores de las histonas. Las zonas de transcripción activa de la cromatina están asociadas con la hiperacetilación y la metilación de los residuos H3K4, H3K79 y H3K36 en las regiones de los promotores, mientras que la represión génica está asociada con la metilación

del DNA, la hipacetilación y la metilación de los residuos H3K9, H3K27 y H4K20. Estas modificaciones están mediadas por enzimas modificadores de la cromatina que incluyen las DNA metiltransferasas (DNMT), las histona acetiltransferasas (HAT), las histona deacetilasas (HDAC), las histona metiltransferasas (HMT) y las histonademetilasas (HDM) (Rice, Hormaeche et al. 2007).

Un ejemplo de modificador epigenético es el grupo de proteínas que forman el complejo Polycomb. PCR2 (complejo represor Polycomb 2) está formado por tres componentes, EZH2, EED, and SUZ12. PRC1 (complejo represor Polycomb 1) contiene cuatro componentes, RING1B, BMI1, HPH y CBX. La represión transcripcional mediada por las proteínas del grupo Polycomb es esencial para el mantenimiento de las características de las HSC. BMI1 es requerido para el automantenimiento de las HSCs adultas (Park, Qian et al. 2003), favorece la expansión simétrica del conjunto de HSCs, e induce la expansión *ex vivo* de los progenitores multipotenciales y la capacidad de repoblación de la médula ósea *in vivo* (Iwama, Oguro et al. 2004).

Aparte del complejo Polycomb, las DNA metiltransferasas (DNMT) también son reguladores epigenéticos clave en la represión transcripcional. La familia de DNMTs está formada por DNMT1, cuya diana preferente es el ADN hemi-metilado y es necesaria para el mantenimiento de la metilación durante la replicación del DNA; y DNMT3A y DNMT3B, que son necesarias para la metilación *de novo*. Durante la hematopoyesis, Dnmt1 es necesaria para el automantenimiento y la diferenciación de las HSCs (Broske, Vockentanz et al. 2009; Trowbridge, Snow et al. 2009), mientras que se ha observado que Dnmt3a es dispensable en la regulación de las HSCs (Tadokoro, Ema et al. 2007).

Las modificaciones del DNA y de la estructura de la cromatina pueden alterar la función génica. La mayor modificación del genoma de los vertebrados es la metilación de las citosinas, predominantemente en los dinucleótidos CpG, que juega un papel importante en la represión estable de la transcripción. Otra forma de modificación epigenética es el resultado de la acetilación reversible de las histonas. Se ha descrito que existen agentes farmacológicos que inducen cambios epigenéticos como la 5aza 2'deoxicitidina (5azaD), la tricostatina A (TSA) o el ácido valproico (VPA); en el mantenimiento, la expansión y la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos *in vitro*. En un estudio previo, Milhem y colaboradores observaron que el cultivo de células CD34⁺ de médula ósea con 5aza 2'deoxicitidina (5azaD) y tricostatina A (TSA), en un cóctel de citoquinas que favorece la diferenciación, resultaba en la expansión de células CD34⁺CD90⁺, un subtipo de células CD34⁺, que poseía propiedades características de HSCs y HPCs. Estos efectos tenían lugar debido a cambios

inducidos en el patrón de metilación de los progenitores cultivados con 5azaD y TSA (Milhem, Mahmud et al. 2004). La metilación cambia las interacciones entre las proteínas y el ADN, lo que lleva a una alteración en la estructura de la cromatina provocando un aumento o una disminución de la tasa de transcripción de determinados genes (Jaenisch and Bird 2003).

En estudios posteriores, Araki y colaboradores observaron que mejorando el cóctel de citoquinas del estudio de Milhem y colaboradores (Milhem, Mahmud et al. 2004), conseguían una expansión de la población CD34⁺CD90⁺ cultivada con 5azaD y TSA, de doce veces (Araki, Mahmud et al. 2006; Araki, Baluchamy et al. 2009). Demostraron que 5azaD/TSA inducían cambios en el estado de acetilación de la región de la histona H4 (Araki, Mahmud et al. 2006). Posiblemente, tanto los cambios de metilación como de acetilación afectaban a los patrones de expresión génica de las células CD34⁺CD90⁺, favoreciendo la expansión de las HSCs con capacidad de repoblación *in vivo*. Por otro lado, Araki y colaboradores analizaron como afectaban 5azaD/TSA a la tasa de proliferación de progenitores hematopoyéticos en cultivo. Observaron que la exposición a 5azaD/TSA provocaba un enlentecimiento de la tasa de división manteniendo la capacidad de repoblación de los progenitores hematopoyéticos (Araki, Yoshinaga et al. 2007). Los agentes modificadores de la cromatina estarían influyendo en la tasa de división celular a través de la regulación de la maquinaria del ciclo celular o promoviendo la expansión de las HSCs más primitivas que poseen una baja tasa de división celular (Nygren, Bryder et al. 2006; Wilson, Oser et al. 2007).

El ácido valproico (VPA), un fuerte inhibidor de las histona deacetilasas, ha sido utilizado durante más de 20 años en el tratamiento de trastornos neurológicos (McCabe 2000; Chuang, Leng et al. 2009). También está documentado su efecto regulador sobre la proliferación, diferenciación y apoptosis en células tumorales (Marks, Richon et al. 2000). Se ha observado que el VPA actúa como un regulador epigenético del mantenimiento de las características que definen las células madre hematopoyéticas, y de la diferenciación de los progenitores comprometidos a los diferentes linajes (Bug, Gul et al. 2005; De Felice, Tatarelli et al. 2005). Recientemente se ha descrito que una de las dianas del VPA, la HDAC3, actúa como un regulador negativo de la expansión de las HSC de sangre de cordón umbilical. La inhibición de la expresión de HDAC3, mejora considerablemente la expansión de células CD34⁺, aumentando su capacidad de generar colonias (Elizalde, Fernandez-Rueda et al. 2012).

4.2. Reguladores extrínsecos

4.2.1. Citoquinas y factores de crecimiento

Los factores de crecimiento y las citoquinas son necesarios para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas en todos los estadios del desarrollo. Cada una de estas proteínas mantiene la supervivencia y proliferación de diferentes tipos celulares mediante la interacción con sus receptores específicos.

A partir del descubrimiento de la eritropoyetina (EPO) como un regulador de la formación de células eritroides (Plzak, Fried et al. 1955), se identificaron múltiples reguladores de la producción celular en otros linajes hematopoyéticos. Existen factores estimulantes de colonias (CSF) como el GM-CSF que provoca la proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos de granulocitos y macrófagos. El G-CSF controla la producción, diferenciación y función de los granulocitos (Metcalf and Nicola 1983). Tanto el GM-CSF como el G-CSF inducen la movilización de las células madre hematopoyéticas y han sido ampliamente utilizados en protocolos clínicos para el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Tras los CSFs, otras citoquinas fueron identificadas, llamadas interleuquinas (IL). La IL-3 estimula la formación de colonias de granulocitos y macrófagos, y también la formación de colonias de eosinófilos, megacariocitos y eritrocitos (Ihle, Keller et al. 1982). IL-11 es una citoquina con capacidad de estimulación de la proliferación de los progenitores más primitivos (Du and Williams 1994).

Han sido identificadas interleuquinas adicionales implicadas en el desarrollo y función de las células B y T. Como por ejemplo, la IL-2 que estimula la proliferación de las células T (Robb, Kutny et al. 1983), la IL-4 que actúa como co-factor (Lee, Yokota et al. 1986), la IL-6 (Hirano, Yasukawa et al. 1986) y la IL-15 (Muench, Humeau et al. 2000) que participan en la diferenciación B, y la IL-7 que es un factor clave en la formación de linfocitos T (Namen, Lupton et al. 1988).

Existen factores que son determinantes en los procesos de diferenciación celular mientras que otros actúan sobre los progenitores más inmaduros, como por ejemplo SCF, Flt3, TPO, TNF α y TGF β .

SCF (*Stem Cell Factor*) es el ligando del receptor cKit que constituye un marcador de células madre y progenitores hematopoyéticos. SCF se expresa de forma constitutiva en los fibroblastos y las células endoteliales de la médula ósea, y es esencial para supervivencia, proliferación, adhesión, migración y diferenciación de las HSCs (Zhu and Emerson 2002). El bloqueo mediante anticuerpos de la interacción entre SCF de los osteoblastos y el receptor cKit de las HSCs, ha demostrado que la señalización de

cKit es esencial para mantener la función y la quiescencia de las HSCs (Kiel and Morrison 2006). Recientemente se ha observado que la tirosina fosfatasa citoplasmática Shp2, que actúa después de cKit, también promueve su expresión, formando una cascada de señalización cKit-Shp2-cKit. La inhibición de Shp2 suprime la función de las HSCs, y las HSCs deficientes en Shp2 no eran capaces de reconstituir huéspedes irradiados debido a defectos en el anidamiento, automantenimiento y supervivencia (Zhu, Ji et al. 2011).

Flt3 es un receptor tirosina quinasa (CD135) cuya expresión ha sido descrita en progenitores murinos de hígado fetal y médula ósea en ciclo (Matthews, Jordan et al. 1991). La expresión de CD135 ha sido detectada en células CD34⁺ de médula ósea y de sangre de cordón umbilical (Rappold, Ziegler et al. 1997). El ligando de este receptor fue clonado y se observó que estimulaba la proliferación de las células madre hematopoyéticas y de las células dendríticas en desarrollo, actuando de forma sinérgica al estímulo de otros factores de crecimiento (Lyman, James et al. 1993).

La trombopoyetina (TPO) participa en la producción de plaquetas. TPO es reconocida por el receptor Mpl lo que resulta en un estímulo muy fuerte para la formación de colonias mecariocíticas *in vitro*, particularmente en combinación con IL-3 y SCF (Wendling, Maraskovsky et al. 1994). La señalización iniciada por la interacción entre la TPO liberada por los componentes del nicho y el receptor Mpl expresado en las HSCs, modula la progresión del ciclo celular de las HSCs. La adhesión de células quiescentes LSK CD34⁻MPL⁺ a osteoblastos productores de TPO, sugiere que la señalización TPO/MPL contribuye a la retención de las LT-HSCs en el nicho osteoblástico. La inhibición de la vía TPO/MPL reducía el número de HSCs quiescentes y las interacciones entre el nicho y las HSCs (Qian, Buza-Vidas et al. 2007; Yoshihara, Arai et al. 2007). Estas observaciones demuestran que la señalización TPO/MPL participa en el mantenimiento de la quiescencia de las HSCs.

También participan en la regulación de la respuesta de las HSCs, citoquinas de señalización inflamatoria incluyendo interferones, el factor α de necrosis tumoral (TNF α) y los receptores Toll-like (Baldrige, King et al. 2011). Se ha demostrado que las citoquinas como el interferon (α , β , γ) regulan directamente la función de las HSCs. Recientemente, se ha observado que el tratamiento de ratones con IFN α estimula las HSCs quiescentes *in vivo* (Essers, Offner et al. 2009), y que IFN γ puede estimular la proliferación de las HSCs tanto *in vitro* como *in vivo* (Baldrige, King et al. 2010; Zhao, Ren et al. 2010).

El TGF β constituye un potente inhibidor de la proliferación de las HSCs y de los progenitores hematopoyéticos murinos y humanos *in vitro*. No solo inhibe la

proliferación a través de la inducción de genes de respuesta antiproliferativa como c-Myc o la inducción de inhibidores de CDKs, sino que también inhibe la expresión de receptores de citoquinas hematopoyéticas como GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-1 y SCF (Soderberg, Karlsson et al. 2009).

TNF α es la mayor citoquina pro-inflamatoria producida por macrófagos estimulados por la exposición a endotoxinas u otros antígenos bacterianos. Se postula que TNF α , inhibe la proliferación e induce apoptosis en las HSCs. Se ha observado que en humanos, TNF α inhibe la capacidad de formación de colonias *in vitro*, así como la habilidad de reconstitución del modelo murino NOD-SCID, de las HSCs. En modelos murinos, TNF α también inhibe la proliferación de las HSCs *in vitro*. También se ha observado que la reducción en la funcionalidad de las HSCs asociada a la edad, podría estar causada por un aumento de la señal inflamatoria de TNF α y la activación de NF κ B. Esto sugiere que TNF α participa en la regulación de la respuesta de las HSCs a la infección por patógenos (Baldrige, King et al. 2011).

4.2.2. Vías de señalización celular

El estroma medular produce factores solubles pero también favorece la expansión de progenitores hematopoyéticos a través de contactos intercelulares. Las interacciones celulares pueden inducir la proliferación sin afectar a la diferenciación mediante la activación de vías de señalización celular.

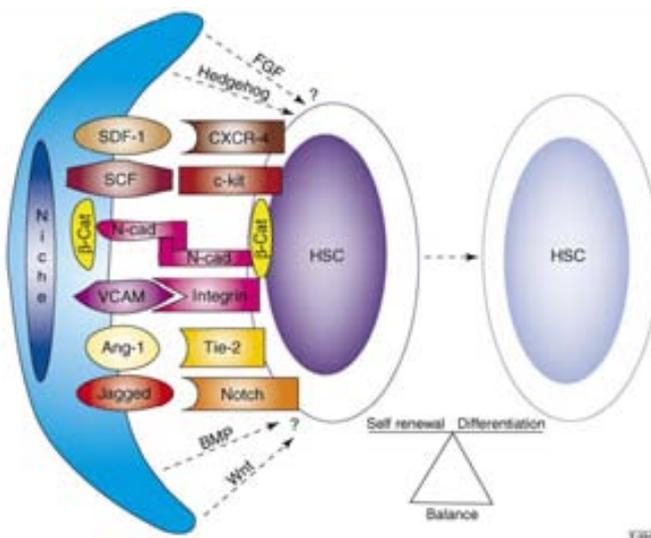


Figura 7. Señales intercelulares del nicho y las células madre hematopoyéticas (Li and Li 2006).

4.2.2.1. Vía de Notch

El papel de la vía de Notch en la hematopoyesis será discutido en la sección 5.

4.2.2.2. Vía de Wnt

Las proteínas Wnt son glicoproteínas involucradas en la diferenciación, supervivencia, proliferación y migración celular. La activación canónica de la vía de Wnt/ β -catenina a través de la interacción de moléculas Wnt (Wnt1, 2b, 3, 3a, 4, 5a, 10b) con receptores Frizzled, provoca la inhibición de la fosforilación de β -catenina por la quinasa glucógeno sintasa 3 β (GSK3 β). Esto protege a β -catenina de su degradación por el proteasoma, lo que conduce a un aumento en los niveles de β -catenina y su translocación al núcleo. En el núcleo, β -catenina se une a la familia de factores de transcripción LEFT/TCF, y se activa de forma específica la expresión de genes (Blank, Karlsson et al. 2008). Algunos de los miembros de la familia de Wnt participan en la hematopoyesis en diferentes especies. Wnt5a y Wnt10b están expresados en el saco embrionario y en el hígado fetal, donde promueven la expansión de células progenitoras (Austin, Solar et al. 1997). Wnt3a tiene la capacidad de inducir el automantenimiento de las células madre hematopoyéticas *in vitro* (Willert, Brown et al. 2003). La sobreexpresión de la forma activada de β -catenina en células madre hematopoyéticas aumenta el automantenimiento *in vitro* y la reconstitución de ratones adultos irradiados de forma letal debido al aumento de la expresión de HoxB4 y Notch1 (Reya, Duncan et al. 2003). Los estudios anteriores revelan que la vía de Wnt es necesaria para promover la expansión y el automantenimiento de las células madre hematopoyéticas. Fleming y colaboradores demostraron que la expresión de Dickkopf1 (Dkk1) en osteoblastos, un inhibidor de la señalización de Wnt, aumentaba la proliferación provocando la pérdida progresiva de la capacidad de reconstitución (Fleming, Janzen et al. 2008).

Por otro lado, se ha observado que la vía no canónica de Wnt (Wnt3a, 4, 5a) también juega un papel importante en la hematopoyesis. Diversos estudios han demostrado que la inducción de la vía no canónica, puede inhibir la señalización canónica de Wnt (Topol, Jiang et al. 2003; Weidinger and Moon 2003). Se ha observado que en condiciones de cultivo de HSCs LSK con Wnt3a y/o Wnt5a, Wnt5a promovía la degradación de β -catenina e inhibía la inducción de la vía canónica de Wnt3a. Por el contrario, Wnt5a era suficiente para aumentar la eficiencia de injerto de las HSCs y la capacidad de reconstitución multilinaje, comparado con las HSCs cultivadas sin Wnt5a. Indicando que la vía no canónica de Wnt es importante para el mantenimiento

de la función de las HSCs. Además Wnt5a aumentaba la habilidad de las HSCs de mantenerse quiescentes en la fase G₀ del ciclo celular (Nemeth, Topol et al. 2007).

Recientemente se ha observado que la inhibición de GSK3 β promueve el injerto de células madre hematopoyéticas humanas expandidas *ex vivo*, modulando su expresión génica (Ko, Holmes et al. 2011).

4.2.2.3. Hedgehog

En mamíferos, la vía de señalización de Hedgehog (Hh) se inicia mediante la unión de uno de sus tres ligandos (Sonic Hh, Indian Hh y Desert Hh) al receptor de superficie celular Patched (Ptch). Tras la unión del ligando al receptor, se pierde la función inhibitoria de Ptch sobre Smoothed (Smo), efector positivo transmembrana, y esto resulta en la modulación de la actividad de tres factores de transcripción, Gli1, Gli2, Gli3.

Numerosos estudios han sugerido que la señalización de Hh juega un papel importante en el mantenimiento y diferenciación de las HSCs. Inicialmente se observó que los ligandos Hh inducían la expansión de HSCs humanas *in vitro* (Bhardwaj, Murdoch et al. 2001) y que las HSCs con una elevada activación de Hh, presentaban un aumento de proliferación que resultaba en un agotamiento de las reservas de HSCs (Trowbridge, Scott et al. 2006). Sin embargo, recientemente se ha observado una pérdida en la función de las HSCs tras la delección de Smo (Zhao, Chen et al. 2009). Dos estudios recientes han reportado que la señalización de Hh es dispensable en la hematopoyesis adulta (Gao, Graves et al. 2009; Hofmann, Stover et al. 2009). Aunque Smo parezca no ser necesario para la función autónoma de las HSCs murinas, es posible que Hh pueda influir en la hematopoyesis a través de interacciones de señalización complejas entre las HSCs y el nicho.

5. VÍA DE NOTCH

La vía de Notch es un mecanismo conservado a lo largo de la evolución que participa en la regulación de las decisiones de diferentes tipos de progenitores, tanto en organismos vertebrados como invertebrados. La estructura de los ligandos de la vía de Notch, los receptores y las moléculas que median la transducción de las señales, está muy conservada a lo largo de la evolución.

La vía de Notch está involucrada en múltiples procesos del desarrollo como la neurogénesis, miogénesis, la formación de las alas, el desarrollo de los ojos y la oogénesis. Notch es una proteína que tiene su función en la superficie celular donde

recibe las señales extracelulares pero también en el núcleo donde regula la expresión génica.

5.1. Componentes de la vía de Notch

La vía de Notch está formada por ligandos tipo Delta, receptores tipo Notch y el factor de transcripción de la familia CBF1/Su(H)/LAG1 (CSL).

Los receptores Notch son proteínas transmembrana de un solo paso conservados en la evolución. Estos receptores están formados por un dominio extracelular con múltiples repeticiones en tándem de EGF (*Epidermal Growth Factor*), requeridas para la unión del ligando, y un dominio intracelular que contiene un dominio RAM y repeticiones de ANK, para la transducción de señales. A partir de la caracterización del gen Notch en *Drosophila*, cuatro tipos de receptores Notch (Notch-1, -2, -3 y -4) y cinco ligandos (Jagged1 y 2, y Delta-like1, 3 y 4) han sido identificados en mamíferos. Los ligandos tienen un dominio característico DSL (Delta, Serrate y Lag-2) que es la unidad mínima esencial para la unión y la activación de los receptores Notch. Jagged1 y Jagged2 contienen repeticiones EGF adicionales y una región rica en cisteínas, absentas en los ligandos Delta (Lai 2004).

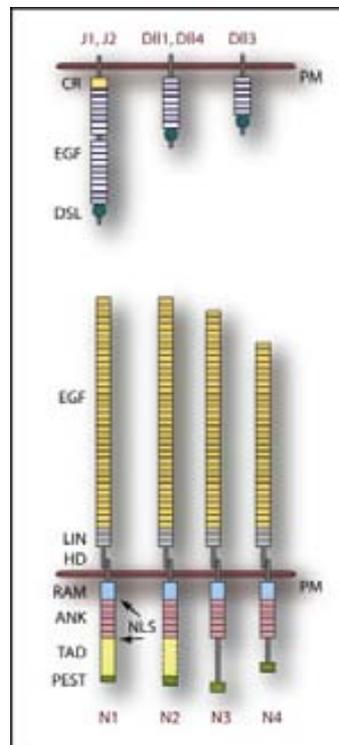


Figura 8. Ligandos y receptores de la vía de Notch. Se conocen cinco ligandos de Notch Jagged1 (J1), Jagged2 (J2), Delta-like1 (Dll1), Delta-like3 (Dll3), and Delta-like4 (Dll4); y cuatro receptores Notch (Notch1–Notch4; N1–N4) (Radtke, Fasnacht et al. 2010).

La señalización de Notch se inicia tras el contacto físico entre el ligando y el receptor, lo que provoca dos cortes sucesivos del receptor. El primer corte está mediado por

una metaloproteasa de la familia ADAM. Después, el complejo multiproteico γ -secretasa formado por las presenelinas (PS) 1 y 2, nicastrin, APH1 y PEN, dirige el segundo corte en el dominio transmembrana. El corte libera el dominio intracelular de los receptores Notch (NICD) que inicia la cascada de transducción de señales. NICD es translocado al núcleo donde se une al represor transcripcional CBF-1 o CSL, convirtiéndolo en un activador transcripcional a través del desplazamiento de complejos de co-represores y reclutando co-activadores como las proteínas tipo Mastermind (MAML). Iniciándose así la activación de la expresión de los genes diana de la vía de Notch.

Los genes diana de la vía de Notch mejor caracterizados son Hairy y Enhancer de Split (Hes) y la familia Hrt de factores de transcripción relacionados con Hes. Existen siete genes Hes (Hes1-7) en mamíferos, pero sólo Hes1, Hes5, Hes7, Hrt1/Herp2 y Hrt2/Herp1 están activados por Notch (Ohishi, Katayama et al. 2003).

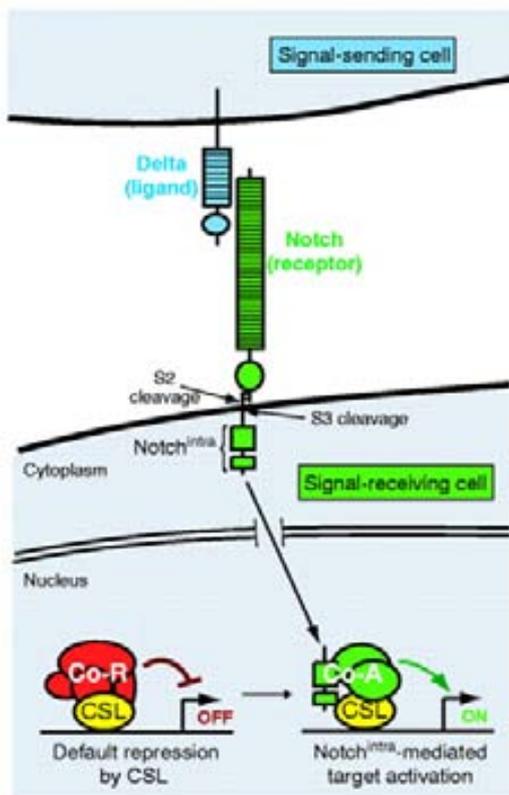


Figura 9. Señalización a través de la vía de Notch. El ligando y el receptor son proteínas transmembrana con dominios extracelulares. La activación de Notch a través de su ligando induce dos cortes en el receptor (S2 y S3). El corte S3 libera el dominio intracelular (NICD) que es traslocado al núcleo. El complejo represor CLS es desplazado por complejo activador que contiene NICD y media la activación de la expresión de las dianas de Notch. En ausencia de NICD, CSL se asocia al complejo co-represor, que de forma activa reprime la transcripción de los genes diana de Notch (Lai 2004).

La vía de Notch está regulada en múltiples niveles. El primer nivel de regulación es la restricción de la señalización a determinados compartimentos anatómicos, y la expresión de ligandos y receptores de Notch en determinados tipos celulares en condiciones específicas. La señalización de Notch también puede ser modulada mediante modificaciones a nivel extracelular e intracelular. Por ejemplo, la habilidad de los ligandos Jagged para dirigir la señalización de Notch depende del estado de

glicosilación del dominio extracelular de Notch. Las proteínas Fringe son glicosiltransferasas que añaden residuos de N-Acetilglucosamina o O-fucosa a determinadas repeticiones EGF de los receptores Notch. Estos receptores señalizan preferentemente mediante ligandos Delta, quedando inhibida la señalización mediante Jagged (Bruckner, Perez et al. 2000; Moloney, Panin et al. 2000). Algunas proteínas intracelulares como Deltex o Mastermind pueden unirse a las repeticiones ANK modulando de forma positiva la señalización de Notch (Matsuno, Diederich et al. 1995; Wu, Aster et al. 2000). Numb, es una proteína de unión a membrana que puede inhibir la señalización de Notch uniéndose directamente a NICD (Guo, Jan et al. 1996). Por último, es posible que los receptores Notch transmitan la señal a través de vías no canónicas independientes de CSL/RBP-Jk y MAMs. Los ligandos de Notch de la vía no canónica son proteínas secretadas o de membrana, deficientes en el motivo esencial DSL pero la mayoría contienen dominios EGF (D'Souza, Meloty-Kapella et al. 2010).

5.2. Vía de Notch en la hematopoyesis

Los estudios realizados en *Drosophila* han sugerido que Notch juega un papel muy importante en el automantenimiento y diferenciación de las células madre y progenitores hematopoyéticos (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999). En mamíferos se ha observado que Notch es esencial en la generación de HSCs en el desarrollo fetal (Kumano, Chiba et al. 2003), sin embargo el papel de Notch en HSCs adultas está en controversia. Estudios realizados *in vitro* sugieren que Notch juega un papel en el mantenimiento de las HSCs mientras que los resultados obtenidos *in vivo*, sugieren que la vía de Notch es indispensable para el mantenimiento de HSCs adultas en condiciones de homeostasis hematopoyética (Mancini, Mantei et al. 2005; Maillard, Koch et al. 2008) pero no durante la regeneración de la médula ósea tras daño medular.

Durante el desarrollo hematopoyético, los tejidos hematopoyéticos expresan diferentes moléculas de Notch. Las células hematopoyéticas expresan receptores de la familia de Notch (Notch1, 2, 3 y 4) mientras que los ligandos (Delta y Jagged) están expresados en diversos tipos celulares del estroma medular. En células humanas hematopoyéticas inmaduras CD34⁺, se detectaron bajos niveles de Notch1 y 2 (Walker, Carlson et al. 2001) mientras que en células de linaje mielóide como los granulocitos se detectaron altos niveles de Notch1 y 2 (Ohishi, Varnum-Finney et al. 2000). En tipos celulares hematopoyéticos más comprometidos, Notch1 está expresado preferentemente en timocitos aunque de forma no uniforme, dependiendo del grado de diferenciación.

También se ha detectado expresión en macrófagos y en progenitores eritroides de la médula ósea, Notch se expresa tanto en timocitos como en células B (Varnum-Finney, Purton et al. 1998; Felli, Maroder et al. 1999). Notch3 y 4 también están expresados en células hematopoyéticas. Notch3 está expresado en múltiples tipos de células hematopoyéticas maduras en ratón, y Notch4 se expresa de forma dominante en células endoteliales pero también en macrófagos (Singh, Phillips et al. 2000).

En el nicho hematopoyético se ha observado expresión de los ligandos de Notch. Se ha detectado expresión de Jagged1 en células estromales de la médula ósea tanto en ratón como en humanos (Jones, May et al. 1998; Li, Milner et al. 1998; Varnum-Finney, Purton et al. 1998; Walker, Lynch et al. 1999; Karanu, Murdoch et al. 2000). Jagged-1 también está expresado en células hematopoyéticas como macrófagos, megacariocitos y mastocitos. Además, Jagged1 también se expresa en células mesenquimales CD146⁺ que pueden formar un nicho capaz de mantener células hematopoyéticas (Sacchetti, Funari et al. 2007). Delta-1 y -4 también se expresan en células estromales de la médula ósea en humanos así como Delta-1 también se expresa en células endoteliales de la vena umbilical (Karanu, Murdoch et al. 2000). Diversos estudios han demostrado que Jagged1 y Delta-1 están expresados en osteoblastos (Pereira, Delany et al. 2002; Calvi, Adams et al. 2003; Nobta, Tsukazaki et al. 2005; Weber, Forsythe et al. 2006; Kessler and Delany 2007). En ratones, se ha observado que Delta1 está expresado en otros componentes del nicho como en las células endoteliales (Butler, Nolan et al. 2010).

La expresión de ligandos o receptores de la vía de Notch no está directamente relacionada con la activación de la vía, sino que es el balance entre ligandos y receptores lo que dirige la activación de la vía de Notch (Heitzler and Simpson 1991; Washburn, Schweighoffer et al. 1997). Aunque los receptores de Notch se expresan en HSCs y su descendencia, y los ligandos se expresan en células de los nichos medulares, los estudios de inhibición o delección de los diferentes componentes de la vía de Notch, no han demostrado de forma convincente un efecto *in vivo* de la señalización de Notch en el automantenimiento y diferenciación de las HSCs. Por un lado, mediante el uso del sistema Cre-LoxP, se ha observado que la inactivación del gen de Jagged1 en progenitores hematopoyéticos y células estromales de la médula ósea, no afectaba al automantenimiento y diferenciación de las HSCs (Mancini, Mantei et al. 2005). Además, HSCs deficientes en Notch1 eran capaces de reconstituir ratones con células estromales con Jagged1 inactivado, incluso en condiciones de reconstitución competitiva. Estos resultados muestran que la señalización de Notch1 mediada por Jagged1 es dispensable para el automantenimiento y diferenciación de

las HSCs, pero no se puede excluir la posibilidad de que otros ligandos o receptores de Notch estén substituyendo la función de Notch1 y Jagged1 en este modelo condicional de ratón (Mancini, Mantei et al. 2005). Por otro lado, los estudios utilizando dominantes negativos de Mastermind o RBP/j han mostrado una reconstitución estable de huéspedes irradiados con frecuencias normales de LT-HSCs, lo que también sugiere que la señalización de Notch no es esencial para el mantenimiento de las HSCs (Maillard, Koch et al. 2008).

También se ha propuesto que la señalización de Notch podría estar actuando en condiciones no homeostáticas *in vivo*. Recientemente se ha descrito en ratón una inhibición dependiente de Notch2 de la diferenciación mieloide, y un aumento de la generación de MPP y LT-HSC con capacidad de repoblación en condiciones de estrés hematopoyético *in vivo* (Varnum-Finney, Halasz et al. 2011). Estos efectos no eran observados en condiciones de homeostasia. Además, este estudio reveló diferentes funciones de Notch 1 y 2, modulando el mantenimiento y la diferenciación de MPP y HSCs, tanto *in vivo* como *in vitro*. También se observó que Jagged1 y Delta1 son activados de forma selectiva por Notch2 pero no por Notch1 en HSCs quiescentes con fenotipo SP LSK, para inhibir la diferenciación y promover la generación de MPP (Varnum-Finney, Halasz et al. 2011).

Aunque existen controversias en si Notch es dispensable en la hematopoyesis en condiciones fisiológicas, su potencial en la expansión de HSCs *in vitro* ha sido ampliamente estudiado incluso para ser aplicado en protocolos clínicos. Existen experimentos que sugieren que la señalización de Notch aumenta el automantenimiento y bloquea la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos (Stier, Cheng et al. 2002; Kunisato, Chiba et al. 2003). Se ha observado en estudios *ex vivo*, que la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa del dominio intracelular de Notch1 o Hes1, o el co-cultivo de HSCs con ligandos recombinantes o células que expresan ligandos de Notch; inhibe la diferenciación mieloide y la generación de MPP con capacidad de reconstitución (Varnum-Finney, Xu et al. 2000; Stier, Cheng et al. 2002; Kunisato, Chiba et al. 2003; Yu, Alder et al. 2006; Butler, Nolan et al. 2010). Varios grupos han mostrado que los miembros de la familia de ligandos de Notch, Delta y Jagged, tienen la capacidad de expandir HSC humanas y murinas *in vitro* (Varnum-Finney, Brashem-Stein et al. 2003; Delaney, Varnum-Finney et al. 2005). La adición de la forma soluble de Jagged1 a cultivos de células de sangre de cordón umbilical Lin⁻CD34⁺CD38⁻, permitía la expansión de los progenitores sin afectar su capacidad de repoblación en un modelo de ratón NOD/SCID (Karanu, Murdoch et al. 2000).

Además, se ha observado que las formas solubles o inmovilizadas de DL1, aumentan las células hematopoyéticas inmaduras CD34⁺ y CD34⁺CD38⁻ (Ohishi, Varnum-Finney et al. 2002).

Los estudios *ex vivo* sugieren que las decisiones celulares inducidas por la activación de la vía de Notch son el resultado de diferencias cuantitativas. Han sido descritos efectos de DL1 dosis dependiente, en la capacidad de repoblación de células de sangre de cordón umbilical (Delaney, Varnum-Finney et al. 2005). El cultivo *ex vivo* de HSCs/MPPs de médula ósea con diferentes densidades de ligandos de Notch purificados, mostró que tanto niveles altos como bajos de señalización de Notch, inhibían la diferenciación mieloide y promovían la generación de MPPs, pero sólo niveles bajos de Notch promovían la generación de células B después del co-cultivo con células OP9. Niveles altos de Notch inhibían la generación de precursores B y promovían la generación de precursores T en ratón (Dallas, Varnum-Finney et al. 2005). Estudios *ex vivo* también han sugerido que los receptores Notch tienen diferentes capacidades de activación transcripcional (Ong, Cheng et al. 2006). Esta activación selectiva puede ser el resultado de la interacción con diferentes ligandos, como la activación selectiva de Notch2 por los ligandos Jagged bajo la presencia de Fringe, una glucosiltransferasa que media la activación diferencial de receptores por ligandos específicos en mamíferos (Hicks, Johnston et al. 2000; Yang, Nichols et al. 2005; Visan, Yuan et al. 2006; Okajima, Matsuura et al. 2008).

La señalización de Notch regula varias decisiones de linaje. Existen numerosos estudios que han demostrado que la vía de Notch juega un papel esencial en la especificación a linaje linfóide T. Notch1 ha sido establecido como uno de los genes críticos en la especificación de los progenitores hematopoyéticos al linaje T (Pui, Allman et al. 1999; Wilson, MacDonald et al. 2001; Feyerabend, Terszowski et al. 2009). Existen claras evidencias de que la activación de la vía de Notch promueve la diferenciación a células T inhibiendo la diferenciación a células B (Han, Tanigaki et al. 2002). La activación constitutiva de NICD en progenitores hematopoyéticos de médula ósea, inhibía la generación de células B promoviendo la generación extratímica de células T inmaduras (Pui, Allman et al. 1999). Además, células estromales de médula ósea que sobreexpresaban DL1 o DL4, tenían la capacidad de mantener en estadios tempranos el desarrollo de células T, inhibiendo la generación *in vitro* de células B a partir de progenitores hematopoyéticos (Jaleco, Neves et al. 2001; Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002; Hozumi, Negishi et al. 2004).

Notch también participa en estadios avanzados de la diferenciación de las células T ya que los ligandos de Notch inducen señales específicas durante el desarrollo y la

maduración linfoide. Se ha observado que los ligandos Delta1 y 4 están involucrados en la especificación a células B y T, y en la maduración periférica de los linfocitos T mientras que los ligandos Jagged1 y 2 están involucrados en el desarrollo de linfocitos $\gamma\delta$ y células NK, y en la diferenciación periférica de las células T (de La Coste and Freitas 2006). Aunque Delta4 es esencial en estadios tempranos de la diferenciación de las células T *in vivo*, tanto Delta1 y 4, pero no Jagged1, son capaces de inducir la diferenciación a células T de progenitores hematopoyéticos *in vitro*, cuando son expresados por células estromales OP9 (Jaleco, Neves et al. 2001; Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002; Hozumi, Negishi et al. 2004; Lehar, Dooley et al. 2005). También se ha observado que la señalización de Notch participa en la decisión entre CD4⁺ y CD8⁺ de las células CD4⁺CD8⁺ ya que la expresión de NICD en timocitos, favorece la generación de células CD8⁺ y la consecuente disminución de las células CD4⁺ (Robey, Chang et al. 1996) (Van Coppenolle, Vanhee et al. 2012).

Notch también juega un papel en la mielopoyesis. Los primeros estudios en los que se utilizaron líneas celulares mieloides revelaron que la activación de Notch 1 y 2 podía inhibir la diferenciación mieloide dependiendo del cóctel de citoquinas utilizado (Milner, Bigas et al. 1996; Bigas, Martin et al. 1998). Posteriormente, se obtuvieron resultados similares ya que el co-cultivo de células LSK con células estromales OP9 que expresaban Delta1, inhibía la diferenciación mieloide de los progenitores hematopoyéticos (de Pooter, Schmitt et al. 2006). Por el contrario, el análisis de la inhibición condicional de la expresión de diferentes alelos de Notch, reveló que la actividad de Notch sólo era necesaria para el desarrollo de células T y B *in vivo* (Radtke, Wilson et al. 1999). Estos resultados sugieren que Notch no es esencial en la generación de células mieloides pero su actividad es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis mieloide *in vivo*.

PRESENTACIÓN

El trabajo que se presenta en esta tesis ha sido realizado en el laboratorio de *Teràpia Cel·lular i Gènica*, del *Banc de Sang i Teixits* ubicado en el *Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón*.

El grupo ha centrado su trayectoria de investigación en el área de la terapia celular y la inmunología. Las principales líneas de investigación han consistido en estudiar posibles marcadores que permitan identificar la población de progenitores hematopoyéticos humanos con mayor capacidad de reconstitución del sistema hematopoyético, y en desarrollar protocolos de expansión que permitan obtener un gran número de progenitores hematopoyéticos humanos.

En la actualidad el trasplante de médula ósea es el tratamiento de elección para numerosas neoplasias hematológicas y para algunas inmunodeficiencias severas. La presencia de precursores y de células maduras de distintos linajes en el injerto resulta beneficiosa para luchar contra las infecciones post-trasplante e incluso en la erradicación del tumor. Sin embargo, la recuperación definitiva de la hematopoyesis depende de la actividad de los progenitores más inmaduros.

La sangre de cordón umbilical se ha convertido en una fuente importante de células madre hematopoyéticas para su uso en el tratamiento de enfermedades hematológicas en adultos, debido a su disponibilidad, a que permite una mayor disparidad en la compatibilidad de HLA, y presenta una menor incidencia de enfermedad de injerto contra el huésped. Sin embargo, la mayor limitación para su uso, es que presenta un bajo número de progenitores hematopoyéticos. Dada la relación entre la cantidad de células madre infundidas y el éxito del procedimiento, es necesario el desarrollo de métodos para inducir la proliferación de estos progenitores. En los últimos años, la infusión de más de una unidad de cordón umbilical y la expansión de progenitores de sangre de cordón umbilical han sido las aproximaciones más prometedoras para aumentar la dosis de progenitores trasplantados y mejorar la eficiencia del injerto (Tung, Parmar et al. 2010).

La expansión de células madre hematopoyéticas requiere un paso previo de identificación y purificación. Se ha visto que la caracterización fenotípica que se ha venido utilizando (Lin⁻CD34⁺), puede resultar inapropiada al existir células con capacidad de regeneración del sistema hematopoyético que no expresan CD34, o el caso contrario, células con un fenotipo característico pero sin esa capacidad. Por lo que es necesario encontrar marcadores fenotípicos que permitan enriquecer la población de progenitores hematopoyéticos.

Para conseguir la expansión de progenitores, inicialmente se utilizaron diferentes combinaciones de citocinas (IL-6, SCF, TPO y FLT-3). Aunque con estos tratamientos se inducía una intensa proliferación, ésta se veía acompañada de diferenciación.

El estroma medular, además de producir factores solubles, favorece el contacto celular dando lugar a interacciones que podrían inducir proliferación sin inducir diferenciación.

La vía de Notch es especialmente interesante pues las células progenitoras hematopoyéticas expresan receptores de la familia de Notch, mientras que sus ligandos están expresados en diversos tipos celulares del estroma.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Identificación de la población de células madre y progenitores hematopoyéticos humanos con mayor capacidad de automantenimiento y de reconstitución del sistema hematopoyético:
 - determinar la existencia de la población de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ en sangre de cordón umbilical.
 - caracterizar su capacidad de automantenimiento y reconstitución del sistema hematopoyético.

2. Establecer las condiciones de cultivo que más favorezcan la expansión *in vitro* de progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺CD38⁻, reduciendo al máximo los procesos de diferenciación, a través de:
 - el co-cultivo de progenitores hematopoyéticos con células estromales.
 - la activación de la vía de Notch en progenitores en cultivo.
 - cambios en el patrón de expresión génica de los progenitores mediante la adición de moduladores epigenéticos como el ácido valproico.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS

Los progenitores hematopoyéticos fueron obtenidos de dos fuentes diferentes, la sangre de cordón umbilical y la sangre periférica movilizada.

La sangre de cordón umbilical es la fuente más enriquecida en progenitores hematopoyéticos y fue proporcionada por el *Banc de Sang de Cordó* del *Banc de Sang i Teixits* de Barcelona de acuerdo con el procedimiento aprobado.

Una vez en el laboratorio, fue procesada para la obtención de células mononucleares mediante gradiente de densidad, separación inmunomagnética de las células mononucleares CD34⁺ y separación por citometría de flujo de las subpoblaciones de progenitores hematopoyéticos.

La selección de células CD34⁺ de sangre periférica movilizada mediante aféresis fue realizada por el *Banc de Sang i Teixits* de Barcelona de acuerdo con el procedimiento aprobado. Una vez realizado el procedimiento clínico, los desechos celulares fueron enviados a nuestro laboratorio donde se realizaron lavados para obtener las células CD34⁺ restantes. Estas células fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas hasta su posterior uso.

1.1. Separación de células mononucleares de sangre de cordón umbilical mediante centrifugación en gradiente de densidad

1. Diluir la sangre de cordón con tampón fosfato salino (Dulbecco's PBS 1x, de PAA Laboratories GmbH) sin calcio ni magnesio hasta un volumen final de 300 ml.
2. En tubos de 50 ml, añadir 38 ml de sangre sobre 12 ml de Lympholyte (1.077 g/ml de densidad, Cedarlane) de forma suave.
3. Centrifugar los tubos a 800 x g durante 30 minutos sin freno.
4. Recoger el anillo de células mononucleares con una pipeta Pasteur de plástico.
5. Lavar con PBS 1x para eliminar los posibles restos de Ficoll y plaquetas a 650 x g durante 10 minutos y a temperatura ambiente.
6. Lavar tres veces con PBS 1x a 290 x g durante 5 minutos y a 4°C.

1.2. Separación inmunomagnética de células mononucleares CD34⁺ de sangre de cordón umbilical

Una vez aisladas las células mononucleares de la sangre de cordón umbilical, se separó la fracción CD34⁺ mediante una columna de separación magnética. Para ello se utilizó el “*Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, human*” de Miltenyi Biotec.

1. Resuspender las células mononucleares en 434 µl de tampón de separación (PBS 1x + 0.5% albúmina humana (Grifols) + 2 mM EDTA (GIBCO)) por cada 100 millones de células mononucleares.
2. Añadir 33 µl de *Blocking Solution* y 33 µl de *CD34 Microbeads*, e incubar durante 30 minutos a 4°C.
3. Lavar las células con tampón de separación. Resuspender en 500 µl de tampón de separación por cada 100 millones de células mononucleares.
4. Introducir la columna en el campo magnético del separador (imán).
5. Equilibrar la columna con 3 ml de tampón de separación.
6. Filtrar las células con un filtro de 30 µm para eliminar posibles agregados celulares que colapsarían la columna.
7. Añadir el volumen de células a la columna unida al soporte.
8. Lavar tres veces con 5 ml de tampón de separación, obteniendo la fracción celular CD34⁺.
9. Retirar la columna del soporte y añadir 5 ml de tampón de separación.
10. Introducir el émbolo en la columna y eluir la fracción celular CD34⁺.
11. Lavar las células con tampón de separación y resuspender en 1 ml de medio RPMI (PAA Laboratories GmbH) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FCS) Gold (PAA Laboratories GmbH).
12. Conservar a 4°C hasta la separación por citometría de flujo.

1.3. Separación de células CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical por citometría de flujo

La fracción CD34⁺ se enriqueció en progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ mediante separación celular por citometría de flujo en un separador celular FACSAria (BD).

1. Lavar las células y resuspender en 100 µl de tampón de separación.
2. Añadir el anticuerpo biotinilado.
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar con 1 ml de tampón de separación.

4. Resuspender en 100 µl de tampón de separación.
5. Añadir la estreptavidina, los anticuerpos específicos y los controles de isotipo fluorocromados.
Incubar 15 minutos a 4°C en la oscuridad.
6. Lavar con 1 ml de tampón de separación.
7. Resuspender en 300-400 µl de tampón de separación.
8. Adquirir y separar las muestras en el citómetro separador FACSAria.

Panel de anticuerpos utilizados para el marcaje:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10 ⁶ células	Casa comercial
CD34	PerCP	M IgG1,k	8G12	0.125	BD
CD38	FITC	M IgG1,k	HIT2	0.1	BD
CD135	PE	M IgG1,k	4G8	0.1	BD
CD150	Biotina	M IgG1,k	A12(7D4)	0.5	BioLegend
Estreptavidina	Alexa 647	-	-	0.5	Invitrogen

1.4. Separación de células Lin⁻CD34⁺ y Lin⁻CD34⁺CD150⁺ por citometría de flujo de sangre periférica movilizada

Las muestras de selecciones de células CD34⁺ obtenidas mediante aféresis de sangre periférica movilizada, fueron descongeladas para el posterior marcaje y separación por citometría de flujo en un separador celular FACSAria (BD). El procedimiento de marcaje utilizado fue el detallado en el punto 1.2 del material y métodos.

El cóctel de linaje está formado por los anticuerpos: CD3 (SK7) que marca linfocitos T; CD14 (3G8) que marca monocitos; CD16 (SJ25C1) que marca neutrófilos, macrófagos y células NK; CD19 (L27) que marca linfocitos B; CD20 (MφP9) que marca células B maduras y en desarrollo; y CD56 (NCAM16.2) que marca células NK. Los anteriores anticuerpos marcan células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos, y además a este cóctel se añadieron los anticuerpos: CD15 que marca eosinófilos y neutrófilos, CD41 que marca plaquetas y megacariocitos, y CD235a que marca eritrocitos en desarrollo y maduros.

Panel de anticuerpos utilizados para el marcaje:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g por } 10^6$ células	Casa comercial
<i>Lineage Cocktail 1</i>	FITC	M IgG1,k M IgG2b,k	-	0.1	BD
CD15	FITC	M IgM,k	HI98	0.1	BD
CD34	PE	M IgG1,k	HPCA-2	0.1	BD
CD41	FITC	M IgG1,k	MEM-06	2	Immunotools
CD150	Biotina	M IgG1,k	A12(7D4)	0.5	BioLegend
CD235a	FITC	M IgG1,k	AME-1	2	Immunotools
Estreptavidina	Alexa 647	-	-	0.5	Invitrogen

2. LÍNEAS CELULARES ESTROMALES OP9

Las líneas celulares estromales OP9 fueron amablemente cedidas por el laboratorio del Dr. Hergen Spits, del departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Amsterdam, Holanda.

La línea celular OP9 fue establecida a partir de la médula ósea de un ratón neonato que no produce M-CSF funcional. Esta línea celular permite el estudio de la hematopoyesis y favorece la supervivencia, proliferación y mantenimiento de las células madre hematopoyéticas (Nakano, Kodama et al. 1994).

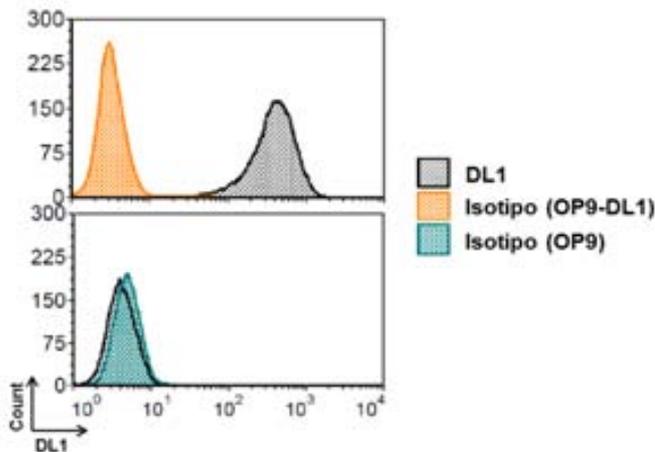
La línea celular estromal de ratón que expresa la forma humana de Delta-like 1 (OP9 DL1), uno de los ligandos de la vía de Notch, permite el cultivo de los progenitores en condiciones donde la vía está activada. Para los experimentos descritos en esta tesis, se comprobaron previamente por citometría de flujo, los niveles de expresión de DL1 en las líneas celulares OP9 y OP9-DL1 mediante el uso del anticuerpo DL1-PE (MHD1-314, Biolegend) (figura 10a). Además, también se comprobó que la línea celular OP9-DL1 era capaz de inducir la activación de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos cultivados durante 48 h con las líneas OP9, mediante el análisis por RT-PCR de la expresión de Hes1, uno de los genes diana de la vía de Notch (figura 10b).

Las líneas celulares se mantuvieron en cultivo a 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad, en medio MEMα (GIBCO) suplementado con:

- antibiótico-antimicótico (GIBCO):
 - 100 UI/ml de penicilina G
 - 100 µg/ml de estreptomina
 - 250 ng/ml de anfotericina B
- 20% de suero fetal bovino (FCS) Gold (PAA Laboratories GmbH)

Para el mantenimiento de las líneas celulares OP9 y OP9-DL1, el medio se renovaba cada 2-3 días. Éstas eran tripsinizadas justo antes de que alcanzaran la confluencia. Previo a la adición de la Tripsina, las células eran lavadas con PBS para eliminar los restos de suero. Después se añadía la Tripsina/EDTA (PAA Laboratories GmbH) durante 3-5 minutos y su actividad era inhibida con medio con suero. Posteriormente, las líneas eran cultivadas a una dosis inicial de 2000 células por cm².

A



B

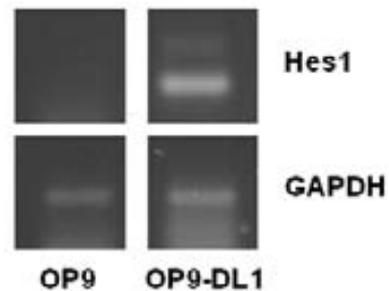


Figura 10. A) Análisis de la expresión de DL1 en células estromales OP9-DL1 y OP9 (*imagen cedida por Rebeca Sánchez*). B) Análisis de la expresión de Hes1 mediante RT-PCR en progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical cultivados durante dos días con células estromales OP9 y OP9-DL1.

3. CARACTERIZACIÓN, EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

3.1. Ensayos de formación de colonias en metilcelulosa

Los ensayos de formación de colonias permiten la cuantificación de progenitores hematopoyéticos multipotenciales y progenitores restringidos a un linaje concreto de una determinada población.

Los medios con metilcelulosa permiten la diferenciación y proliferación de las células progenitoras, y la identificación de clones de células que provienen de una única célula. Así, es posible evaluar la capacidad de diferenciación multipotencial de una población de progenitores hematopoyéticos denominados, en este tipo de ensayos, unidades o células formadoras de colonias (CFU o CFC). Las colonias obtenidas en los ensayos de formación de colonias se pueden clasificar según el color y la morfología de las células que las forman.

El ensayo se inició con la purificación de las células progenitoras de la sangre de cordón (según el punto 1 de material y métodos). Por triplicado para cada población de estudio, se resuspendieron las células en 100 µl de medio IMDM (PAA Laboratories GMBH) suplementado con un 2% de suero Hyclone. Los 100 µl se añadieron sobre 1 ml de medio IMDM con metilcelulosa (Methocult GF H4434, Stem Cell Technologies) que contiene suero bovino fetal, albúmina sérica bovina, 2-mercaptoetanol, SCF, GM-CSF, IL-3, EPO.

El medio de metilcelulosa que contenía las células, se repartió en placas de 35 mm con el fondo rallado. Tras 14 o 15 días de cultivo al 100% de humedad, a 37°C y 5% de CO₂, se contó el número de colonias de las placas.

3.2. Ensayos de diferenciación celular

Las condiciones de diferenciación hacia los diferentes linajes hematopoyéticos se basaron en un co-cultivo de progenitores hematopoyéticos y células estromales OP9 en medios de diferenciación hacia los diferentes linajes hematopoyéticos.

El medio de diferenciación estaba compuesto por medio MEMα (GIBCO) suplementado con:

- 20% de suero Fetalclone I (Hyclone)
- Antibiótico-antimicótico (GIBCO):
- Citoquinas como SCF (Stem Cell Factor) (Immunotools), TPO (Trombopoyetina) (Immunotools), Flt3L (ligando del receptor Flt3/Flk-2) (Immunotools), IL-7 (Immunotools), IL-15 (Prospec)

Las condiciones de diferenciación hacia los diferentes linajes hematopoyéticos utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

Condiciones de diferenciación	Concentración de citoquinas (ng/ml)					Tipo de estroma	Tiempo de cultivo (días)
	SCF	TPO	Flt3L	IL-15	IL-7		
Mieloide	10	10	10	-	-	OP9	21
Células NK	10	10	10	10	-	OP9	21
Células B	10	10	10	-	10	OP9	21
Células T	-	-	5	-	5	OP9-DL1	28

El ensayo se inició con el tratamiento con Mitomicina C (Sigma) de las células estromales para evitar su división durante el co-cultivo de diferenciación con los progenitores hematopoyéticos. Posteriormente se separaron y añadieron los progenitores hematopoyéticos que fueron cultivados siguiendo las condiciones de diferenciación descritas en la tabla anterior.

Tratamiento con Mitomicina C

1. Sembrar las células estromales OP9 Neo y OP9-DL1 en placas de 10 cm a una concentración de 5000 células por cm² en medio MEM α suplementado con 20% de suero fetal bovino (FCS) Gold (PAA Laboratories GmbH).
Dejar crecer las células hasta que lleguen a confluencia a 100% de humedad, 37°C y 5% de CO₂.
2. Una vez en confluencia, retirar el medio de la placa de 10 cm y añadir 5 ml de medio MEM α + 20% FCS previamente atemperado, y 100 μ l de la solución de mitomicina (0.5 mg/ml).
3. Incubar las células con mitomicina durante 6 horas a 100% de humedad, 37°C y 5% de CO₂.
4. Lavar la placa 3 veces con PBS 1x.
5. Tripsinizar y sembrar 20000 células por cm² en pocillos de una placa de 24 en medio MEM α suplementado con 20% de suero fetal bovino.
6. Incubar durante la noche y al día siguiente iniciar el ensayo de diferenciación de progenitores hematopoyéticos.

Co-cultivo de diferenciación celular

1. Separar las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical (siguiendo el procedimiento explicado en el punto 1 de la sección de material y métodos).
2. Cultivar de 100-500 células de cada población en 500 µl de medio de diferenciación a linaje mieloide, células NK, linaje linfocito B durante 21 días; y linaje linfocito T durante 28 días.
3. Cambiar 250 µl de medio una vez por semana durante el cultivo.
4. Analizar la capacidad de diferenciación hacia los diferentes linajes hematopoyéticos por citometría de flujo (FACSCalibur, BD).

3.3. Cultivos de expansión de progenitores hematopoyéticos

Los cultivos de expansión permiten evaluar la capacidad de proliferación de los progenitores hematopoyéticos en condiciones de cultivo que permiten su expansión reduciendo los procesos de diferenciación.

3.3.1. Cultivos de expansión sin estroma

Los progenitores hematopoyéticos fueron cultivados en placas de 96 pocillos con 200 µl de medio HP01 (MacoPharma) suplementado con antibiótico-antimicótico y 50 ng/ml de SCF, TPO, Flt3L y IL-6. Una vez a la semana se renovaba el medio quitando y añadiendo 100 µl de medio nuevo.

Los ensayos de expansión clonal se iniciaron a partir de una célula aislada mediante separación por citometría de flujo, cultivada durante siete semanas. A las 2, 4 y 7 semanas en cultivo, se identificaron aquellos pocillos en los que se observaba proliferación celular. Se consideraron pocillos positivos aquellos en los que el conteo celular superaba las 10 células por pocillo.

Los ensayos de expansión poblacional se iniciaron a partir de 50 células aisladas mediante separación por citometría de flujo, cultivadas durante dos semanas. A las dos semanas, la proliferación celular fue evaluada utilizando el colorante azul de tripano (0.4% de azul de tripano es suero fisiológico) y contando el número de células vivas (no incorporan el colorante).

3.3.2. Co-cultivos de expansión de progenitores hematopoyéticos con células estromales

Estos experimentos se realizaron para estudiar la influencia del estroma medular, la activación de la vía de Notch y el efecto del ácido valproico, en la expansión y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos a diferentes tiempos de cultivo.

Para ello, se co-cultivaron los progenitores con células OP9 en presencia de las citoquinas SCF, TPO, Flt3L y ácido valproico (VPA).

El procedimiento seguido para establecer los ensayos de expansión se inició con el cultivo de las células estromales. Se sembraron células OP9, a una densidad celular de 5000 células por cm², en placas de 12 pocillos un día antes de que se iniciara el ensayo. Al día siguiente, se añadieron 10.000 células CD34⁺CD38⁻ (obtenidas siguiendo el procedimiento explicado en el punto 1 de la sección de material y métodos) al cultivo de OP9 establecido el día anterior. Durante el ensayo, el co-cultivo se realizó en medio MEM α suplementado con:

- 20% de suero Fetalclone I (Hyclone)
- Antibiótico-antimicótico (GIBCO):
- Citoquinas como SCF (Stem Cell Factor) (Immunotools), TPO (Trombopoyetina) (Immunotools), Flt3L (ligando del receptor Flt3/Flk-2) (Immunotools) a 10 ng/ml; y ácido valproico (SANOFI) a 75 y 100 μ g/ml

Se realizaron cambios de medio cada dos días de cultivo quitando y añadiendo 250 μ l de medio nuevo, y cambios de estroma cada 4 días. Para los cambios de estroma se sembraron células OP9, a una densidad celular de 5000 células por cm² en placas de 12 pocillos, un día antes de que se realizara el cambio de estroma. Al día siguiente, se recogió el contenido celular del pocillo y se pasó a través de un filtro de 30 μ m. Las células filtradas fueron cultivadas de nuevo sobre las células estromales sembradas el día anterior.

El análisis fenotípico por citometría de flujo se realizó a los 4, 6 y 9 días de cultivo tanto en el estudio del efecto del estroma y la activación de la vía de Notch, como en el estudio del efecto del ácido valproico sobre la expansión y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

4.1. Análisis fenotípico de progenitores hematopoyéticos de linaje (CMP, CLP, GMP Y MEP)

La caracterización fenotípica de las células expandidas *in vitro* se realizó mediante citometría de flujo multicolor utilizando cinco fluorocromos diferentes en el mismo panel de marcaje, analizados en un separador celular FACS Aria (BD).

La combinación de anticuerpos utilizada permitió el análisis de las diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos (Manz, Miyamoto et al. 2002) (figura 11):

- Progenitor común mieloide (CMP): $CD34^+CD38^+CD45RA^-CD123^+$
- Progenitor granulomonocítico (GMP): $CD34^+CD38^+CD45RA^+CD123^+$
- Progenitor megacariocítico-eritrocítico (MEP): $CD34^+CD38^+CD45RA^-CD123^-$
- Progenitor común linfoide (CLP): $CD34^+CD38^-CD7^+$

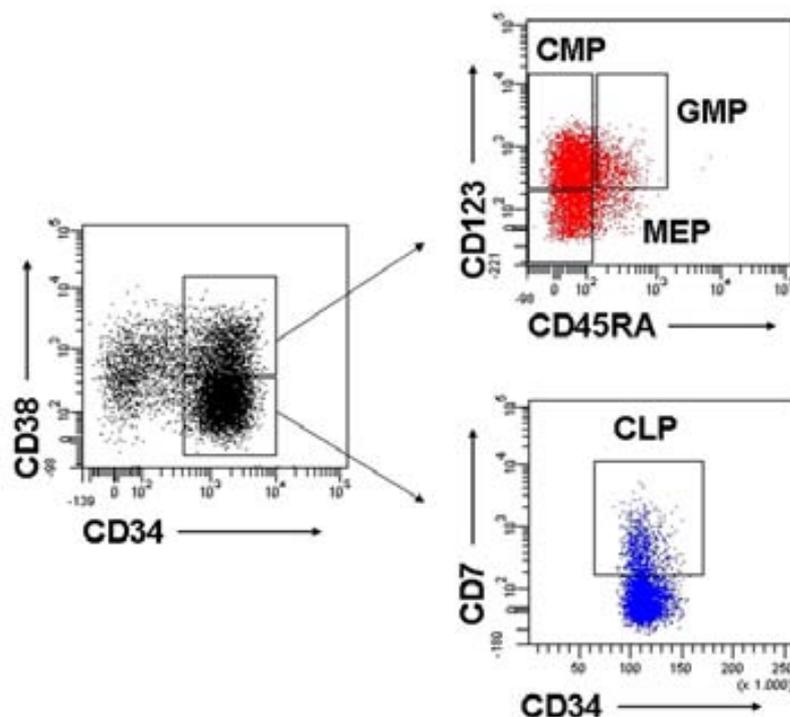


Figura 11. Esquema de la estrategia de gateo utilizada para el análisis de las poblaciones de progenitores hematopoyéticos CMP, GMP, MEP y CLP.

Panel de anticuerpos utilizados en el marcaje:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g por } 10^6$ células	Casa comercial
CD7	PE	M IgG2a,k	CD7-6B7	0.1	BioLegend
CD34	PerCP	M IgG1,k	8G12	0.25	BD
CD38	FITC	M IgG1,k	HIT2	0.1	BD
CD45RA	Biotina	M IgG2b,k	HI100	0.125	BioLegend
CD123	PE-Cy7	M IgG1,k	6H6	0.25	eBioscience
Estreptavidina	Alexa 405	-	-	0.5	Invitrogen

Marcaje de superficie directo con anticuerpo biotinilado:

1. Lavar las células con PBS 1x + BSA 1% (albúmina sérica bovina) + acida
sódica (NaN_3) 0,1% (PBA-azida).
Resuspender en 50 μl de PBA-azida.
2. Añadir el anticuerpo biotinilado.
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar con PBA-azida.
4. Resuspender en 50 μl de PBA-azida.
5. Añadir la estreptavidina, los anticuerpos específicos y los controles de isotipo
fluorocromados.
Incubar 30 minutos a 4°C en la oscuridad.
6. Lavar con PBA-azida.
7. Resuspender en 100 μl de PBA-azida.
8. Adquirir en el citómetro separador FACSAria.

4.2. Análisis fenotípico de poblaciones hematopoyéticas de células maduras (células mieloides, NK, B y T)

La caracterización fenotípica de las células progenitoras diferenciadas *in vitro* se realizó mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur de BD.

Se utilizaron cuatro combinaciones diferentes de anticuerpos para analizar la diferenciación hacia células maduras de los diversos linajes hematopoyéticos:

Combinación 1: CD8-FITC, CD3-PE, CD4-APC.

Combinación 2: CD56-FITC, CD19-PE, CD34-PerCP, CD10-APC.

Combinación 3: CD11b-PE, CD34-PerCP, CD33-APC.

Combinación 4: CD15-FITC, CD14-PE, CD34-PerCP.

La combinación de anticuerpos CD3, CD4 y CD8 se utilizó para analizar células de linaje linfocitario T; CD56 para células NK; CD10 y CD19 para linfocitos B; CD11b (neutrófilos y monocitos), CD33 (monocitos, granulocitos, mastocitos, progenitores mieloides), CD15 (eosinófilos y neutrófilos) y CD14 (monocitos) para diferentes tipos de células de linaje mieloides; y CD34 para progenitores hematopoyéticos.

Panel de anticuerpos utilizados en el marcaje:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	$\mu\text{g por } 10^6$ células	Casa comercial
CD3	PE	M IgG2a,k	HIT3a	0.1	BioLegend
CD4	APC	M IgG1,k	RPA-T4	0.1	BD
CD8	FITC	M IgG1,k	SK1	0.1	BD
CD10	APC	M IgG1,k	HI10a	0.1	BioLegend
CD11b	PE	M IgG1,k	ICRF44	0.1	BD
CD14	PE	M IgG2a,k	M5E2	0.1	BioLegend
CD15	FITC	M IgM, k	HI98	0.1	BD
CD19	PE	M IgG1,k	HIB19	0.1	BioLegend
CD33	APC	M IgG1,k	WM53	0.1	BioLegend
CD34	PerCP	M IgG1,k	8G12	0.25	BD
CD56	FITC	M IgG2b,k	NCAM16.2	0.1	BD

Marcaje de superficie directo:

1. Lavar las células con PBA-azida.
Resuspender en 50 μl de PBA-azida.
2. Añadir 1 μl de anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 (AbD Serotec) de ratón para bloquear los receptores Fc.
Añadir los anticuerpos específicos y los controles de isotipo fluorocromados.
Incubar 30 minutos a 4°C en la oscuridad.
3. Lavar con PBA-azida.
4. Resuspender en 100 μl de PBA-azida.
5. Adquirir en el citómetro separador FACSAria.

5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

Se analizó por RT-PCR, la expresión de Hes1 en progenitores hematopoyéticos cultivados con células estromales y ácido valproico.

Los progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD29⁻ fueron separados mediante citometría de flujo (FACS Aria) de las células estromales del cultivo. Una vez separados los progenitores, se extrajo el ARN que fue retrotranscrito a ADNc. Finalmente, se realizó la PCR utilizando *primers* específicos de Hes1 que no amplificaban ADN genómico.

Panel de anticuerpos utilizados en el marcaje:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10 ⁶ células	Casa comercial
CD29	Biotina	Hamster IgG	HM beta 1-1	0.025	AbD Serotec
CD34	APC	M IgG1,k	581	0.1	BD
Estreptavidina	PE	-	-	0.5	ImmunoTools

5.1. Extracción de ARN

RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells (QIAGEN)

Spin Protocol + RNase-Free DNase Set

1. Recoger las células (<10⁷ células).
2. Centrifugar 5 minutos a 300 x g. Eliminar completamente el sobrenadante.
3. Lisar las células adicionando 350 µl (<5*10⁶ de células) o 600 µl (5*10⁶ - 10⁷ de células) de *RLT Buffer* con β-mercaptoetanol. Resuspender con vórtex o pipeteando.
4. Homogeneizar la muestra. Agitar en el vórtex 1 minuto.
5. Añadir un volumen (350 - 600 µl) de alcohol al 70% al lisado celular y mezclar pipeteando.
6. Añadir 700 µl de la muestra (incluyendo precipitados si hay) en una *RNeasy MiniColumn* colocada en un tubo colector de 2 ml.
Centrifugar 15 segundos a 8000 x g. Descartar el eluido.
7. Añadir 350 µl de *RW1 Buffer* a la columna.
Centrifugar 15 segundos a 8000 x g para lavar. Descartar el eluido.
8. Añadir 10 µl del stock de *DNaseI* a 70 µl de *RDD Buffer*. Mezclar invirtiendo el tubo.

9. Añadir los 80 µl de *DNasal + RDD Buffer* directamente sobre la membrana de la columna. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Añadir 350 µl de *RW1 Buffer* a la columna.
Centrifugar 15 segundos a 8000 x g. Descartar el eluido.
11. Transferir la columna a un tubo colector nuevo.
Añadir 500 µl de *RPE Buffer* con etanol a la columna.
Centrifugar 15 segundos a 8000 x g. Descartar el eluido.
12. Añadir 500 µl de *RPE Buffer* a la columna.
Centrifugar 2 minutos a 8000 x g para secar la membrana de la columna.
13. Transferir la columna a un tubo de 1,5 ml.
Añadir 30 µl de agua *RNase-free* directamente sobre la membrana para eluir el ARN.
Centrifugar 1 minuto a 8000 x g.
14. Cuantificar el ARN de la muestra en el *NanoDrop Spectrophotometer* y congelar a -80 °C.

5.2. Reacción de retrotranscripción y obtención del ADNc

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Preparar la 2x *Reverse Transcription Master Mix*:

1. Descongelar los componentes del *kit* en hielo.
2. Calcular el volumen necesario de cada reactivo según el número de reacciones.

Componente	Volumen/Reacción (µl)
10x <i>RT Buffer</i>	2.0
25x <i>dNTP Mix</i> (100 mM)	0.8
10x <i>RT Random Primers</i>	2.0
<i>MultiScribe™ Reverse Transcriptase</i>	1.0
<i>RNase Inhibitor</i>	1.0
<i>Nuclease-free H₂O</i>	3.2
Total por reacción	10.0

3. Preparar la mezcla en hielo y mezclar suavemente.

Preparar las *cDNA Reverse Transcription Reactions*:

1. Añadir 10 µl de la *2x RT master mix* a un tubo de 200 µl.
2. Añadir 10 µl de ARN al tubo con la *RT master mix*.
3. Poner los tubos en el termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Programa de retrotranscripción:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (minutos)	10	120	5	∞

5.3. PCR de Hes1

Primer	Secuencia del primer	Tm (°C)	Tamaño del fragmento amplificado
GAPDH Fw	ACATCGCTCAGACACCATG	56	285 pb
GAPDH Rv	AGCATCGCCCCACTTGATT		
Hes1 Fw	TCAGCACTTGCTCAGTAGTTTTGT	58	330 pb
Hes1 Rv	GAGCTATCTTTCTTCAGAGCATCC		

1. Preparar la mezcla de reacción de PCR para cada muestra.

Se añade una reacción adicional para tener volumen en exceso cuando se transfiera a la placa de PCR.

2. Añadir 22 µl de la mezcla de reacción a cada tubo.
3. Añadir 3 µl de ADNc.
4. Poner los tubos en el termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Programa de PCR en el termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems):

	Paso 1	Paso 2 (40 ciclos)			Paso 3
Temperatura (°C)	94	94	56-58	72	72
Tiempo	3 min	30 seg	30 seg	1 min	3 min

Composición de la mix de PCR de Hes1 y GAPDH:

Componente	Volumen (µl/reacción)	Concentración final
10x PCR Buffer	2.5	1x
dNTPs 2.5 mM	2.0	0.2 mM
Platinum Taq DNA Polymerase	0.2	2 U
Magnesium Chloride 50 mM	0.75	1.5 mM
Primer Fw 10 µM	1.0	0.4 µM
Primer Rv 10 µM	1.0	0.4 µM
ADNc	3.0	-
H ₂ O	14.55	-
Total	25.0	-

5.4. Reacción de retrotranscripción y PCR (RT-PCR) de una célula utilizando el sistema AmpliGrid

1. Marcar las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical (siguiendo el procedimiento detallado en el punto 1 de la sección de material y métodos).
2. Marcaje Hoechst 33342
El Hoechst 33342 es una molécula fluorescente permeable a la membrana plasmática. Por lo que marca todas las células ya que se intercala en los pares de bases A-T, tiñendo el ADN.
 - Resuspender las células en PBS a una concentración de 10⁷ células/ml.
 - Añadir Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 50 µg/ml.
 - Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos en la oscuridad y en agitación suave.
3. Separar una célula por pocillo en una placa de *AmpliGrid* (Advalytix) en el citómetro separador MoFlo (Dako). Comprobar en el microscopio que sólo ha caído una célula dentro del pocillo.

4. Añadir 1 µl de la mezcla de reacción para la RT-PCR y 4 µl de *Sealing Solution* (Advalytix) para evitar que se evapore.

Primer	Secuencia del primer	Tamaño del fragmento amplificado
p21 Fw-FAM	Fam-GCGATGGAACCTTCGACTTTGT	354 pb
p21 Rv	GGGCTTCCTCTTGGAGAAGAT	
TGFβ1 Fw-FAM	Fam-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC T	184 pb
TGFβ1 Rv	AGG CTC CAA ATG TAG GGG CAG G	
GAPDH Fw-FAM	Fam-ACATCGCTCAGACACCATG	285 pb
GAPDH Rv	AGCATCGCCCCACTTGATT	
h18S Fw-HEX	HEX-ATCCCTGAAAAGTTCCAGCA	186 pb
h18S Rv	CCCTCTTGGTGAGGTCAATG	

SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen)

Componente	Volumen (µl/reacción)
<i>2x Reaction Mix</i>	0.5
<i>RT/Platinum Taq Mix</i>	0.02
p21 Mix Fw-Rv	0.08
TGFβ1 Mix Fw-Rv	0.04
GAPDH Mix Fw-Rv	0.12
H ₂ O	0.24
Total	1

Programa de RT-PCR del termociclador *AmpliSpeed* (Advalytix):

	Paso 1	Paso 2	Paso 3 (40 ciclos)			Paso 4	Paso 5
Temperatura (°C)	50	94	94	56	72	72	22
Tiempo	40 min	3 min	20 seg	30 seg	1 min	30 min	∞

Visualización de los fragmentos amplificados en el secuenciador:

1. Diluir la PCR de 1 μ l en 4 μ l de agua.
2. Añadir en cada pocillo de una placa de 96:
 - 4 μ l de PCR diluida
 - 20.5 μ l de formamida desionizada HiDi (Applied Biosystems)
 - 0.5 μ l de Gene Scan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems)
3. Desnaturalizar en el termociclador 3 minutos a 94 °C.
4. Incubar en hielo 5 minutos.
5. Realizar la electroforesis capilar en el secuenciador ABI Prism 3100 *Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems).
6. Analizar los datos con el programa GeneMapper ID v3.2 (Applied Biosystems).

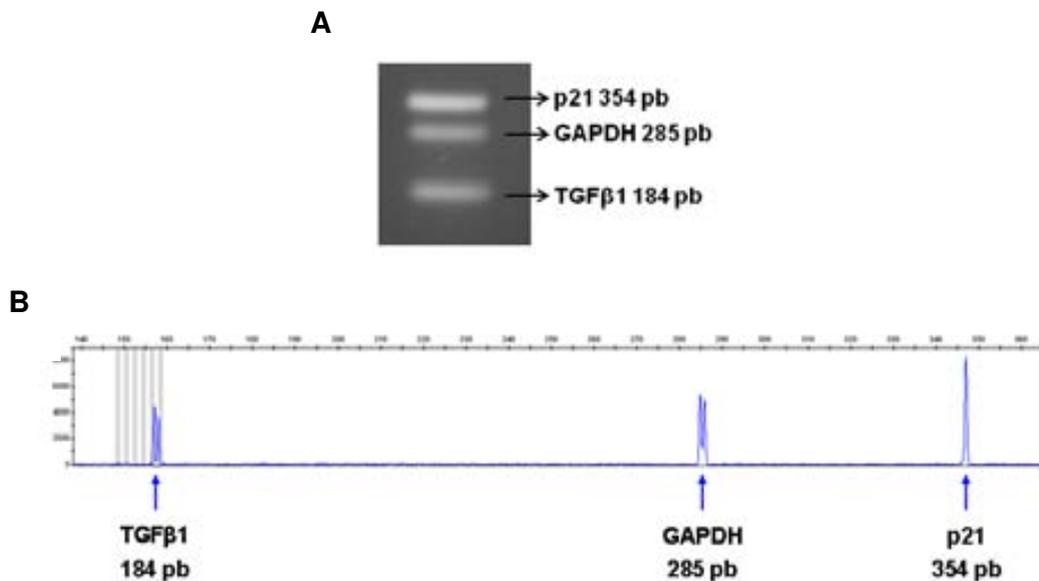


Figura 12. A) Imagen de gel de agarosa del resultado de una RT-PCR multiplex de células mononucleares de sangre de cordón umbilical irradiadas a 30 cG. B) Imagen del programa de análisis GeneMapper ID de la amplificación simultánea de los tres transcritos a partir de una célula con el sistema AmpliGrid.

6. TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS EN RATONES NOD-*Rag1*^{null}*IL2rg*^{null}

6.1. Ratones

Como ratones receptores del trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos se utilizaron ratones neonatos de menos de 2 días de edad de la cepa NOD.Cg-*Rag1*^{tm1Mom} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NOD-*Rag1*^{null}*IL2rg*^{null}, NRG) de *The Jackson Laboratory*,

criados y mantenidos en el animalario del *Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón*.

Este tipo de ratón es muy útil como modelo de análisis de injerto linfohematopoyético de células humanas que requieren un huésped radioresistente. Este doble *knock-out* es viable y fértil. En comparación con el modelo NOD-*scid IL2rg^{null}*, estos ratones NOD-*Rag1^{null}IL2rg^{null}* toleran niveles más elevados de acondicionamiento por irradiación. Además, respecto al modelo NOD-*scid* o NOD-*Rag1^{null}*, muestra una capacidad más elevada en el mantenimiento del injerto de células humanas de sangre de cordón umbilical después de acondicionamiento por irradiación (dando lugar a reconstitución multilinaje y a un repertorio de células humanas del sistema inmune incluyendo células T humanas), o en el mantenimiento del injerto de células mononucleares de sangre periférica en ratones adultos sin acondicionamiento (Pearson, Shultz et al. 2008).

El fenotipo del sistema inmunitario de los ratones NOD-*Rag1^{null}IL2rg^{null}* es una inmunidad adaptativa anormal debido a la ausencia de células B y T maduras, y una inmunidad innata anormal debido al extremadamente bajo número presente de células que participan en este tipo de inmunidad. También presentan una morfología anormal del bazo y del timo, ausencia de células NK y T, y bajo número de macrófagos (<http://jaxmice.jax.org/strain/007799.html>).

Se estabularon en la zona libre de patógenos específicos (SPF) del animalario, con temperatura controlada y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se mantuvieron y manipularon según la normativa europea y con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal del *Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón*.

6.2. Acondicionamiento de los ratones

Los ratones receptores del trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos se acondicionaron un día antes del trasplante con 3.5 Gy de irradiación corporal total a una tasa de dosis de 2.23 Gy/minuto con una fuente de ¹³⁷Cs. Se usó el irradiador CisBio International IBL 437C. La dosis administrada a los ratones fue subletal y parcialmente mieloablativa.

6.3. Trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos

Se trasplantaron tanto las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻ de forma individual en ratones por separado, como la combinación del mismo número de células de cada población en un ratón.

Previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos se analizó la expresión de HLA-A2 de las unidades de sangre de cordón umbilical. El grupo de ratones trasplantados con la combinación de dos poblaciones aisladas de sangre de cordón umbilical, fue trasplantado con células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ aisladas de unidades de sangre de cordón umbilical HLA-A2⁺, y células de la población CD34⁺CD38⁻ aisladas de unidades de sangre de cordón umbilical HLA-A2⁻. Así, en la determinación posterior del nivel de injerto humano en ratones trasplantados con ambas poblaciones, el análisis de la expresión de HLA-A2 permitió especificar la capacidad de injerto de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y de la población CD34⁺CD38⁻, de forma individual.

Después de la obtención de los progenitores hematopoyéticos humanos de sangre de cordón umbilical (procedimiento descrito en el apartado 1 de material y métodos), las células fueron resuspendidas en medio IMDM (PAA) con un 2% de suero Fetalclone I. Se trasplantaron de 100-200 células por ratón, en un volumen de 30 µl, en campana de flujo laminar mediante inyección intrahepática en ratones neonatos (menos de dos días de edad) con agujas de insulina de 30G.

Por lo tanto, según el tipo celular trasplantado se generaron tres grupos diferentes de estudio: ratones trasplantados con la combinación de las dos poblaciones, ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ y ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻.

6.4. Seguimiento del trasplante

6.4.1. Análisis del injerto mediante citometría de flujo

El injerto hematopoyético humano (porcentaje de células CD45⁺ humanas) se evaluó en sangre periférica y en tejidos hematopoyéticos (timo, bazo y MO), y la presencia de células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos se evaluó en tejidos hematopoyéticos. Se realizó un seguimiento del nivel de injerto hematopoyético humano en sangre periférica durante 18-26 semanas después del trasplante. La sangre periférica se obtuvo de la vena safena durante el seguimiento del trasplante.

Los animales fueron eutanasiados por asfixia por CO₂ después de 18-26 semanas del trasplante, y se analizó el nivel de injerto hematopoyético humano en sangre periférica (mediante punción cardíaca) y en médula ósea. Además se analizaron las células humanas de los diferentes linajes hematopoyéticos en médula ósea, timo y bazo.

Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos y se analizaron por citometría de flujo.

Marcaje de sangre periférica (SP)

1. Añadir 50 µl de SP en un tubo de 1.5 ml con 1ml de PBA-Azida.
2. Lavar con PBA-azida. Resuspender en el volumen que queda una vez decantado el sobrenadante.
3. Añadir 0.5 µg de anticuerpo de rata anti-CD16/CD32 (BioLegend) de ratón para bloquear los receptores Fc.
Añadir los anticuerpos específicos y los controles de isotipo fluorocromados.
Incubar 30 minutos a 4°C en la oscuridad.
4. Lisar los eritrocitos con 1ml de solución de lisis *Pharm Lyse solution* (BD).
Incubar 10 min a 37°C.
5. Lavar con PBA-azida.
6. Resuspender en 150 µl PBA-azida.
7. Añadir 0.5 µl del marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina D (7-AAD; Invitrogen) a 1 mg/ml.
8. Adquirir en el citómetro FACSCalibur.

Marcaje de médula ósea

1. Obtención de las células de la médula ósea.
2. Contar las células nucleadas vivas en la cámara de Neubauer con la solución Türk (colorante Giemsa + 1% de ácido acético) para lisar los eritrocitos y la solución de azul de tripano (0.4% de azul de tripano en suero fisiológico) en la que las células vivas no incorporan el colorante y las muertas sí que lo incorporan.
3. Resuspender 10⁶ células en 1 ml de PBA-azida.
4. Lavar y resuspender en 50 µl de PBA-azida con 0.5 µg de anti-mouse CD16/CD32 (BioLegend), los anticuerpos específicos y los controles de isotipo fluorocromados.
Incubar 30 minutos a 4°C en la oscuridad.
5. Lisar los eritrocitos con 1 ml de solución de lisis *Pharm Lyse solution* (BD).

6. Lavar con PBA-azida.
7. Resuspender en 150 μ l PBA-azida.
8. Añadir 0.5 μ l del marcador de viabilidad 7-AAD a 1 mg/ml.
9. Adquirir en el citómetro FACSAria o FACSCalibur.

Marcaje de timo

1. Obtención de timocitos.
2. Contar las células nucleadas vivas en la cámara de Neubauer.
3. Resuspender 10^6 células en 1 ml de PBA-azida.
4. Lavar y resuspender en 50 μ l de PBA-azida con 0.5 μ g de anti-mouse CD16/CD32 (BioLegend), los anticuerpos específicos y los controles de isotipo fluorocromados.
Incubar 30 minutos a 4°C en la oscuridad.
5. Lavar con PBA-azida.
6. Resuspender en 150 μ l PBA-azida.
7. Añadir 0.5 μ l del marcador de viabilidad 7-AAD a 1 mg/ml.
8. Adquirir en el citómetro FACSAria.

Marcaje de bazo

1. Obtención de esplenocitos.
2. Contar las células nucleadas vivas en la cámara de Neubauer.
3. Resuspender 10^6 células en 1 ml de PBA-azida.
4. Lavar y resuspender en 50 μ l de PBA-azida con 0.5 μ g de anti-mouse CD16/CD32 (BioLegend), los anticuerpos específicos y los controles de isotipo fluorocromados.
Incubar 30 minutos a 4°C en la oscuridad.
10. Lisar los eritrocitos con 1 ml de solución de lisis *Pharm Lyse solution* (BD).
11. Lavar con PBA-azida.
12. Resuspender en 150 μ l PBA-azida.
13. Añadir 0.5 μ l del marcador de viabilidad 7-AAD a 1 mg/ml.
14. Adquirir en el citómetro FACSAria.

Panel de anticuerpos utilizados en el análisis de injerto de células humanas:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Clon	µg por 10 ⁶ células	Casa comercial
CD3	APC	M IgG2a,k	HIT3a	0.1	BD
CD4	APC	M IgG1,k	RPA-T4	0.1	BD
CD8	PE	M IgG1, k	RPA-T8	0.125	eBioscience
CD13	PE	M IgG1, k	TüK1	0.1	Caltag
CD19	PE	M IgG1, k	HIB19	0.1	BioLegend
CD33	APC	M IgG1, k	WM53	0.1	BioLegend
CD34	APC	M IgG1, k	581	0.1	BD
CD45 humano	PE	M IgG1, k	2D1	0.05	eBioscience
CD45 humano	Alexa 405	M IgG1, k	HI30	0.1	Caltag
CD45 ratón	APC	Rat IgG2b,k	30F11	0.1	Miltenyi Biotec
HLA-A2	FITC	M IgG2b, k	BB7.2	0.1	AbD Serotec

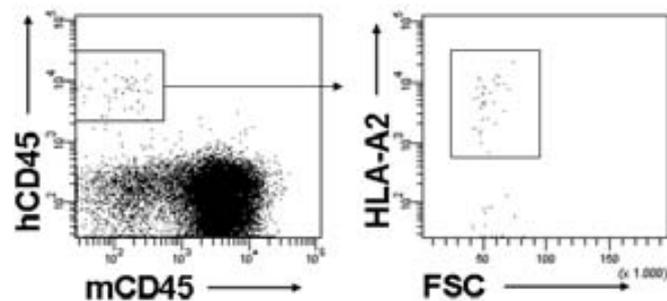


Figura 13. Estrategia de gateo utilizada para determinar los niveles de injerto de células humanas en ratones trasplantados.

En el análisis de los niveles de injerto de células humanas por citometría de flujo, en primer lugar se combinaron los parámetros FS y SS para definir morfológicamente la población celular a estudiar. En segundo lugar se combinó el marcador de viabilidad 7-AAD con FS para descartar las células muertas. En tercer lugar, en un histograma biparamétrico se analizó la expresión de hCD45 frente a mCD45, el cual permitía discriminar las células hematopoyéticas CD45⁺ de las CD45⁻ (fundamentalmente eritrocitos) y calcular el porcentaje de injerto de células humanas (hCD45⁺) respecto al total de células (hCD45⁺ + mCD45⁺). El último histograma para este tipo de análisis

permitía determinar el porcentaje de injerto de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺) y de la población CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻), respecto al total de células CD45⁺ mediante la combinación de HLA-A2 y hCD45 (figura 13).

6.4.2. Análisis del injerto mediante PCR

El análisis de injerto a nivel molecular mediante PCR permitía detectar injerto de células humanas con una sensibilidad más elevada que el análisis mediante citometría de flujo. Se evaluó el quimerismo molecular mediante PCR para detectar la presencia de transcritos de origen humano en células de médula ósea obtenidas en el punto final de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos humanos en ratones inmunodeficientes. Para ello se extrajo el ADN genómico de las células de médula ósea siguiendo el procedimiento del *GeneElute Blood Genomic DNA Kit* (SIGMA-ALDRICH). Una vez obtenido el ADN genómico, se amplificó el satélite α del cromosoma 17 humano (hCh17) (Bueno, Montes et al. 2010). Además, también se amplificó una región del serotipo HLA-A2 para detectar las células generadas *in vivo* a partir de los progenitores CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺) trasplantados.

Protocolo de extracción de ADN genómico utilizando el *GeneElute Blood Genomic DNA Kit* (SIGMA-ALDRICH)

1. Resuspender las células en 200 μ l de *Resuspension Solution*. Añadir 20 μ l de la solución de *Proteinase K*.
2. Añadir 200 μ l de *Lysis Solution C* a la muestra. Vórtex 15 segundos. Incubar a 55°C durante 10 minutos.
3. Añadir 500 μ l de *Column Preparation Solution* a cada columna y centrifugar a 12000 x g durante 1 minuto. Descartar el eluido.
4. Añadir 200 μ l de etanol absoluto al lisado celular. Mezclar con vórtex durante 5-10 segundos.
5. Transferir todo el contenido del tubo a la columna. Centrifugar a 6500 x g durante 1 minuto. Descartar el eluido y poner la columna en un tubo colector nuevo.
6. Añadir 500 μ l de *Prewash Solution* a la columna y centrifugar a 6500 x g durante 1 minuto. Descartar el eluido y poner la columna en un tubo colector nuevo.
7. Añadir 500 μ l de *Wash Solution* a la columna y centrifugar a velocidad máxima (12000-16000 x g) durante 3 minutos para secar la columna. Descartar el eluido.

Material y métodos

8. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad. Descartar el eluido y poner la columna en un tubo colector nuevo.
9. Añadir 200 µl de *Elution Solution* en el centro de la columna. Centrifugar durante 1 minuto a 6500 x g para eluir el ADN. Para aumentar la eficiencia de elución, incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente después de añadir la solución de elución y después centrifugar.

Primer	Secuencia del primer	Tamaño
satélite-α hCh17 Fw	ACACTCTTTTTGCAGGATCTA	1171 pb
satélite-α hCh17 Rv	AGCAATGTGAAACTCTGGGA	
HLA-A2 Fw	AGACTCACCGAGTGGACCTG	576 pb
HLA-A2 Rv	TATCTGCGGAGCCACTCCAC	

Composición de la mix de PCR de HLA-A2 de ADN genómico:

Componente	Volumen (µl/reacción)	Concentración final
10x PCR Buffer	2.5	1x
dNTPs 2.5 mM	2.0	0.2 mM
Platinum Taq DNA Polymerase	0.2	2 U
Magnesium Chloride 50 mM	0.75	1.5 mM
HLA-A2 Fw 10 µM	1.0	0.4 µM
HLA-A2 Rv 10 µM	1.0	0.4 µM
ADN genómico	1.5	-
H ₂ O	16.05	-
Total	25.0	-

Programa de PCR HLA-A2 *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems):

	Paso 1	Paso 2 (30 ciclos)			Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	94	94	58	72	72	22
Tiempo	3 min	30 seg	1 min	1 min	2 min	∞

Programa de PCR del satélite- α hCh17 *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems):

	Paso 1	Paso 2 (32 ciclos)			Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	94	94	65	72	72	22
Tiempo	5 min	45 seg	1 min	2 min	10 min	∞

7. TRASPLANTE SECUNDARIO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS EN RATONES NOD-*Rag1^{null}IL2rg^{null}*

En los ratones en los que se observó injerto en el trasplante primario y que además este se mantenía con el tiempo, se extrajeron las células de la médula ósea para trasplantarlas de nuevo a un segundo ratón.

Una vez eutanasiado el ratón por asfixia con CO₂, se obtuvieron los seis huesos (dos fémures, dos tibias y dos crestas ilíacas) de los cuales se extrajeron las células de la médula ósea, y se purificaron las células humanas CD34⁺ (siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.1 de material y métodos).

Se trasplantó médula ósea total (10⁶ células por ratón) y células CD34⁺ purificadas de la médula ósea (6.000-60.000 células por ratón). 8 semanas después del trasplante, los ratones fueron eutanasiados y se analizó el nivel de injerto de células humanas en la médula ósea por citometría de flujo y PCR.

8. CITÓMETROS DE FLUJO

Se utilizaron dos tipos de citómetro de flujo de Becton-Dickinson, el FACSCalibur y el FACSAria.

El citómetro de flujo FACSCalibur está equipado con dos láseres, uno de argón (azul, emite a 488 nm) y uno de helio-neón (rojo, emite a 635 nm), además de seis fotomultiplicadores: SS (cuantifica la complejidad celular), FS (cuantifica el tamaño celular); y cuatro detectores de fluorescencia FL-1 (530 nm), FL-2 (585 nm), FL-3 (>650 nm) y FL-4 (>670 nm). Los tres primeros detectores de fluorescencia (FL-1, FL-2 y FL-3) detectan los fotones producidos por la excitación de los fluorocromos con el láser azul, mientras que el cuarto detector de fluorescencia (FL-4) detecta los fotones

que se emiten por la excitación de los fluorocromos con el láser rojo. Por lo tanto, esta configuración permite el análisis simultáneo de cuatro fluorescencias.

El citómetro de flujo FACSAria utilizado es un separador celular que está equipado con tres láseres, uno de argón (azul, emite a 488 nm), uno de helio-neón (rojo, emite a 633 nm) y uno violeta (violeta, emite a 407 nm). Un sistema totalmente equipado puede detectar hasta trece parámetros de fluorescencia y dos parámetros de dispersión al mismo tiempo, así como purificar diferentes poblaciones celulares simultáneamente en varios tipos de tubos y placas de recogida.

El sistema de detectores está formado por un octágono que contiene cinco fotomultiplicadores que detectan los fotones producidos por la excitación de los fluorocromos con el láser azul, además de los detectores SS (cuantifica la complejidad) y FS (cuantifica el tamaño celular); un triángulo que contiene dos fotomultiplicadores que detectan los fotones producidos por la excitación de los fluorocromos con el láser rojo; y otro triángulo que contiene dos fotomultiplicadores que detectan los fotones producidos por la excitación de los fluorocromos con el láser violeta. Además, la configuración de los espejos y filtros de luz de los detectores puede ser modificada dependiendo de la combinación de fluorocromos utilizada (tabla 1).

	DETECTOR	FILTRO Bandpass	FILTRO Longpass	FLUOROCROMO
Láser AZUL	A-Blue	780/60	750	PE-Cy7
	B-Blue	675/20	655	PerCp
	D-Blue	576/26	550	PE
	E-Blue	530/30	505	FITC
Láser ROJO	B-Red	660/20	-	APC/Alexa 647
Láser VIOLETA	B-Violet	450/40	-	Alexa 405

Tabla 1. Configuración de filtros utilizada para las separaciones celulares y análisis de citometría de flujo realizados con el citómetro separador FACSAria (BD).

Una vez adquiridas las muestras, se procedió a analizar y valorar los datos obtenidos con el programa de análisis FACSDiva Software (Becton-Dickinson). Según el tipo de marcaje de inmunofluorescencia realizado se usaron distintas combinaciones de los parámetros mencionados, representados en histogramas biparamétricos. En primer

lugar y en todos los casos se combinaron los parámetros FS y SS para definir morfológicamente la población a estudiar. En segundo lugar se combinaron distintos parámetros en función del marcaje realizado.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron con diferentes pruebas estadísticas con el programa informático GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software), con el que también se realizaron los gráficos.

Según las variables a estudiar y su distribución, se utilizaron pruebas como el análisis de varianza (ANOVA) de un factor o la prueba *t* de Student. En todos los casos se consideró que la diferencia era significativamente estadística cuando la *p* era inferior a 0.05.

Se aplicaron pruebas paramétricas cuando la distribución de los datos de los grupos a comparar era normal (varianzas similares). Las pruebas utilizadas la de la *t* de Student cuando se comparaban las medias de los conjuntos de datos independientes o la prueba de ANOVA de un factor para el estudio de la varianza de una variable cuantitativa dependiente en más de dos conjuntos de datos independientes aplicando posteriormente el procedimiento de Bonferroni para comparar los conjuntos de datos dos a dos.

RESULTADOS

RESULTADOS

PARTE I. LA EXPRESIÓN DE CD150 EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS DEFINE UNA POBLACIÓN CON CAPACIDAD MULTIPOTENCIAL

1. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS CD150⁺CD135^{-low} EN LA POBLACIÓN CD34⁺CD38⁻ AISLADAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Existen numerosas evidencias de que las células madre hematopoyéticas humanas están incluidas dentro de la población CD34⁺CD38⁻ de la fracción mononuclear de la sangre de cordón umbilical y de la médula ósea (Bhatia, Wang et al. 1997). Esta población es heterogénea ya que incluye tanto células madre hematopoyéticas como progenitores más diferenciados, por lo que se subdividió según la expresión de CD150 y CD135. Ambos marcadores han sido utilizados en el establecimiento de la jerarquía de las células madre hematopoyéticas en ratón. CD135 es un receptor tirosina kinasa de tipo III (FLT3/FLK2) que se expresa a medida que las células madre hematopoyéticas de ratón se diferencian. CD150 es el miembro fundador de la familia de receptores de superficie SLAM y ha sido descrito como un marcador de células madre hematopoyéticas murinas con capacidad de reconstitución a largo plazo (Adolfsson, Borge et al. 2001; Christensen and Weissman 2001; Kiel, Yilmaz et al. 2005; Yang, Bryder et al. 2005).

La fracción de células mononucleares de sangre de cordón umbilical fue enriquecida en células CD34⁺ mediante métodos inmunomagnéticos. Posteriormente, se analizó fenotípicamente, mediante citometría de flujo, la expresión de CD150 y CD135.

La estrategia de análisis de la población por citometría de flujo se realizó en varios pasos. A través del tamaño y de la complejidad celular, se seleccionó la región correspondiente a los progenitores hematopoyéticos y a células con una alta viabilidad. Esta región se aplicó a un segundo gráfico bidimensional en el que se distribuyen las células según la expresión del marcador CD34. En este segundo gráfico, se seleccionaron las células CD34⁺. La selección CD34⁺ se aplicó a un tercer gráfico bidimensional en el que se muestran los eventos adquiridos según la expresión de los marcadores CD38 y CD34. Finalmente, se seleccionaron las células CD34⁺ que no expresaban o expresaban niveles bajos del marcador CD38, incluyendo dentro de la selección a la fracción correspondiente al 10 % del total de células CD34⁺. Esta última selección se aplicó a un cuarto gráfico bidimensional en el que se muestran las células distribuidas según la expresión de los marcadores CD150 y CD135 (figura 14).

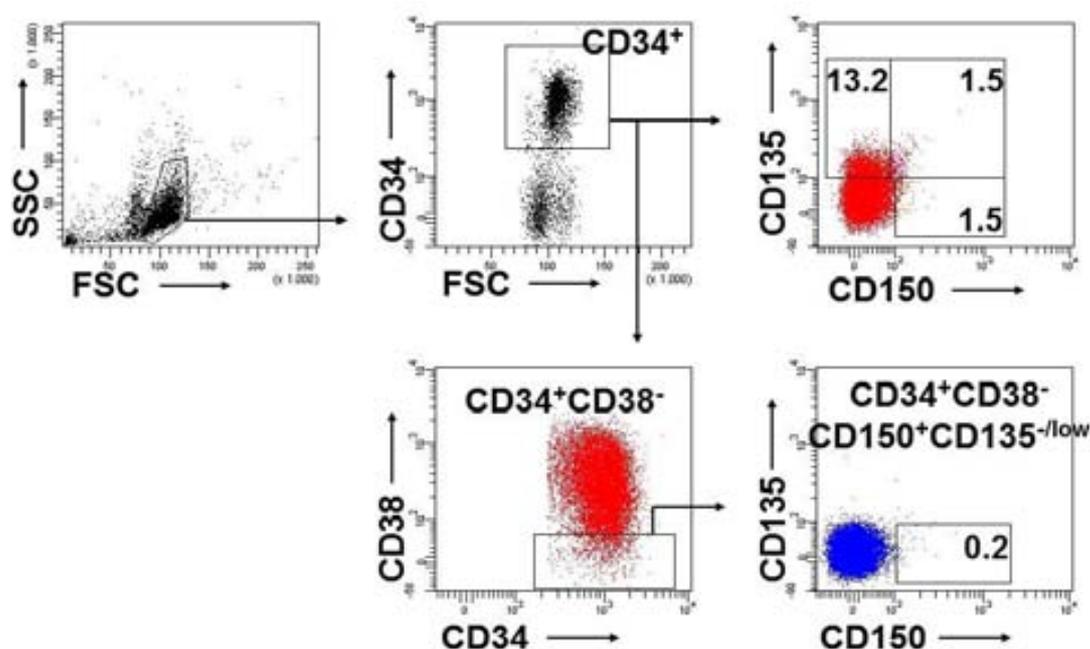


Figura 14. Estrategia de selección de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ en sangre de cordón umbilical. Las células mononucleares de sangre de cordón umbilical fueron analizadas según la expresión de los marcadores CD34, CD38, CD150 y CD135. Previamente al análisis, la sangre de cordón umbilical fue enriquecida en progenitores hematopoyéticos $CD34^+$, de los cuales únicamente se consideró el 10% de los eventos como $CD34^+CD38^-$.

	% $CD34^+$ (*)	% $CD34^+CD38^-$ (*)
$CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ (n=8)	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.13

Tabla 2. Frecuencia de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ en sangre de cordón umbilical. (*) Los valores se corresponden a la media y la desviación estándar de las muestras (media \pm desviación estándar).

A partir del análisis de 8 unidades de sangre de cordón umbilical, se calculó el porcentaje de representación de la subpoblación $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ en las poblaciones $CD34^+$ y $CD34^+CD38^-$ de sangre de cordón umbilical (tabla 2).

El análisis de la expresión de los marcadores CD150 y CD135 por citometría de flujo reveló que sólo un 0.25 ± 0.13 % de las células $CD34^+CD38^-$ y un 0.03 ± 0.01 % de las células $CD34^+$, son $CD150^+CD135^-$. Es decir, que de cada millón de células $CD34^+$ se obtendrían aproximadamente 300 células $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$.

2. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS CD150⁺ EN LA POBLACIÓN LIN⁻CD34⁺ DE SANGRE PERIFÉRICA MOVILIZADA

El análisis de la expresión de CD150 en células de sangre de cordón umbilical define una subpoblación minoritaria dentro de la población CD34⁺ y CD34⁺CD38⁻. Con la finalidad de observar si su expresión también es detectada en progenitores hematopoyéticos obtenidos de otras fuentes celulares, se analizó la expresión de CD150 en progenitores hematopoyéticos de sangre periférica movilizada. Se analizó en progenitores Lin⁻CD34⁺ ya que se ha observado que esta población de sangre periférica movilizada está enriquecida en progenitores hematopoyéticos (Murray, DiGiusto et al. 1994).

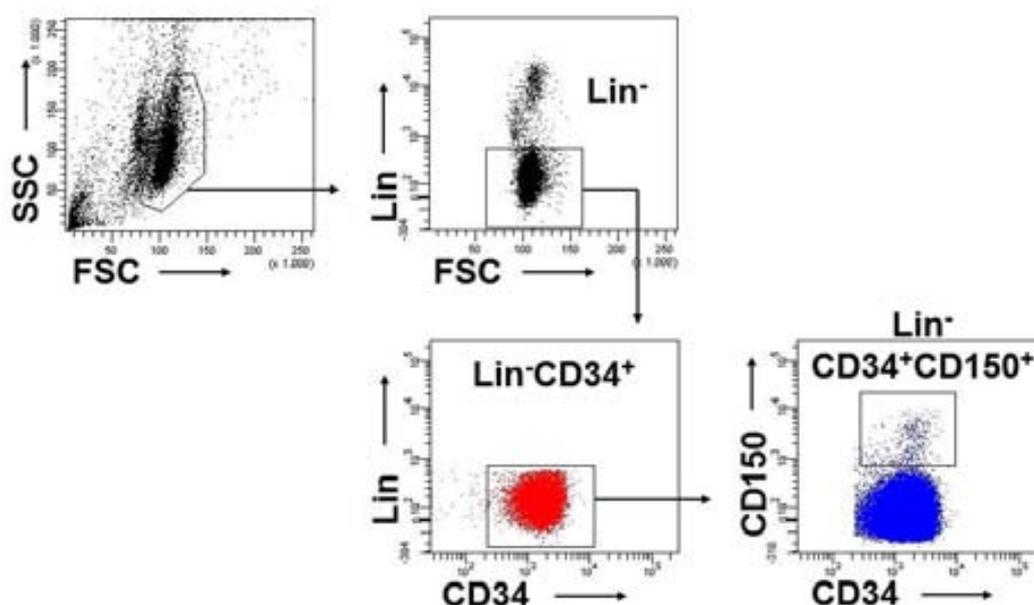


Figura 15. Estrategia de selección de la población Lin⁻CD34⁺CD150⁺ en selecciones de células CD34⁺ de sangre periférica movilizada. La población CD34⁺ de células mononucleares de sangre periférica movilizada, fue analizada según la expresión de marcadores de linaje (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, CD15, CD41, CD235a), CD34 y CD150.

	% Lin ⁻ CD34 ⁺ (*)
Lin ⁻ CD34 ⁺ CD150 ⁺ (n=3)	0.3 ± 0.14

Tabla 3. Frecuencia de la población Lin⁻CD34⁺CD150⁺ en selecciones de células CD34⁺ de sangre periférica movilizada. (*) Los valores se corresponden a la media y la desviación estándar de las muestras (media ± desviación estándar).

El análisis por citometría de flujo de la expresión de CD150 en células de sangre periférica movilizada, mostró que sólo un 0.3 ± 0.14 % de las células $\text{Lin}^- \text{CD34}^+$ son CD150^+ (figura 15, tabla 3).

3. LA EXPRESIÓN DE CD150 IDENTIFICA UNA SUBPOBLACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CON BAJA CAPACIDAD CLONOGÉNICA

Una de las principales características de las células madre hematopoyéticas es su multipotencialidad, es decir, la capacidad de generar células de todos los linajes sanguíneos. Una vez establecida y cuantificada la existencia de la población $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD150}^+ \text{CD135}^-$ de sangre de cordón umbilical y de la población $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD150}^+$ de sangre periférica movilizada, se estudió la capacidad que presentan estas células para generar células de la serie mieloeritroide mediante ensayos de formación de colonias en medio con metilcelulosa.

El recuento de las colonias obtenidas al final del cultivo, permitió obtener el valor de la eficiencia clonogénica de la población estudiada. La eficiencia clonogénica obtenida de la población $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ fue de 24.21 ± 13.7 %, mientras que la obtenida de la población $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD150}^+ \text{CD135}^-$ fue de 8.45 ± 7.35 %. Es decir, 24 de cada 100 células $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ y 8 de cada 100 células $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD150}^+ \text{CD135}^-$ poseen capacidad de generar colonias en medio de metilcelulosa completo (figura 16). La relación entre el número de colonias mielomonocíticas (51.9 ± 10.5 vs 71.3 ± 15.7 ; $p > 0.5$) y de la serie eritroide (48.1 ± 10.5 vs 28.7 ± 15.7 ; $p > 0.5$) era similar en ambas poblaciones ya que la diferencia no era estadísticamente significativa (figura 17). Esto sugiere que la reducción en la capacidad clonogénica no es debido a un déficit en la capacidad de diferenciación hacia un tipo celular concreto sino que puede ser debido a una limitación en la capacidad de proliferación de las células de esta población en este tipo de ensayos.

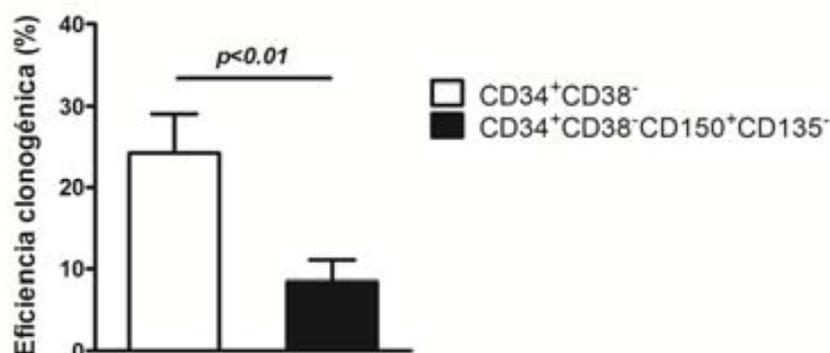


Figura 16. Eficiencia clonogénica de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical. Por triplicado, se separaron 250 células de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻, y se cultivaron en medio con metilcelulosa y factores de crecimiento durante 14-15 días. Se ha representado la media y la desviación estándar (n=8).

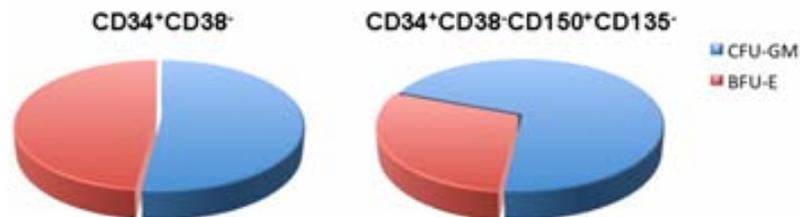


Figura 17. Distribución de los diferentes tipos de colonias generadas a partir de progenitores CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical. Se ha representado la media del porcentaje de colonias CFU-GM y BFU-E (n=3).

Los progenitores hematopoyéticos aislados de sangre periférica movilizada que expresan CD150 no generaron colonias en medio de metilcelulosa completo. Mientras que la eficiencia clonogénica de la población Lin⁻CD34⁺CD150⁻ era de 27.07 ± 4.2 %, la eficiencia clonogénica de la población Lin⁻CD34⁺CD150⁺ era 0 ± 0 % (figura 18).

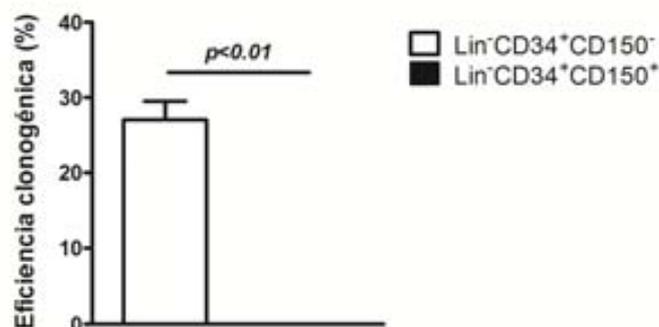


Figura 18. Eficiencia clonogénica de las poblaciones Lin⁻CD34⁺CD150⁻ y Lin⁻CD34⁺CD150⁺ de sangre periférica movilizada. Por triplicado, se separaron 500 células de las poblaciones Lin⁻CD34⁺CD150⁻ y Lin⁻CD34⁺CD150⁺, y se cultivaron en medio de metilcelulosa completo durante 14-15 días. Se ha representado la media y la desviación estándar (n=3).

4. LOS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ TIENEN CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN MIELOIDE Y LINFOIDE

Los ensayos de formación de colonias permiten evaluar la capacidad de generar descendencia de aquellos progenitores preparados para reaccionar frente a los estímulos de diferenciación bajo unas condiciones experimentales concretas. Además,

bajo estas condiciones de cultivo no es posible observar la capacidad de diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia linaje linfoide. En cambio, los ensayos de diferenciación hacia los diferentes tipos de linajes hematopoyéticos permiten evaluar la capacidad multipotencial de los progenitores hematopoyéticos. A diferencia de los ensayos de formación de colonias, este tipo de ensayos también permite la diferenciación de la población a células linfoides. Además, en estos ensayos con tiempos de cultivo más largos, los factores de crecimiento y las señales estromales pueden inducir la activación y posterior diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

Con el objetivo de establecer el potencial de diferenciación de las dos poblaciones celulares aisladas de la sangre de cordón umbilical, éstas fueron cultivadas junto con dos tipos de estroma diferentes, OP9 y OP9-DL1, con diferentes combinaciones de citoquinas que favorecen la diferenciación a células mieloides, NK, B y T. Después de 21-28 días, las células diferenciadas en cultivo fueron analizadas por citometría de flujo.

En el análisis fenotípico de las células diferenciadas se utilizaron marcadores representativos de los diferentes linajes hematopoyéticos.

El estudio del linaje mielomonocítico se realizó con los siguientes anticuerpos: CD11b (monocitos, granulocitos y células NK), CD33 (progenitores mieloides, monocitos, granulocitos, mastocitos y células T activadas), CD15 (neutrófilos, eosinófilos y monocitos) y CD14 (monocitos, macrófagos, granulocitos).

El análisis de los linajes linfoides y de las células NK se realizó marcando con los siguientes anticuerpos: CD10 (precursores de células B y T, y neutrófilos), CD19 (células B), CD3 (células T), CD4 (células T, monocitos y macrófagos), CD8 (células T y NK) y CD56 (células NK y células T).

En el estudio de la diferenciación a linaje linfoide T se analizó la expresión del marcador CD3 ya que muestra el grado de diferenciación en el que se encuentran las células linfoides. Por este motivo, el análisis se realizó seleccionando la población $CD4^+CD8^+$, y observando la expresión del marcador CD3 dentro de la población seleccionada.

Las células $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ generaron todos los linajes analizados, sugiriendo que esta población está formada por un conjunto de progenitores hematopoyéticos con capacidad de generar células de los diferentes linajes hematopoyéticos. Estos resultados son similares a los obtenidos al someter la población de progenitores hematopoyéticos $CD34^+CD38^-$ a condiciones de diferenciación hacia los linajes hematopoyéticos analizados (figura 19).

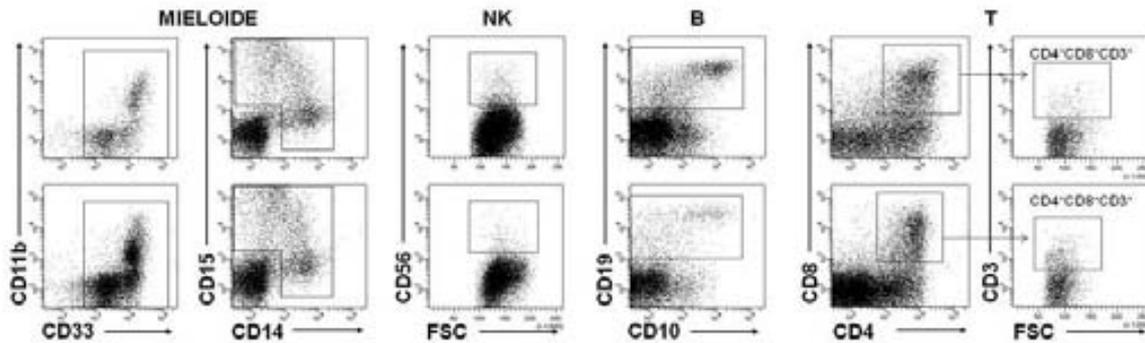


Figura 19. Células mieloides, NK, B y T diferenciadas a partir de células $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ de sangre de cordón umbilical. Se separaron 100-500 células de las poblaciones $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$, y se cultivaron en medios que permiten la diferenciación a células mieloides, NK, B y T durante 21-28 días. Las células del cultivo fueron analizadas en un citómetro FACSCalibur (BD). Los marcadores de linaje utilizados fueron CD56 para células NK; CD19 y CD10 para células B; CD11b, CD33, CD15 y CD14 para células mieloides y; CD8, CD3 y CD4 para células T. La figura muestra los gráficos de las poblaciones obtenidas tras el cultivo de diferenciación a partir de células $CD34^+CD38^-$ (primera fila) y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ (segunda fila) de sangre de cordón umbilical.

Por otro lado, una cuestión a resolver era si la multipotencialidad que presenta la población es debido a que está constituida por un conjunto heterogéneo de progenitores hematopoyéticos comprometidos a un linaje específico, o si está formada por progenitores con capacidad multipotencial, los cuales, a partir de un progenitor son capaces de generar los diferentes linajes hematopoyéticos.

Para ello se llevaron a cabo ensayos clonales de las poblaciones $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$. El diseño del experimento distingue dos fases: una fase de expansión y otra fase de diferenciación. La fase de expansión se inició a partir de una célula aislada mediante separación celular por citometría de flujo, y cultivada en una placa de 96 pocillos con medio sin suero y con una combinación de citoquinas utilizada para el mantenimiento y/o expansión de progenitores multipotenciales. Tras dos semanas en cultivo, las células que habían proliferado (con un conteo de más de 10 células por pocillo) se dividieron en tres pocillos y el cultivo continuó durante 21 días más sobre células estromales OP9 y con una combinación de citoquinas que permite la diferenciación a células mieloides, NK y B. Posteriormente, las células diferenciadas fueron analizadas por citometría de flujo, marcadas con anticuerpos de los diferentes linajes hematopoyéticos. Aproximadamente, fueron analizados unos 50 pocillos de cada población (figura 20).

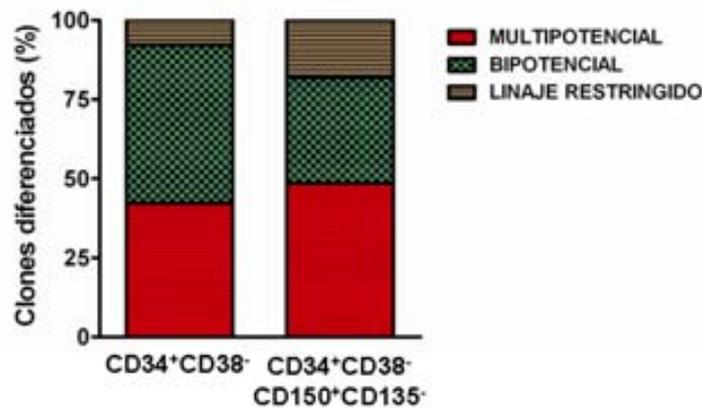


Figura 20. Proporción de clones diferenciados a células mieloides, NK y B de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical. Se separó una célula de cada población y se analizó su capacidad de diferenciación a células mieloides, NK y B. Las células del cultivo fueron analizadas en un citómetro FACSCalibur (BD). Los marcadores de linaje utilizados fueron CD56 para células NK, CD19 para células B, CD14 para células mieloides y; CD8, CD3 y CD4 para células T. Se agruparon los clones según la capacidad de diferenciarse a un linaje (linaje restringido), a dos linajes (bipotencial) o a los tres linajes mieloides, NK y B (multipotencial). Se ha representado la media de tres experimentos independientes.

La diferencia existente en la potencialidad de las dos poblaciones no es estadísticamente significativa. En ambos casos, aproximadamente la mitad de los clones analizados era capaz de generar células mieloides, NK y B (42.48 ± 5 % de CD34⁺CD38⁻ y 47.98 ± 11.13 % de CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻); y fueron considerados progenitores multipotenciales. También se detectaron células con un patrón de diferenciación más restringido ya que sólo eran capaces de diferenciarse a dos tipos celulares de linaje diferentes (mieloide y NK, mieloide y B, NK y B) (49.55 ± 5.86 % de CD34⁺CD38⁻ y 33.91 ± 22.4 % de CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻). El caso más minoritario en ambas poblaciones era el de clones con un patrón de diferenciación restringido a uno de los tres tipos de linajes estudiados (7.98 ± 0.95 % de CD34⁺CD38⁻ y 18.12 ± 11.89 % de CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻).

Además, también se obtuvieron células T generadas a partir de una célula de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (figura 21).

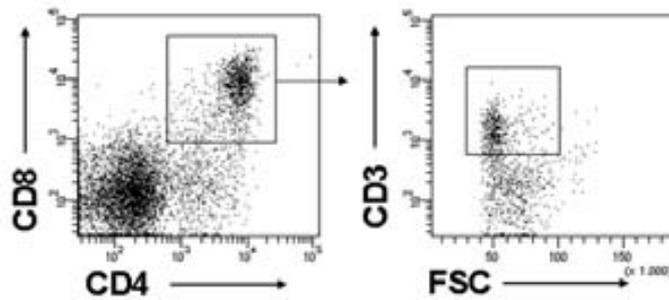


Figura 21. Ejemplo de diferenciación linfoide T a partir de una célula $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$.

5. LA SUBPOBLACIÓN $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ ESTÁ FORMADA POR CÉLULAS CON BAJA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN

Los ensayos de formación de colonias en medio con metilcelulosa muestran que la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ posee una baja eficiencia clonogénica. Esto podría ser debido a la presencia de un bajo número de progenitores hematopoyéticos, o a la baja capacidad de proliferación de las células de esta población en estas condiciones experimentales. Sin embargo, los experimentos de diferenciación revelan que esta población contiene progenitores multipotenciales capaces de generar células mieloides y linfoides. Teniendo esto en cuenta, el déficit de colonias en medio de metilcelulosa observado podría ser debido a una baja capacidad de proliferación que impide generar colonias en estas condiciones experimentales. Para resolver esta cuestión, se analizó la capacidad de proliferación de las células $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ a nivel poblacional y a nivel clonal, en cultivos con medio sin suero y un cóctel de citoquinas optimizado para favorecer la expansión de los progenitores hematopoyéticos.

En los cultivos de proliferación a corto plazo de dos semanas se observó que la tasa de proliferación de las células de la población $CD34^+CD38^-$ (78.300 ± 41.640 de células nucleadas totales) era significativamente ($p < 0.05$) más elevada que la de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ (4.850 ± 7.040 de células nucleadas totales) (figura 22).

Los ensayos de expansión clonal se iniciaron a partir de una célula aislada mediante separación celular por citometría de flujo, y cultivada en una placa de 96 pocillos con medio HP01 y una combinación de citoquinas. Se realizaron un total de 5 experimentos y, en cada experimento, se analizaron 3 placas de 96 pocillos de cada una de las poblaciones. A las dos, cuatro y siete semanas en cultivo, se identificaron los pocillos nuevos en los cuales las células habían proliferado (con un conteo de más de 10 células por pocillo) sin tener en cuenta los que ya habían sido contados

anteriormente, y se estableció el porcentaje respecto al número total de pocillos en los que se observó proliferación.

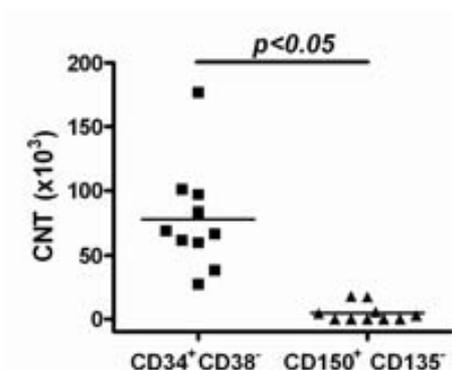


Figura 22. Proliferación a nivel poblacional de células $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ de sangre de cordón umbilical. Se separaron y cultivaron 50 células de cada población durante dos semanas en medio HP01 con citoquinas. Al final del cultivo se hizo un recuento del número de células nucleadas totales (CNT) vivas por marcaje de azul de tripano.

Teniendo en cuenta el total de clones que entraban en división a lo largo de las siete semanas del cultivo, el porcentaje de células $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ ($50.19 \pm 26.77\%$) que entraban en división a las dos semanas era significativamente inferior ($p < 0.05$) respecto al porcentaje de células que se dividían de la población $CD34^+CD38^-$ ($75.49 \pm 6.82\%$). Sin embargo, de los clones que proliferaban, la mayoría de las células $CD34^+CD38^-$ se pueden considerar de proliferación temprana, mientras que dentro de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ es posible encontrar clones de proliferación temprana y tardía distribuidos de forma equitativa, $50.19 \pm 26.77\%$ a las dos semanas y $40.76 \pm 31.79\%$ a las siete semanas (figura 23).

Estos resultados confirmaron los resultados obtenidos a corto plazo (2 semanas), en los cuales la proliferación de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ era inferior al de la población $CD34^+CD38^-$.

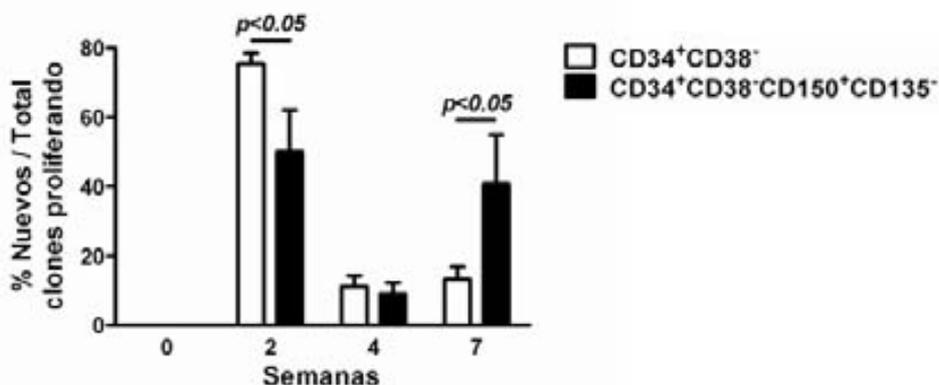


Figura 23. Proliferación a nivel clonal de células $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ de sangre de cordón umbilical. Se separó y cultivó una célula de cada población durante 7 semanas en medio HP01 y citoquinas. A diferentes tiempos de cultivo se hizo un recuento de los pocillos nuevos que habían proliferado, aquellos que contenían más de 10 células. Se ha representado la media y la desviación estándar ($n=5$).

6. EL CO-CULTIVO CON CÉLULAS ESTROMALES AUMENTA LA EFICIENCIA CLONOGÉNICA DE LA POBLACIÓN CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻

En experimentos anteriores se observó que la eficiencia clonogénica y la capacidad de proliferación de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ eran menores que las de la población CD34⁺CD38⁻. Esto podría ser debido a que las células se encuentran en un estado latente o que las condiciones experimentales no eran las idóneas para estimular la proliferación y diferenciación de esta población celular. Por lo que se realizaron ensayos de co-cultivo con células estromales y citoquinas, con la finalidad de observar si señales externas o contactos celulares entre los progenitores hematopoyéticos y las células estromales, eran capaces de activar las células para poder responder a los estímulos de proliferación y diferenciación celular.

Tras dos días en co-cultivo con células estromales y citoquinas, las células CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ eran capaces de generar más colonias en medio de metilcelulosa (26.3 ± 17.6 %) respecto a las células sin cultivar (11.3 ± 5.9 %) (figura 24). La eficiencia clonogénica de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ tras el co-cultivo (26.3 ± 17.6 %) aumentó hasta niveles similares a los obtenidos con células de la población CD34⁺CD38⁻ (24.21 ± 13.7 %) aislada directamente de la sangre de cordón umbilical (figura 16).

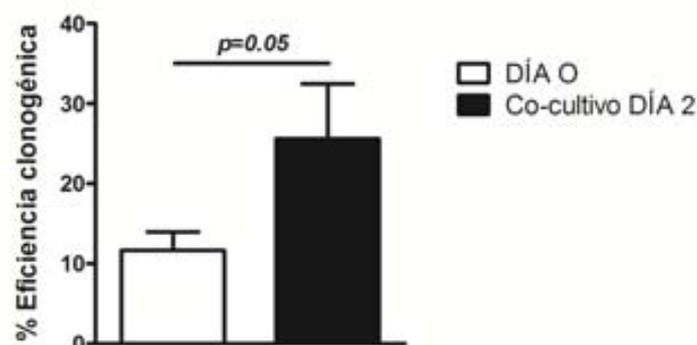


Figura 24. Eficiencia clonogénica de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical tras dos días en co-cultivo con células estromales. Se separaron 250 células CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻, y se cultivaron en medio de metilcelulosa completo durante 14-15 días (DÍA 0). Además se separaron 250 células que fueron cultivadas con células estromales OP9 Neo y citoquinas SCF, TPO, FLT3L a 10 ng/ml. Tras dos días en cultivo, se transfirieron a medio de metilcelulosa durante 14-15 días (Co-cultivo DÍA 2). Se ha representado la media y la desviación estándar (n=4).

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GAPDH, p21 Y TGFβ1 EN CD34⁺CD38⁻ Y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ POR RT-PCR MULTIPLEX

Los experimentos anteriores en los que se analiza la actividad proliferativa sugieren que la expresión de CD150, en la población CD34⁺CD38⁻, distingue una subpoblación con un particular control de la entrada en ciclo celular. Se ha observado que el índice de proliferación de la población es inferior al de la población CD34⁺CD38⁻, y contiene células de proliferación temprana y tardía. Con el fin de encontrar la base molecular que explique las diferencias observadas en la proliferación de estas dos poblaciones, se diseñó un ensayo para analizar simultáneamente la expresión de los genes *GAPDH*, *p21* y *TGFβ1* mediante RT-PCR, en células únicas de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻.

Existen numerosos estudios que relacionan TGFβ1 y p21 con el control de la quiescencia de las HSCs (Goey, Keller et al. 1989; Keller, McNiece et al. 1990; Lu, Xiao et al. 1993; Sitnicka, Ruscetti et al. 1996; Batard, Monier et al. 2000; Cheng, Rodrigues et al. 2000; Fan, Valdimarsdottir et al. 2002; Chabanon, Desterke et al. 2008). Además, Ducos y colaboradores demostraron que el mRNA de p21 está controlado por el TGFβ1 endógeno en células madre y progenitores hematopoyéticos quiescentes (Ducos, Panterne et al. 2000).

Inicialmente, la técnica fue validada utilizando la expresión de la subunidad ribosomal 18s como control endógeno. Se separó una célula de cada población en una placa AmpliGrid, se añadió la mezcla de la RT-PCR con los *primers* del 18s y se analizó la amplificación en el secuenciador. Se analizaron un total de 12 células de cada población en cada uno de los dos experimentos realizados. El porcentaje de células que expresaban en gen era del 68.5 ± 19.1 % en el caso de la población CD34⁺CD38⁻ y del 81 ± 15.6 % de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻. El porcentaje de células en las que se observaba amplificación era elevado en ambos casos y las diferencias entre ambas poblaciones no eran significativas.

En el análisis de la expresión génica en células individuales se observó que del total de células analizadas, había más células de la población CD34⁺CD38⁻ que expresaban *GAPDH* (72.5 ± 9.01 %) y *TGFβ1* (64.96 ± 2.18 %), que de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (20.22 ± 15.30 % de *GAPDH* y 15.46 ± 7.78 % de *TGFβ1*).

En cuanto a p21, no existían diferencias significativas entre ambas poblaciones ya que el 7 ± 2.5 % de las células de la población CD34⁺CD38⁻ y el 4.8 ± 3.2 % de las células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻, expresaban p21 (figura 25).

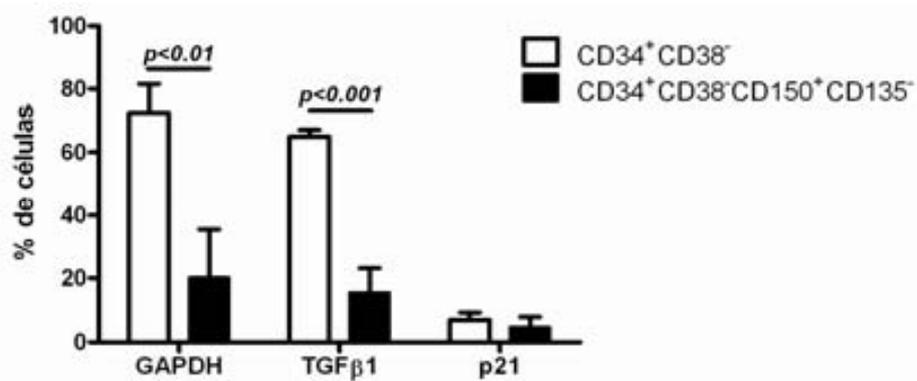


Figura 25. Porcentaje de células de las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical que expresan *GAPDH*, *TGFβ1* y *p21*. Se separó una célula de cada población en pocillos de una placa *AmpliGrid*. Posteriormente, se realizó la RT-PCR multiplex y el producto de amplificación se analizó con el programa GeneMapper ID v3.2 en el secuenciador ABI Prism 3100 *Avant Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Se ha representado la media y la desviación estándar (n=3).

Debido a que un número bajo de las células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ expresaban *GAPDH*, se normalizó la expresión de *TGFβ1* y *p21* respecto a las células que expresaban *GAPDH* para poder comparar la expresión de estos genes entre células de ambas poblaciones. Así, de las células que expresaban *GAPDH*, la mayoría de las células de la población CD34⁺CD38⁻ expresaban *TGFβ1* mientras que las células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ estaban repartidas entre dos grupos, células que expresaban *TGFβ1* (75.20 ± 10.91 %) y células que expresaban *p21* y *TGFβ1* (24.80 ± 10.91 %) simultáneamente. Por lo que había más células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ que de la población CD34⁺CD38⁻, que expresaban los tres genes *GAPDH*, *p21* y *TGFβ1*, simultáneamente (figura 26).

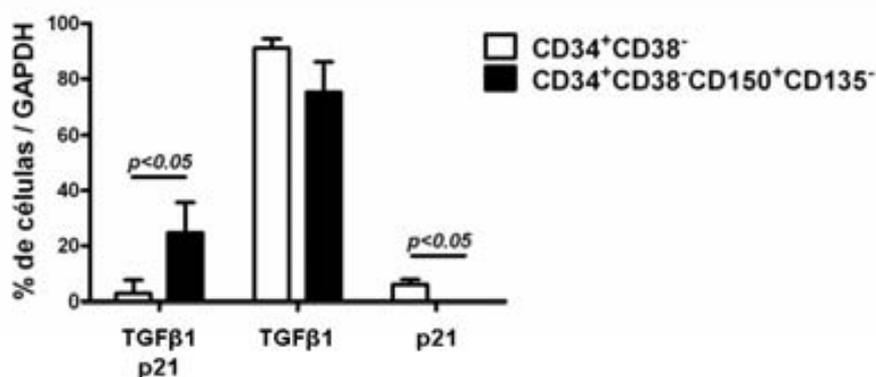


Figura 26. Porcentaje de células de las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical que expresan *GAPDH*, *TGFβ1* y/o *p21* respecto el total de células que expresan *GAPDH*. Se separó una célula de cada población

en pocillos de una placa de *AmpliGrid*. Posteriormente, se realizó la RT-PCR multiplex y el producto de amplificación se analizó con el programa GeneMapper ID v3.2 en el secuenciador ABI Prism 3100 *Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se ha representado la media y la desviación estándar (n=3).

El análisis de la expresión de *GAPDH*, *p21* y *TGFβ1* en ambas poblaciones muestra que hay menos células en la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ que expresan algunos de estos genes, ya que aproximadamente un 60 % de las células no expresa ninguno de los transcritos. Las diferencias de expresión de *GAPDH* y *TGFβ1* entre ambas poblaciones podrían ser debidas a diferencias metabólicas y diferencias del estado del ciclo celular en el que se encuentran las células de cada población. El hecho de que se observarán más células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ que expresan los tres transcritos a la vez podría indicar que existe una relación entre la expresión de *GAPDH*, *p21* y *TGFβ1* en las células de esta población.

8. ANÁLISIS DE LA RECONSTITUCIÓN DE LAS POBLACIONES CD34⁺CD38⁻ Y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ EN RATONES NOD-*Rag1*^{null}*IL2rg*^{null}

El análisis fenotípico y funcional de la expresión de CD150 en progenitores hematopoyéticos humanos ha revelado que existe una población en sangre de cordón umbilical con capacidad multipotencial *in vitro* que además posee una baja tasa de división. Con la finalidad de caracterizar mejor la población de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y analizar otras propiedades que caracterizan a las HSC, se llevaron a cabo ensayos de reconstitución de HSC en modelos murinos humanizados NOD-*Rag1*^{null}*IL2rg*^{null}. Estos ensayos permiten obtener información, *in vivo*, de la capacidad de migración de las HSC hacia la médula ósea, anidamiento (*homing*) en la médula ósea, y división simétrica (autorrenovación) y asimétrica (diferenciación) de las HSC.

Se trasplantaron de 100-200 progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ por ratón NOD-*Rag1*^{null}*IL2rg*^{null}. Se trasplantaron tanto las poblaciones de forma individual, como la combinación del mismo número de células de cada población en un ratón. En el trasplante combinado de las dos poblaciones se diferenciaban las células generadas a partir de cada población según la expresión del antígeno HLA-A2 (figura 13). Ya que las células hCD45⁺ HLA-A2⁺ provenían de los progenitores CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ trasplantados, y las células hCD45⁺ HLA-A2⁻ eran generadas a partir de los progenitores CD34⁺CD38⁻ trasplantados. Por lo tanto, según el tipo celular trasplantado se generaron tres grupos diferentes de

estudio: ratones trasplantados con la combinación de las dos poblaciones, ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ y ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻. El seguimiento del injerto hematopoyético humano se analizó a nivel celular y molecular.

8.1. Análisis del quimerismo celular en sangre periférica

El quimerismo celular (porcentaje de células CD45⁺ humanas) se analizó en sangre periférica, en tejidos hematopoyéticos y linfoides (MO, bazo y timo). También se estudió la presencia de células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos. Se consideraron ratones con injerto aquellos que presentaban más de un 0.01 % de células CD45⁺ humanas en cada una de las fuentes de células analizadas.

Se realizó un seguimiento del nivel de injerto hematopoyético humano en sangre periférica durante 18 semanas después del trasplante a los tres grupos de ratones trasplantados.

Tabla 4. Resumen del injerto a corto (8-10 semanas) y largo plazo (>18 semanas) en sangre periférica de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻.

Poblaciones	Células inyectadas	% de ratones con injerto humano en SP		Media del % de quimerismo en SP (Rango)
		A corto plazo	A largo plazo	
CD34⁺CD38⁻	100-200	58.8 % (10/17)	35.3 % (6/17)	1.2 % (0.01-8.9)
+				
CD34⁺CD38⁻ CD150⁺CD135⁻	100-200	29.4 % (5/17)	29.4 % (5/17)	0.3 % (0.01-1.85)
CD34⁺CD38⁻	100-150	16.7 % (1/6)	16.7 % (1/6)	0.18 % (0.08-0.35)
CD34⁺CD38⁻ CD150⁺CD135⁻	100-150	33.3 % (2/6)	33.3 % (2/6)	0.06 % (0.03-0.11)

8.1.1. Grupo de ratones trasplantados con la combinación de las dos poblaciones de progenitores hematopoyéticos: CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻

El primer grupo fue trasplantado con la combinación de las dos poblaciones de progenitores hematopoyéticos: CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻. En

estos ratones se observó injerto de células humanas generadas a partir de la población CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻) y de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺). De los ratones trasplantados, los progenitores CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻) generaban injerto a corto plazo en un 58.8 % (10/17) de los casos y en un 35.3 % (6/17) de los ratones, a largo plazo (tabla 4).

Además, en el análisis de la evolución del porcentaje de células humanas CD45⁺ a lo largo del tiempo posterior al trasplante (figura 27), se observó que existían dos subtipos de progenitores hematopoyéticos dentro de la población CD34⁺CD38⁻.

El primer subtipo de progenitor CD34⁺CD38⁻ tenía capacidad de reconstitución a corto plazo (ST-HSC), y era capaz de proliferar, diferenciarse y generar descendencia en las primeras semanas después del trasplante (a las 8-10 semanas), pero desaparecía o perdía esta capacidad a medida que avanza el tiempo, ya que el porcentaje de células CD45⁺ humanas iba disminuyendo hasta llegar a perder el injerto de células humanas. El segundo subtipo de progenitor CD34⁺CD38⁻ era aquel que, tal y como se observa en la figura 27, tenía capacidad de reconstitución a corto y largo plazo. Aunque este último tipo, podría no deberse a un mismo progenitor que da lugar a reconstitución a corto y largo plazo, sino que el patrón de injerto podría venir dado por diferentes poblaciones de progenitores que generan injerto a diferentes tiempos. Además, los progenitores hematopoyéticos de este segundo subtipo, poseen una tasa de proliferación mayor que los anteriores ya que el nivel de injerto humano aumenta a lo largo del trasplante llegando a alcanzar, en algunos casos, niveles de quimerismo de células humanas del 8.9 % en sangre periférica.

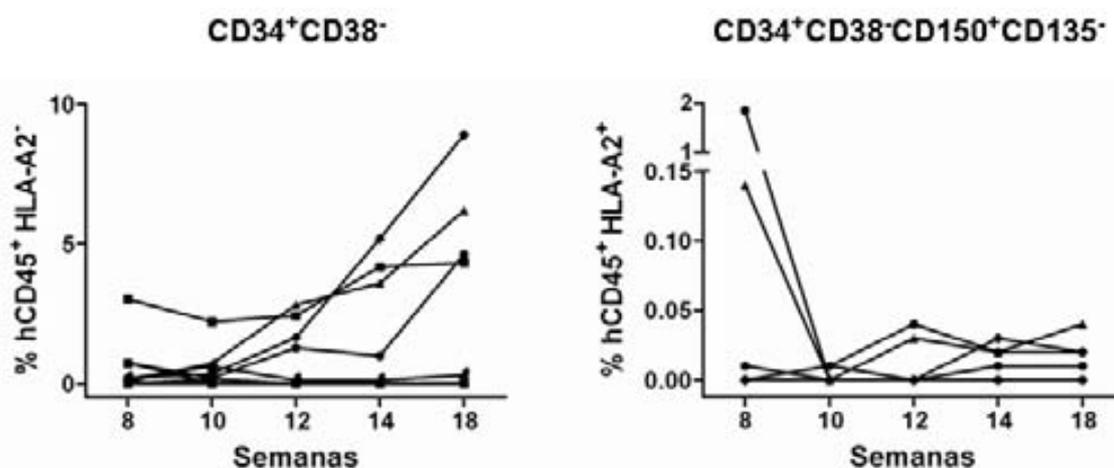


Figura 27. Seguimiento del nivel de quimerismo celular en sangre periférica de ratones trasplantados con la combinación de progenitores CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻. Se separaron de 100-200 células de cada población y se trasplantó la mezcla de las dos poblaciones a ratones neonatos NOD-*Rag1*^{null}*IL2rg*^{null} irradiados. Los progenitores CD34⁺CD38⁻ fueron aislados de unidades de cordón HLA-A2⁻ y los CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻

se obtuvieron a partir de unidades HLA-A2⁺. En el gráfico se ha representado la evolución del injerto de células humanas (hCD45⁺) a lo largo del tiempo en 17 ratones.

Sin embargo, de los ratones trasplantados con la mezcla de las dos poblaciones, las células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺) injertaban un 29.4 % (5/17) de los ratones trasplantados tanto a corto como a largo plazo. De la misma manera que en la población CD34⁺CD38⁻, en esta población también se generan diferentes patrones de cinética de injerto. Existen progenitores hematopoyéticos capaces de reconstituir a corto plazo que luego pierden la capacidad de reconstituir a largo plazo. Otros, tienen capacidad de reconstitución a largo plazo pero no a corto plazo. Y por último, existe un tercer tipo de progenitor con capacidad de reconstitución a corto plazo y que mantiene los niveles de injerto a largo plazo (figura 27). Aunque este último tipo de patrón de injerto podría ser debido a una misma HSC que da lugar a ST-HSC y LT-HSC, o bien a diferentes poblaciones de progenitores que generan injerto a diferentes tiempos.

Aún así, los niveles de injerto en sangre periférica alcanzados por células generadas a partir de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺) (0.3 % de hCD45⁺, en un rango que oscila entre el 0.01 y el 1.85 %) son inferiores a los niveles de quimerismo celular en sangre periférica generados por células de la población CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻) (1.2 % de hCD45⁺, en un rango que oscila entre el 0.01 y el 8.9 %). Lo que indicaría que los progenitores hematopoyéticos de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ también tienen una tasa de división baja *in vivo*.

8.1.2. Grupo de ratones trasplantados con progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻

El trasplante de de la combinación de dos poblaciones de progenitores en ratones irradiados con una dosis de irradiación subletal, podría dar lugar a una competencia por el anidamiento en la médula ósea entre ambas poblaciones. Este podría ser el motivo por el cual la población de progenitores CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ tiene niveles de injerto inferiores en cuanto a número de ratones con trasplante y porcentaje de células humanas que provienen de esta población. Por lo que se decidió estudiar la capacidad de reconstitución de las dos poblaciones por separado trasplantándolas de forma individual a ratones inmunodeficientes.

En el grupo de ratones trasplantados con la población CD34⁺CD38⁻, un 16.7 % (1/6) de los ratones tenían injerto en sangre periférica tanto a corto como largo plazo (figura 28).

En el grupo de ratones trasplantados con la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$, un 33.3 % (2/6) de los ratones tenían injerto de células humanas en sangre periférica. Se observaron cinéticas de injerto diferentes en los dos ratones con injerto de células humanas. Un ratón de los 6 analizados, tenía reconstitución de células humanas a corto plazo que se perdía a las 12 semanas después del trasplante. Y el otro ratón tenía reconstitución a corto plazo, que se mantenía a lo largo del tiempo (figura 28).

De forma similar a lo que sucedía en el grupo de ratones trasplantados con la combinación de las dos poblaciones, en los ratones trasplantados con las dos poblaciones de forma individual, el nivel de injerto de la población $CD34^+CD38^-$ (0.18% de $hCD45^+$ en un rango que oscila entre el 0.08 y el 0.35 %) era mayor que el los ratones trasplantados con progenitores $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ (0.06% de $hCD45^+$ en un rango que oscila entre el 0.03 y el 0.11 %) aunque la diferencia en los niveles de injerto no era tan acentuada como en el grupo en el que se trasplantó la combinación de las dos poblaciones (tabla 4).

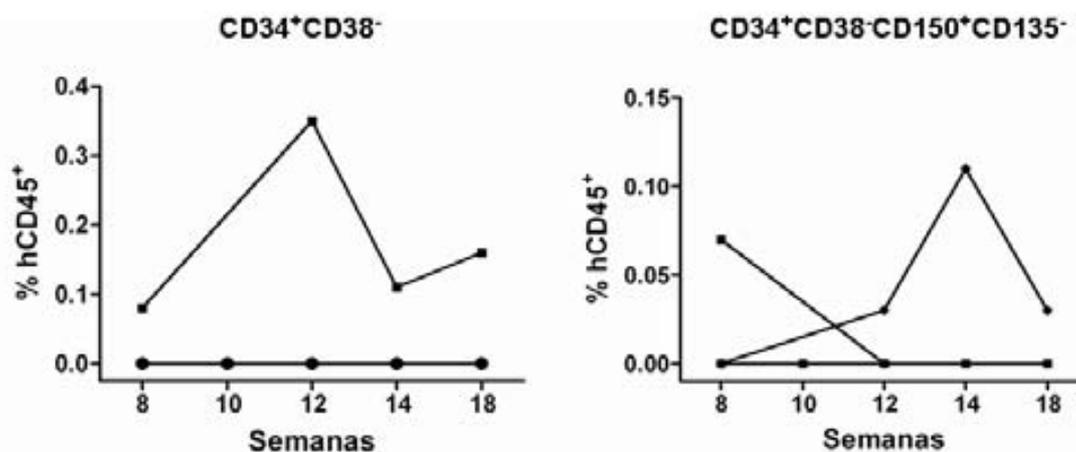


Figura 28. Seguimiento del nivel de quimerismo celular en sangre periférica de ratones trasplantados con progenitores $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ y $CD34^+CD38^-$. Se separaron de 100-200 células de cada población y se trasplantó cada población por separado en ratones neonatos *NOD-Rag1^{null}IL2rg^{null}* irradiados. En el gráfico se ha representado la evolución del injerto de células humanas ($hCD45^+$) a lo largo del tiempo en 6 ratones de cada grupo de trasplante.

8.2. Análisis del quimerismo celular en médula ósea

Al final de cada experimento se analizó, a las 18-26 semanas después del trasplante, el nivel de injerto hematopoyético humano en médula ósea a los tres grupos de ratones trasplantados.

El grupo de trasplante con la combinación de las dos poblaciones tenía injerto en médula ósea, tanto de células generadas a partir de la población CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻) como de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺). De los ratones trasplantados, los progenitores CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻) generaban injerto en un 35.3 % (6/17) de los ratones, con una media del porcentaje de quimerismo celular alcanzado del 11.52 % que oscila entre valores del 0.01 - 53.36 %.

Por otro lado, los progenitores de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺) injertaban en un 35.3 % (6/17) de los ratones trasplantados con la mezcla de las dos poblaciones, con una media del porcentaje de quimerismo celular alcanzado del 0.9 % que oscila entre valores del 0.01 - 1.65 % (tabla 5).

Tabla 5. Resumen del injerto a largo plazo (>18 semanas) en médula ósea de las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻.

Poblaciones	Media de células inyectadas (Rango)	% de ratones con injerto humano en MO a largo plazo	Media del % de quimerismo en MO (Rango)
CD34⁺CD38⁻	169 (90-200)	35.3 % (6/17)	11.52 % (0.01-53.36)
+			
CD34⁺CD38⁻ CD150⁺CD135⁻	169 (90-200)	35.3 % (6/17)	0.9 % (0.01-1.65)
CD34⁺CD38⁻	107 (77-143)	0 % (0/6)	0 %
CD34⁺CD38⁻ CD150⁺CD135⁻	107 (77-143)	33 % (2/6)	0.025 % (0.01-0.04)

Tal y como se observó en sangre periférica, los niveles de injerto en médula ósea alcanzados por células generadas a partir de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺) son inferiores a los niveles de quimerismo celular generados en médula ósea por células de la población CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻).

En el grupo de ratones trasplantados con la población CD34⁺CD38⁻ de forma individual, un 0 % (0/6) de los ratones tenían injerto en médula ósea (figura 29a). Y en el grupo de ratones trasplantados con la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻, un 33 % (2/6) de los ratones tenían injerto en médula ósea, con una media del porcentaje de quimerismo celular alcanzado del 0.025 % que oscila entre valores del 0.01 – 0.04 %.

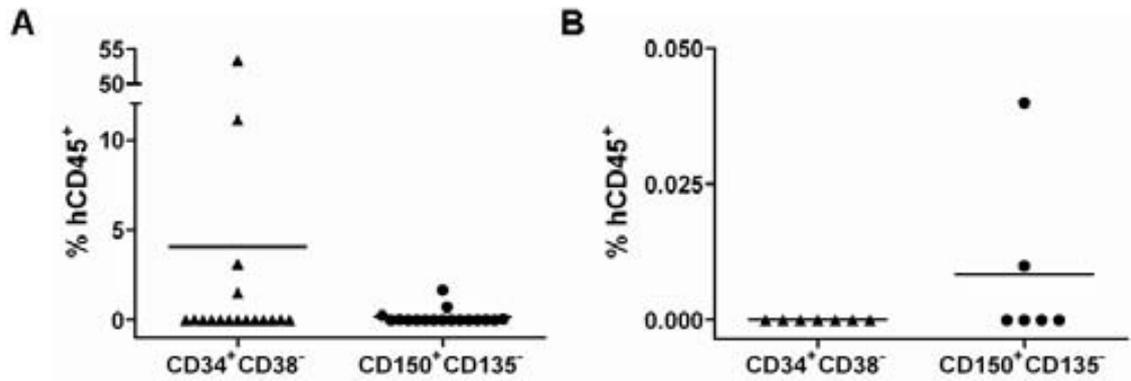


Figura 29. Nivel de quimerismo celular en médula ósea de ratones trasplantados con la combinación de progenitores $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$. Se separaron 100-200 células de cada población y se trasplantó, a) la mezcla de las dos poblaciones y, b) cada población por separado, a ratones neonatos $NOD-Rag1^{null}IL2rg^{null}$ irradiados. Los progenitores $CD34^+CD38^-$ fueron aislados de unidades de cordón HLA-A2⁻ y los $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ se obtuvieron a partir de unidades HLA-A2⁺. En el gráfico se ha representado el nivel de injerto de células humanas (hCD45⁺) en médula ósea.

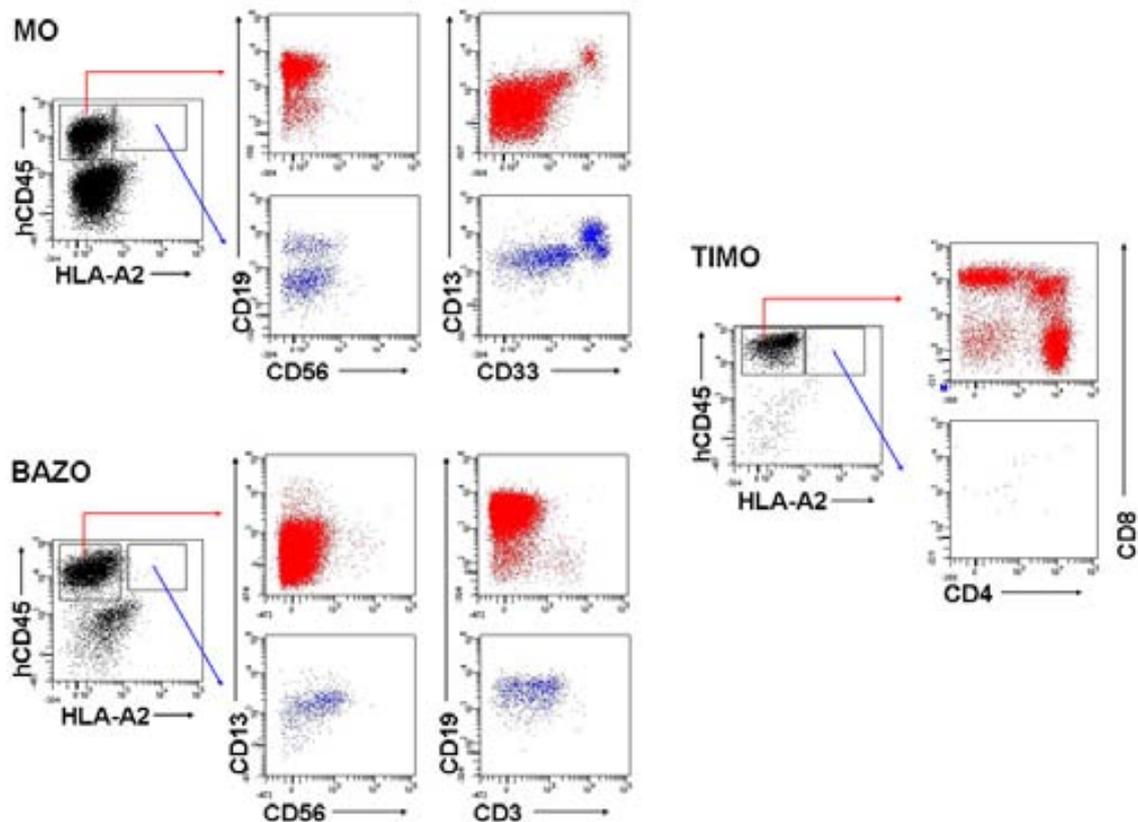


Figura 30. Ejemplo de análisis de la capacidad multipotencial de los progenitores hematopoyéticos $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ *in vivo*. Se analizó mediante citometría de flujo la presencia de células humanas de los diferentes linajes hematopoyéticos en la médula ósea (MO), el bazo y el timo de los ratones con injerto de células humanas. Las células generadas a partir de la población $CD34^+CD38^-$ (hCD45⁺HLA-A2⁻) se representan en

rojo y las células generadas a partir de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (hCD45⁺HLA-A2⁺) se representan en azul.

Por otro lado, se analizó la presencia de células humanas de los diferentes linajes hematopoyéticos en la médula ósea, el bazo y el timo de los ratones con injerto de células humanas (figura 30). Tanto los progenitores hematopoyéticos de la población CD34⁺CD38⁻ (hCD45⁺HLA-A2⁻) como los de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (hCD45⁺HLA-A2⁺) eran capaces de generar células mieloides (CD13⁺ y CD33⁺), linfocitos B (CD19⁺), células NK (CD56⁺) y linfocitos T (CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺); analizadas en la médula ósea, el bazo y el timo. Estos resultados sugieren que ambas poblaciones poseen capacidad multipotencial *in vivo*, y son capaces de generar células de los diferentes linajes hematopoyéticos cuando se trasplantan en ratones inmunodeficientes.

8.3. Trasplante secundario

El trasplante de progenitores hematopoyéticos humanos a ratones inmunodeficientes ha revelado que las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻ poseen capacidad de migración a la médula ósea, anidamiento y diferenciación dando lugar a la reconstitución del huésped tanto a corto como largo plazo. Esto indica que estas poblaciones contienen progenitores hematopoyéticos con capacidad de reconstitución a corto (ST-HSC) y largo plazo (LT-HSC). Sin embargo, estas aproximaciones no permiten evaluar la capacidad de automantenimiento de los progenitores hematopoyéticos, que es una de las principales propiedades que caracterizan a las células madre hematopoyéticas. Para ello se realizaron trasplantes de progenitores hematopoyéticos aislando las células de la médula ósea del trasplante primario y volviéndolas a trasplantar a un segundo huésped. Así, las células capaces de reconstituir el segundo huésped provendrían de un progenitor generado a partir de una división simétrica del progenitor aislado directamente de la sangre de cordón umbilical y trasplantado en el primer huésped.

En el análisis de médula ósea del trasplante primario se identificó una población de células CD34⁺ que provenían tanto de progenitores trasplantados CD34⁺CD38⁻ (HLA-A2⁻) como de progenitores CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ (HLA-A2⁺) (figura 31). Por lo que se decidió trasplantar en el huésped secundario tanto la médula ósea total como células CD34⁺ aisladas por selección inmunomagnética de la médula ósea de los ratones del trasplante primario.

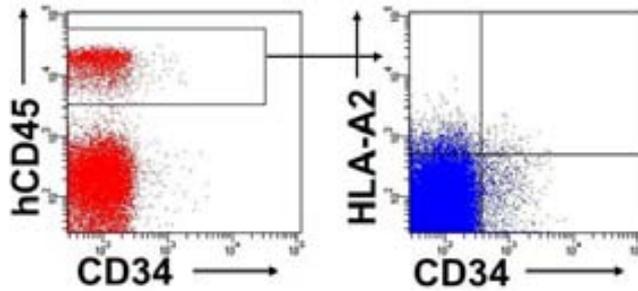


Figura 31. Ejemplo de análisis de células CD34⁺ en la médula ósea de ratones trasplantados con células CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻

Se eutanasiaron 3 ratones con injerto de ambas poblaciones en el trasplante primario, y se aislaron las células de la médula ósea. De estas células, una fracción fue trasplantada a ratones neonatos irradiados NOD-*Rag1*^{null}/*IL2rg*^{null} y la otra fracción fue utilizada para aislar células humanas CD34⁺. Se trasplantaron 500.000 células de médula ósea totales por ratón y de 6.000 a 60.000 células CD34 purificadas del trasplante primario por ratón.

Se trasplantaron 4 ratones con la médula ósea del trasplante primario y 5 ratones con células humanas CD34⁺ aisladas de la médula ósea del trasplante primario. Por lo que las células generadas a partir de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ eran HLA-A2⁺ y las generadas a partir de progenitores CD34⁺CD38⁻ eran HLA-A2⁻.

Después de 8 semanas del trasplante secundario, los ratones fueron eutanasiados y se analizó el nivel de quimerismo celular y molecular en la médula ósea.

Tabla 6. Resumen del injerto del trasplante secundario en médula ósea de las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻.

Población	Trasplante de células CD34 purificadas		Trasplante de MO
	% de ratones con injerto humano	Media del % de quimerismo (Rango)	% de ratones con injerto humano
CD34⁺CD38⁻	40 % (2/5)	6 % (1-11)	0 % (0/4)
+			
CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻	40 % (2/5)	0.015 % (0.01-0.02)	0 % (0/4)

En el grupo de ratones trasplantado con células humanas CD34⁺, un 40 % (2/5) de los ratones tenían injerto en médula ósea de células generadas a partir de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ del trasplante primario, alcanzando niveles de

quimerismo celular del 1 al 11 %. Además, este 40 % de ratones también tenían injerto de células generadas a partir de progenitores $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ del trasplante primario. Sin embargo, tal y como se observó en los trasplantes primarios, los niveles de quimerismo celular en el trasplante secundario, generados a partir de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ (0.015 %), también eran inferiores a los de la población $CD34^+CD38^-$ (6 %).

Los trasplantes secundarios muestran que las dos poblaciones son capaces de injertar en un segundo huésped y, por lo tanto, incluyen progenitores hematopoyéticos con capacidad de automantenimiento y renovación.

Por otro lado, los ratones trasplantados con células totales de médula ósea no tenían injerto de células humanas en el trasplante secundario. Este resultado sugiere que es necesario un enriquecimiento en progenitores hematopoyéticos previo al trasplante para favorecer el injerto de los progenitores en la médula ósea.

8.4. Quimerismo molecular

El análisis por citometría de flujo del nivel de injerto humano, según la expresión del antígeno hCD45, reveló que el quimerismo celular obtenido a partir de la población de progenitores hematopoyéticos $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ era bajo. Esto podría ser debido a la baja proliferación de las células que forman esta población.

Para aumentar la probabilidad de detección de injerto de células humanas y confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo, se utilizó una técnica más sensible. Se evaluó el quimerismo molecular mediante PCR para detectar la presencia de transcritos de origen humano en células de médula ósea extraídas en el punto final de los trasplantes primarios y secundarios. Se amplificó el satélite α del cromosoma 17 humano (hCh17) (Bueno, Montes et al. 2010) y una región del gen HLA-A2 para detectar las células generadas a partir de los progenitores $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ (HLA-A2⁺).

La presencia de quimerismo humano detectada por citometría de flujo fue confirmada por PCR. Además el porcentaje de ratones con injerto de células humanas detectado por PCR en médula ósea, era mayor que el porcentaje de ratones con quimerismo celular detectado en médula ósea en los tres grupos de trasplante (tabla 7).

El análisis del quimerismo molecular en los ratones del trasplante secundario reveló que el 100 % de los ratones tenían injerto de células humanas en médula ósea (hCrh17⁺). Aunque por citometría de flujo parecía que el grupo trasplantado con

células de médula ósea no tenía injerto de células humanas, por PCR fue posible detectar amplificación del satélite α del cromosoma 17 humano en todos los ratones trasplantados (tabla 8).

Tabla 7. Resumen del injerto molecular a largo plazo (>18 semanas) en médula ósea de las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻.

Población	% de ratones con injerto humano (hCrh17 ⁺)	% de ratones con injerto humano HLA-A2 ⁺	% de ratones con injerto humano HLA-A2 ⁺ / hCrh17 ⁺
CD34⁺CD38⁻ (HLA A2⁻) CD150⁺CD135⁻ (HLA A2⁺)	53 % (9/17)	41.2 % (7/17)	78 % (7/9)
CD34⁺CD38⁻	33 % (2/6)	-	-
CD34⁺CD38⁻ CD150⁺CD135⁻	50 % (3/6)	-	-

Tabla 8. Resumen del injerto molecular del trasplante secundario en médula ósea de las poblaciones CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ y CD34⁺CD38⁻.

Población	Trasplante de células CD34 purificadas		Trasplante de MO	
	% de ratones con injerto humano (hCrh17 ⁺)	% de ratones con injerto humano HLA-A2 ⁺ / hCrh17 ⁺	% de ratones con injerto humano (hCrh17 ⁺)	% de ratones con injerto humano HLA-A2 ⁺ / hCrh17 ⁺
CD34⁺CD38⁻ (HLA A2⁻) CD150⁺CD135⁻ (HLA A2⁺)	100 % (5/5)	60 % (3/5)	100 % (4/4)	25 % (1/4)

PARTE II. EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS

En la sección 1 de los resultados se ha estudiado como se comportan dos poblaciones diferentes sometidas a las mismas condiciones experimentales *in vitro*, y al mismo microambiente medular *in vivo*. En cambio, en esta sección se pretende estudiar como afectan diferentes modificaciones del entorno al comportamiento de las células madre hematopoyéticas.

Se estudió el efecto del estroma celular, la activación de la vía de Notch y la adición de un inhibidor de las histona deacetilasas, el ácido valproico, en la expansión y diferenciación de progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺CD38⁻ aislados de sangre de cordón umbilical.

1. EFECTO DEL ESTROMA Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE NOTCH

El microambiente celular influye en el mantenimiento y la proliferación de los progenitores hematopoyéticos. Inicialmente, se utilizaron sistemas de expansión basados en el uso de citoquinas solubles como SCF, TPO, interleuquinas 1, 3, 6, 11, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, y EPO. Sin embargo, estos sistemas de cultivo no resultaron en una expansión significativa de los progenitores hematopoyéticos (Sauvageau, Iscove et al. 2004). También han sido desarrollados diferentes ensayos clínicos utilizando cócteles de citoquinas (como por ejemplo SCF, TPO y G-CSF), en los cuales sólo se ha observado un aumento moderado en el número de progenitores hematopoyéticos (Bachier, Gokmen et al. 1999; Shpall, Quinones et al. 2002; Boiron, Dazey et al. 2006).

Existen numerosos estudios que demuestran que el estroma transmite múltiples señales a través de factores solubles como las citoquinas, proteínas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión, que controlan la proliferación y el mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos. El co-cultivo de progenitores hematopoyéticos con células estromales ha sido utilizado para la expansión *ex vivo* de progenitores hematopoyéticos (Kusadasi, Koevoet et al. 2001; Fei, Wu et al. 2007; da Silva, Goncalves et al. 2010).

Por otro lado, numerosas publicaciones hacen referencia al papel de la vía de Notch y los contactos intercelulares con el estroma medular, en la regulación de las células madre hematopoyéticas. Se ha visto que la activación de la vía de Notch puede favorecer el mantenimiento y la expansión de las HSC (Ohishi, Varnum-Finney et al. 2002; Delaney, Varnum-Finney et al. 2005; Delaney, Heimfeld et al. 2010).

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos, se decidió estudiar la influencia de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical cultivados con células estromales.

Los tres sistemas experimentales estudiados fueron el cultivo de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ sin células estromales, con células estromales OP9 y con células estromales OP9-DL1. En este tipo de ensayos, las células estromales actúan como células de soporte al mantenimiento, expansión y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Las células estromales OP9-DL1 son células estromales que expresan DL1 que es uno de los ligandos de la vía de Notch. Por lo que permiten estudiar como afecta la activación de la vía de Notch al mantenimiento, expansión y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

Se cultivaron 10.000 células CD34⁺CD38⁻ en tres sistemas experimentales diferentes. En todos ellos el medio de cultivo utilizado MEM α fue suplementado con suero fetal bovino y citoquinas SCF (Stem Cell Factor), TPO (trombopoyetina) y Flt3L (ligando del receptor Flt3) a una concentración final de 10 ng/ml. Se realizó un recuento del número de células vivas a los 6 y 9 días de cultivo, y se analizaron por citometría de flujo las diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos generadas en cultivo a los 4, 6 y 9 días.

Las poblaciones de progenitores hematopoyéticos estudiadas tras el cultivo fueron: CD34⁺, CD34⁻, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, progenitor común mieloide (CMP) CD34⁺CD38⁺CD45RA⁻CD123⁺, progenitor granulomonocítico (GMP) CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD123⁺, progenitor megacariocítico-eritrocítico (MEP) CD34⁺CD38⁻CD45RA⁺CD123⁺ y progenitor común linfoide (CLP) CD34⁺CD38⁻CD7⁺.

1.1. Análisis de los progenitores hematopoyéticos tras el cultivo

A diferentes tiempos de cultivo, se realizó el recuento del número total de células nucleadas vivas. Esto permite analizar la capacidad de proliferación de la población CD34⁺CD38⁻ en las diferentes condiciones experimentales.

El sistema de cultivo en el que se obtuvo un mayor índice de expansión fue la condición en la que se cultivaron los progenitores hematopoyéticos sobre una monocapa de células estromales en la ausencia de la señal de Notch (OP9). Además, tal y como se observa en la figura 32, durante los primeros días de cultivo la expansión que se obtuvo no difiere respecto a las otras condiciones experimentales. Sin embargo, en la segunda fase del cultivo (a partir del día 6), la proliferación de las

células cultivadas con el estroma OP9 se disparó llegando a alcanzar un índice de expansión del 105x. Mientras que en el sistema de cultivo sin estroma se obtuvo un índice de expansión de 29x, y un 21x en el sistema OP9-DL1. Por lo tanto, el índice de expansión conseguido en el sistema experimental OP9 fue 5 veces superior al alcanzado cuando en este sistema se activaba la vía de Notch, o cuando se cultivaron los progenitores en ausencia de células estromales de soporte (figura 32).

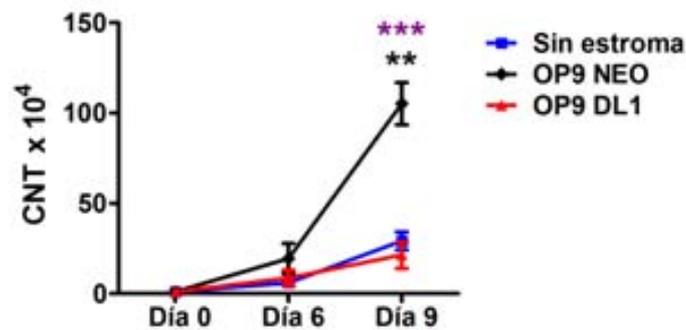


Figura 32. Número de células nucleadas totales (CNT) después de la expansión. Las células vivas generadas fueron contadas con azul de tripano, después del cultivo de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical en tres condiciones experimentales diferentes: sin células estromales (sin estroma), con células estromales (OP9 NEO) y con células estromales que expresan DL1 (OP9-DL1). Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: cultivo sin estroma y OP9 (*), cultivo sin estroma y OP9-DL1 (*), OP9 y OP9-DL1 (*).

Por otro lado, se estudió el fenotipo y la expansión de las diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos generadas a lo largo del cultivo en las tres condiciones experimentales. A partir del porcentaje obtenido por citometría de flujo de cada población y el número de CNT, se calculó el número total de células generadas de cada población analizada.

En primer lugar, se estudió la población de progenitores hematopoyéticos CD34⁺. Esta población está formada por un grupo heterogéneo de progenitores inmaduros y progenitores más diferenciados.

Si se observa la evolución del porcentaje de las células CD34⁺ a lo largo del tiempo, éste descendía a medida que avanzaba el cultivo en los sistemas de cultivo sin estroma y OP9. Sin embargo, el porcentaje de células CD34⁺ se mantenía estable y a niveles altos cuando las células progenitoras eran cultivadas con OP9-DL1.

Por el contrario, el porcentaje de células CD34⁻ aumentaba a lo largo del cultivo en las condiciones experimentales de cultivo sin estroma y OP9; y se mantenía estable a niveles bajos en la condición OP9-DL1 (figura 33).

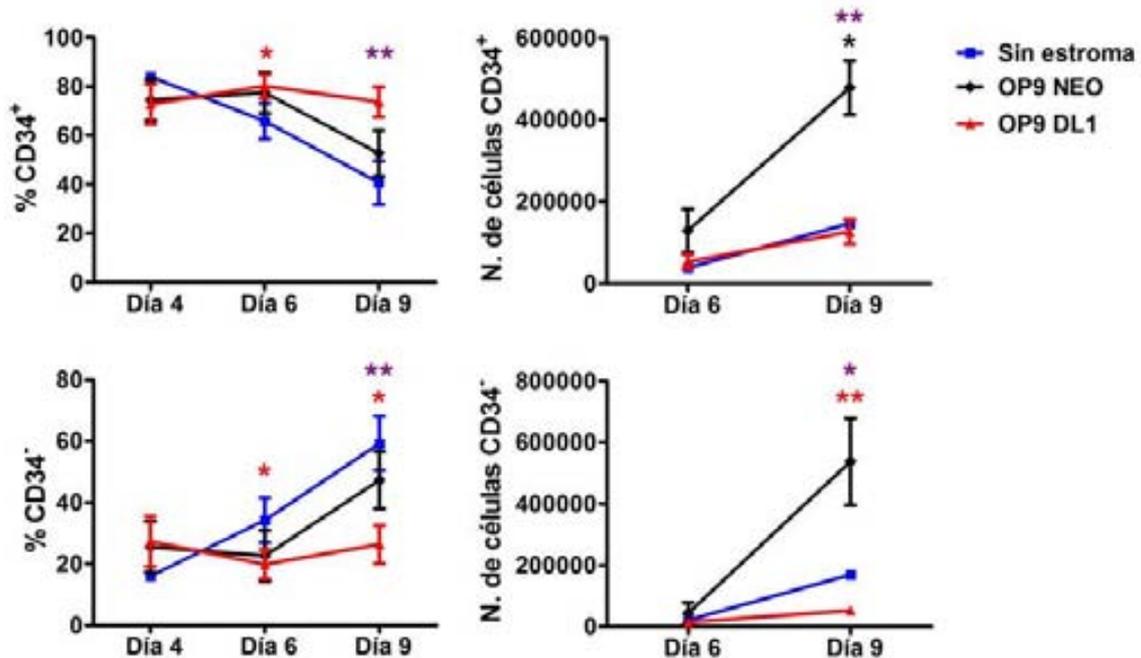


Figura 33. Análisis de la evolución de las poblaciones CD34⁺ y CD34⁻. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: cultivo sin estroma y OP9 (*), cultivo sin estroma y OP9-DL1 (*), OP9 y OP9-DL1 (*).

La comparación de los datos de los porcentajes con los datos del número de células totales de cada población, sugiere que existen progenitores hematopoyéticos en cultivo que se expanden ya que el número de CD34⁺ aumenta. Pero a su vez, también tienen lugar procesos de diferenciación celular ya que el número de células CD34⁻ también aumenta.

Por otro lado, la activación de la vía de Notch mantiene el porcentaje de células CD34⁺ permitiendo una ligera expansión de la población. El resultado del cultivo es una población expandida con un mayor enriquecimiento en progenitores hematopoyéticos. Aún así, la condición experimental que más expansión alcanza de progenitores hematopoyéticos es el cultivo con OP9 debido al mayor índice de proliferación observado en este sistema experimental. Pero esta condición genera una población menos enriquecida en progenitores ya que la elevada proliferación favorece los procesos de diferenciación.

La población CD34⁺ es una población muy heterogénea de progenitores hematopoyéticos. Con la finalidad de estudiar una población más enriquecida en progenitores hematopoyéticos inmaduros, se analizó como evolucionaba la población CD34⁺CD38⁻ y, a su vez, la población CD34⁺CD38⁺ que incluye progenitores hematopoyéticos más diferenciados (figura 34).

En ausencia de células estromales de soporte, la población de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ desaparece durante los primeros días de cultivo, y en el sistema OP9 disminuye a lo largo del cultivo aunque a un ritmo más lento. Sin embargo, la activación de la vía de Notch frena aún más esta disminución. Esto puede ser debido a que el estroma favorece el mantenimiento de los progenitores en cultivo y la activación de la vía de Notch potencia este efecto. Tal y como se observó al analizar la población CD34⁺, la elevada proliferación de las células en el sistema OP9 hace que sea este el sistema en el que mayor número de células CD34⁺CD38⁻ se genere. Sin embargo, la activación de la vía de Notch reduce la proliferación favoreciendo el enriquecimiento en progenitores hematopoyéticos de la población generada al final del cultivo.

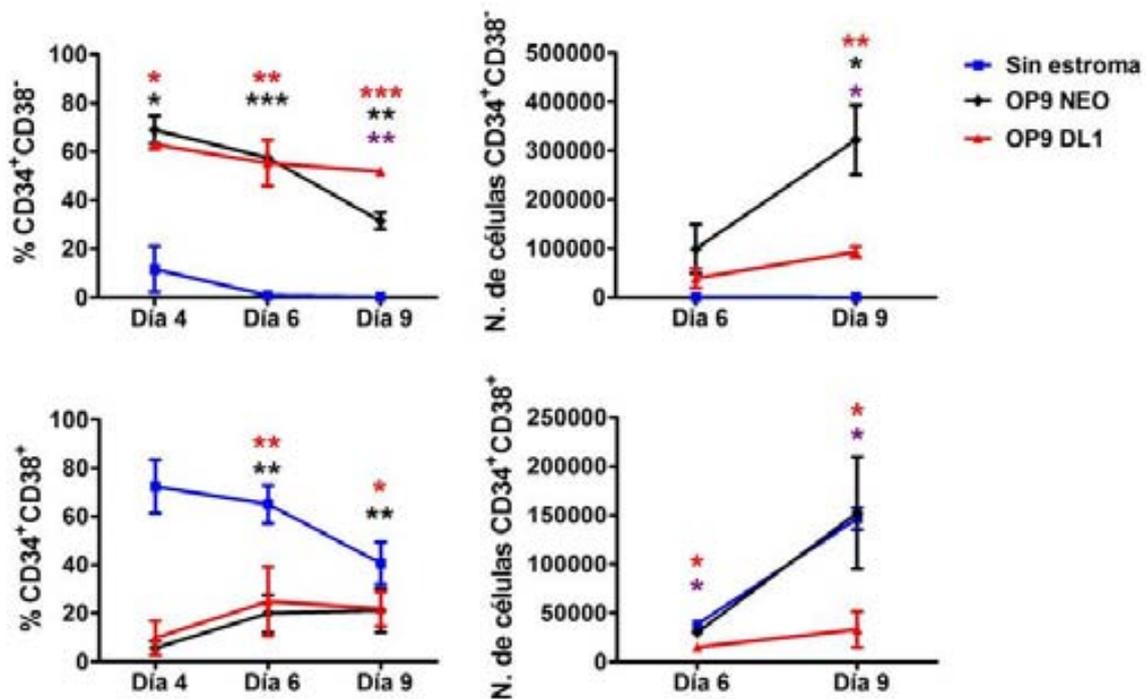


Figura 34. Análisis de la evolución de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁺. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: cultivo sin estroma y OP9 (*), cultivo sin estroma y OP9-DL1 (*), OP9 y OP9-DL1 (*).

Respecto a la población CD34⁺CD38⁺, su porcentaje disminuye a medida que avanza el cultivo sin estroma. En cambio, en las otras dos condiciones el porcentaje de la población CD34⁺CD38⁺ aumenta ligeramente durante los primeros días de cultivo para luego estabilizarse.

En los sistemas con estroma existe una mayor proporción de células CD34⁺CD38⁻ y por el contrario una menor proporción de células CD34⁺CD38⁺. Este efecto sugiere que el estroma favorece la expansión y mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos reduciendo los procesos de diferenciación. Este efecto se ha observado en el análisis de poblaciones heterogéneas de progenitores hematopoyéticos humanos.

1.2. Análisis de progenitores hematopoyéticos de linaje tras el cultivo

Con el objetivo de analizar el efecto del estroma y la activación de la vía de Notch en la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia un linaje específico, se estudió la evolución de los diversos progenitores comprometidos de linaje CMP, GMP, MEP y CLP, en los tres sistemas de cultivo (figura 35).

El cultivo sin estroma acelera la aparición de progenitores mieloides y se mantiene relativamente elevado a lo largo del cultivo respecto al resto de progenitores de linaje analizados en esta condición experimental. De forma similar, el cultivo de progenitores hematopoyéticos con células estromales aumentaba el número de CMP, GMP y MEP observado al inicio del cultivo. Por lo que se favorece la diferenciación hacia linaje mieloide y eritroide.

Por el contrario, el cultivo con células estromales y la activación de la vía de Notch era en el único sistema en el que se observaba un mayor número y porcentaje de CLP. El número de CMP, GMP y MEP obtenido bajo estas condiciones experimentales era el más bajo comparado con el cultivo sin estroma o con OP9. Esto sugiere que la activación de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos favorece la diferenciación linfoide.

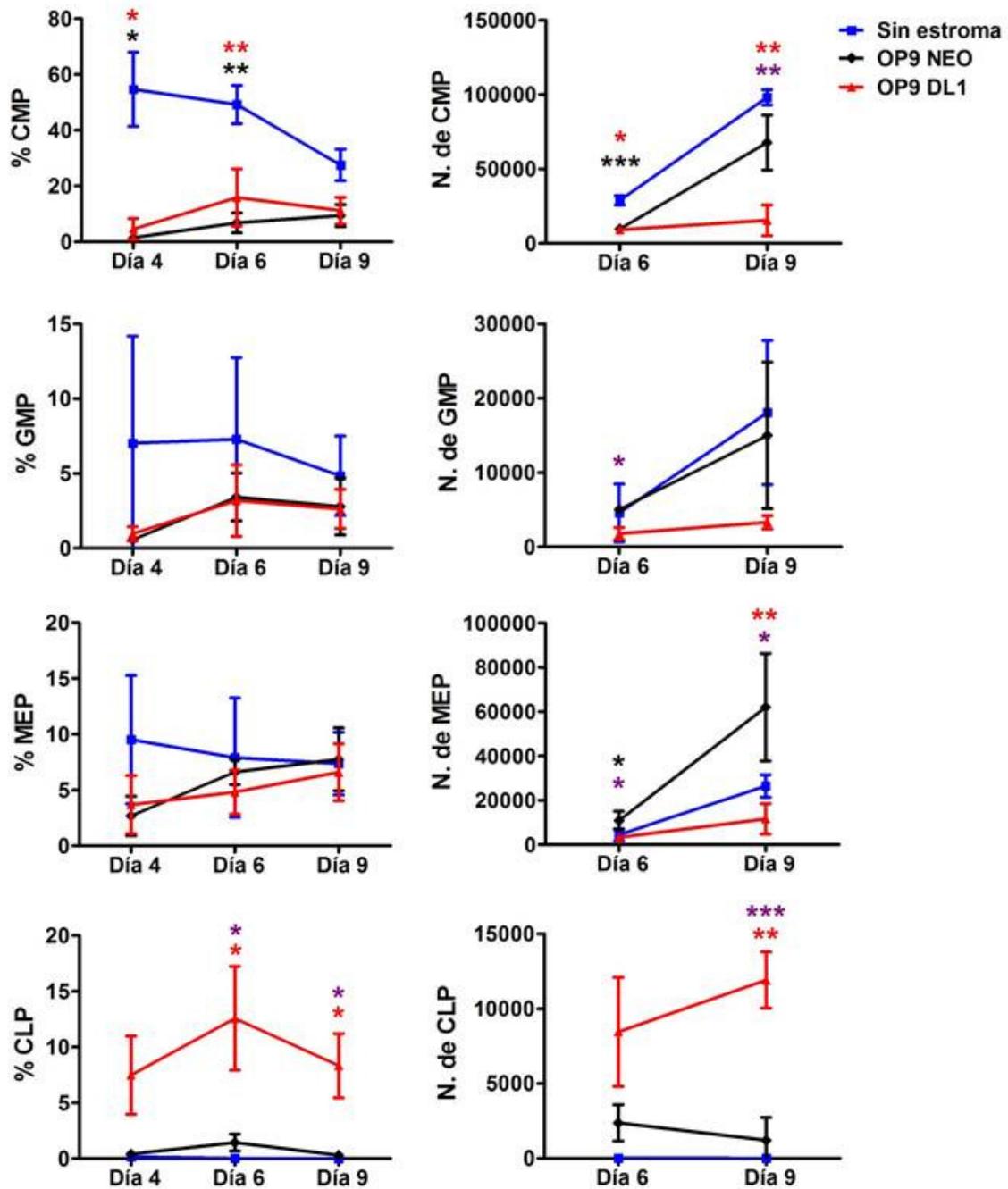


Figura 35. Análisis de la evolución de las poblaciones CMP, GMP, MEP y CLP. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: cultivo sin estroma y OP9 (*), cultivo sin estroma y OP9-DL1 (*), OP9 y OP9-DL1 (*).

2. EFECTO DEL ÁCIDO VALPROICO (VPA)

El ácido valproico es un inhibidor de las histona deacetilasas que actúa como agente modulador de los patrones de expresión génica. Además existen evidencias de la influencia del ácido valproico en la expansión de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ *in vitro* (Bug, Gul et al. 2005; De Felice, Tatarelli et al. 2005). Se ha observado que el VPA actúa como un regulador epigenético del mantenimiento de las características que definen las células madre hematopoyéticas, y de la diferenciación de los progenitores comprometidos a los diferentes linajes.

Con la finalidad de estudiar el efecto del ácido valproico en el mantenimiento, expansión y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos, se realizaron ensayos de expansión adicionando ácido valproico al cultivo.

Se cultivaron 10.000 células CD34⁺CD38⁻ en los tres sistemas experimentales utilizados en el estudio de los efectos de la vía de Notch, pero esta vez analizando como afecta la adición de ácido valproico al medio de cultivo, al mantenimiento, expansión y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.

Las poblaciones de progenitores hematopoyéticos estudiadas fueron: CD34⁺, CD34⁻, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, progenitor común mieloide (CMP) CD34⁺CD38⁺CD45RA⁻CD123⁺, progenitor granulomonocítico (GMP) CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD123⁺, progenitor megacariocítico-eritrocítico (MEP) CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD123⁺ y progenitor común linfoide (CLP) CD34⁺CD38⁻CD7⁺.

2.1. Análisis del efecto del VPA sobre progenitores hematopoyéticos tras el cultivo

Inicialmente, se hizo un estudio de cómo afecta el tratamiento con VPA en la capacidad de proliferación de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ cultivados en los tres sistemas experimentales.

El efecto del VPA en el cultivo de progenitores hematopoyéticos en ausencia de estroma, provocó una disminución de los índices de proliferación. El índice de proliferación cayó de un 20x, sin ácido valproico, a un 5x, cuando las células eran tratadas con VPA (figura 36).

El tratamiento con VPA de las células cultivadas con células estromales OP9, reducía a la mitad el índice de proliferación respecto a las células no tratadas con VPA. Además se observó un efecto dosis dependiente, donde la proliferación se veía más

afectada a dosis crecientes de VPA. Sin embargo, el tratamiento con VPA en células con la vía de Notch activada, no afectaba de forma significativa a la expansión de los progenitores hematopoyéticos.

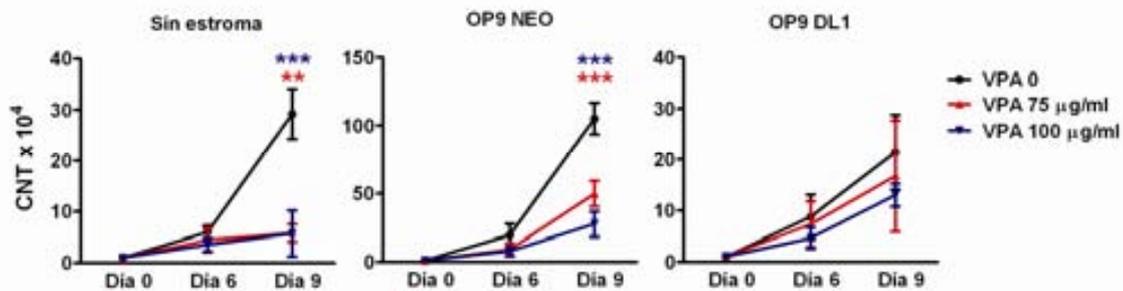


Figura 36. Número de células nucleadas totales (CNT) después del tratamiento con VPA. Las células vivas generadas fueron contadas con azul de tripano, después del cultivo de progenitores hematopoyéticos $CD34^+CD38^-$ de sangre de cordón umbilical en tres condiciones experimentales diferentes: sin células estromales (sin estroma), con células estromales (OP9 NEO) y con células estromales que expresan DL1 (OP9 DL1); añadiendo a cada condición tres concentraciones de VPA diferentes (0, 75 y 100 µg/ml). Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 µg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 µg/ml (*).

Por otro lado, se estudió el fenotipo y la expansión de las diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos generadas a lo largo del cultivo con VPA en las tres condiciones experimentales. A partir del porcentaje obtenido por citometría de flujo de cada población y el número de CNT, se calculó el número total de células generadas de cada población analizada.

En primer lugar, se estudió la población de progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ (figura 37). El tratamiento con VPA aumentaba el porcentaje de esta población en las condiciones de cultivo sin estroma y OP9. Sin embargo, debido a que el tratamiento reduce la proliferación de las células en estas dos condiciones, el número total de células $CD34^+$ tratadas con VPA era inferior al obtenido sin el tratamiento.

En cambio, el tratamiento con VPA en progenitores hematopoyéticos con la vía de Notch activada, no afectaba al porcentaje ni al número total de células $CD34^+$.

El análisis de la evolución de la población $CD34^-$ en las condiciones de cultivo sin estroma y OP9, mostraba que el tratamiento con VPA reducía el porcentaje y el número de células $CD34^-$ obtenidas al final del cultivo. En cambio, el tratamiento con VPA en progenitores hematopoyéticos con la vía de Notch activada, sólo afectaba reduciendo el número total de células $CD34^-$ (figura 38).

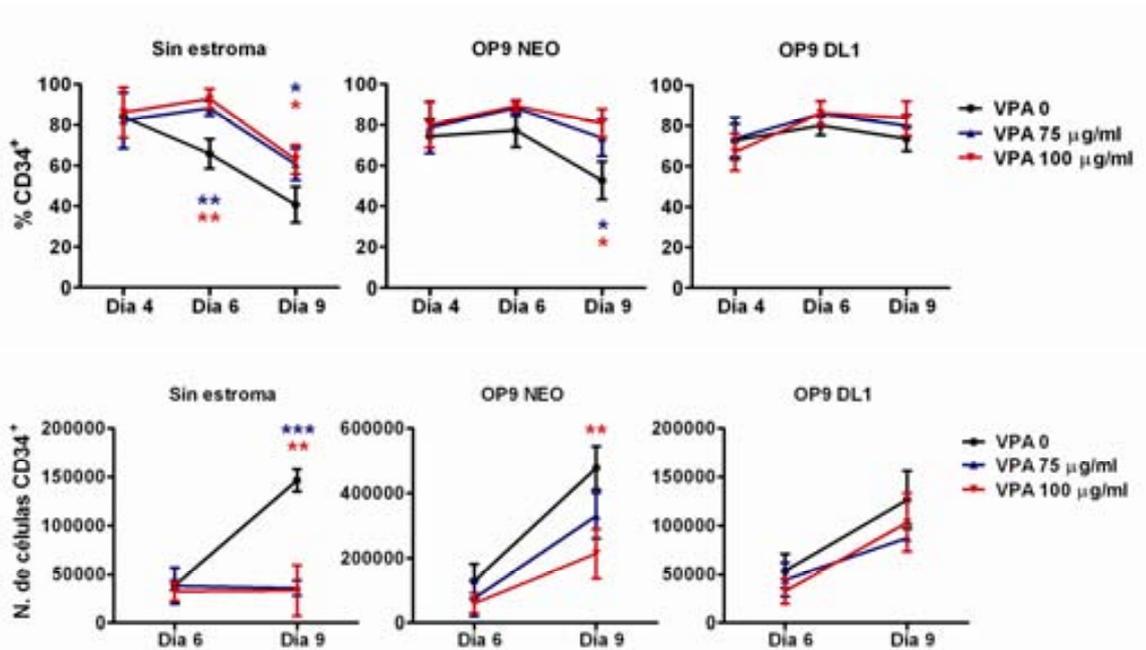


Figura 37. Análisis de la evolución de la población CD34⁺ en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 µg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 µg/ml (*).

Por otro lado, se estudió como afectaba el tratamiento con VPA a una población más enriquecida en progenitores hematopoyéticos. Este tratamiento no afectaba a la pérdida en porcentaje de la población CD34⁺CD38⁻ en la condición de cultivo sin estroma. En cambio, cuando los progenitores hematopoyéticos eran cultivados con células estromales OP9, la reducción del porcentaje de células CD34⁺CD38⁻ disminuía llegando a alcanzar porcentajes similares a los obtenidos cuando se activaba la vía de Notch (figura 39).

El hecho de que el VPA disminuya la proliferación en el cultivo con OP9, hacía que el número de células CD34⁺CD38⁻ final tratadas con VPA fuese inferior aunque el porcentaje era mayor. Aunque la proliferación se viera afectada el número total de células obtenidas era mayor que en células con la vía de Notch activada.

El tratamiento con VPA reduce la proliferación, disminuyendo el número de células CD34⁺CD38⁺ en las condiciones de cultivo sin estroma y OP9, y aumentando el porcentaje de la población cuando los progenitores eran cultivados en ausencia de células estromales (figura 40).

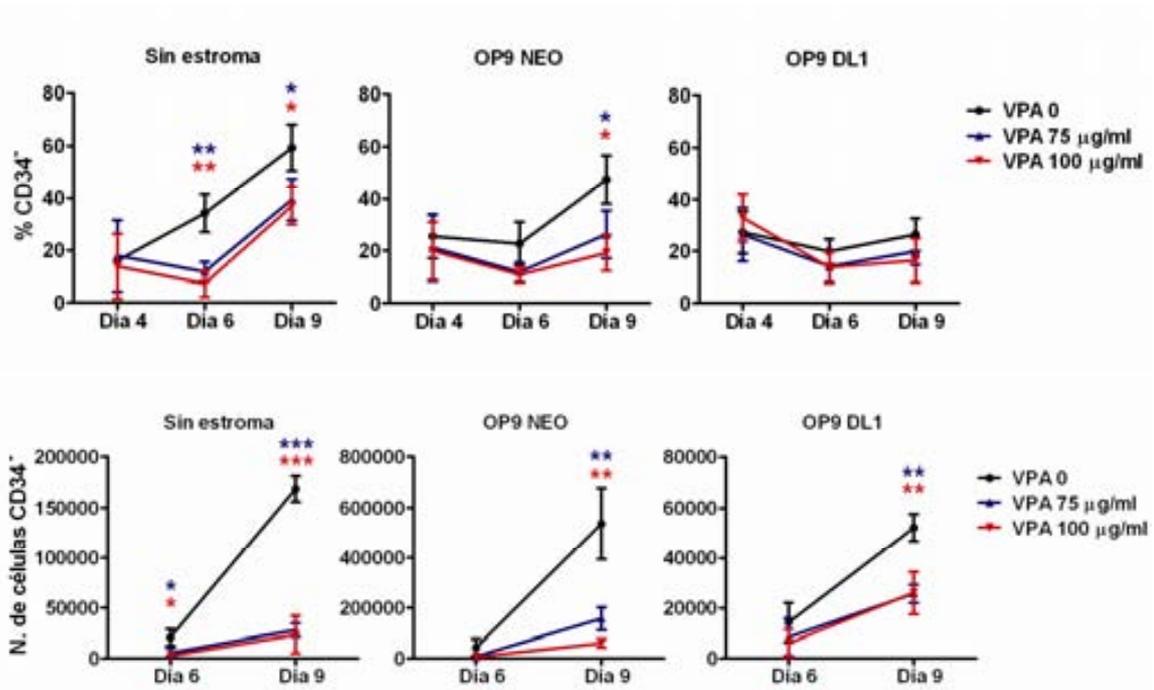


Figura 38. Análisis de la evolución de la población CD34⁺ en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 µg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 µg/ml (*).

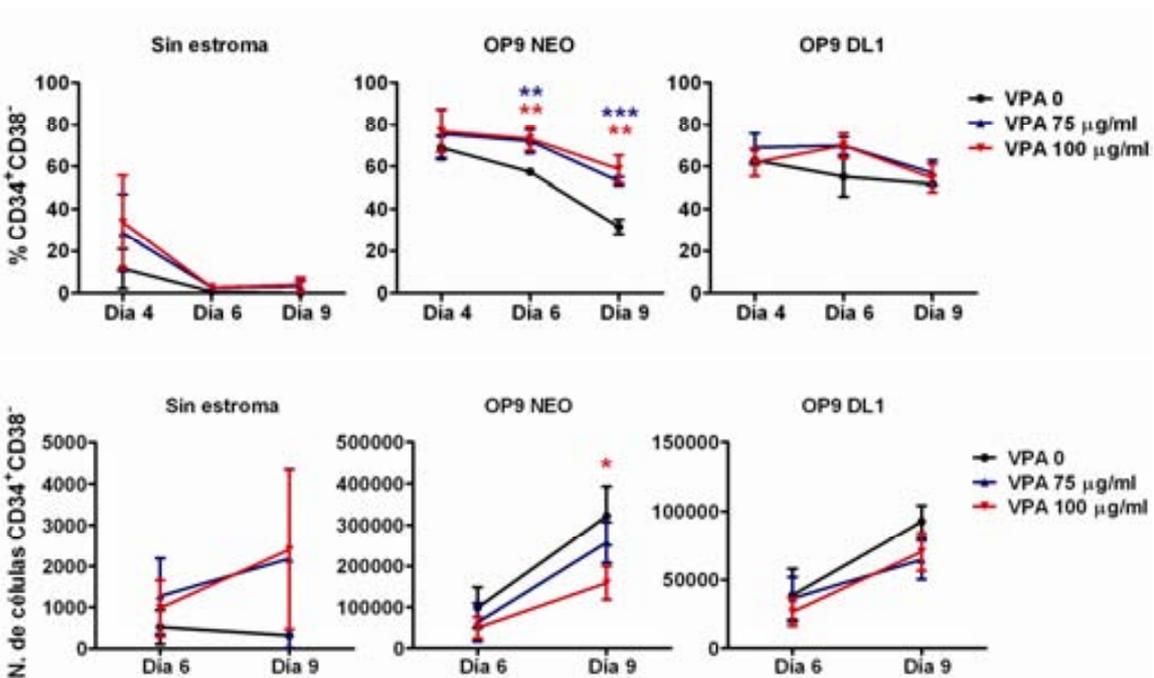


Figura 39. Análisis de la evolución de la población CD34⁺CD38⁻ en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 µg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 µg/ml (*).

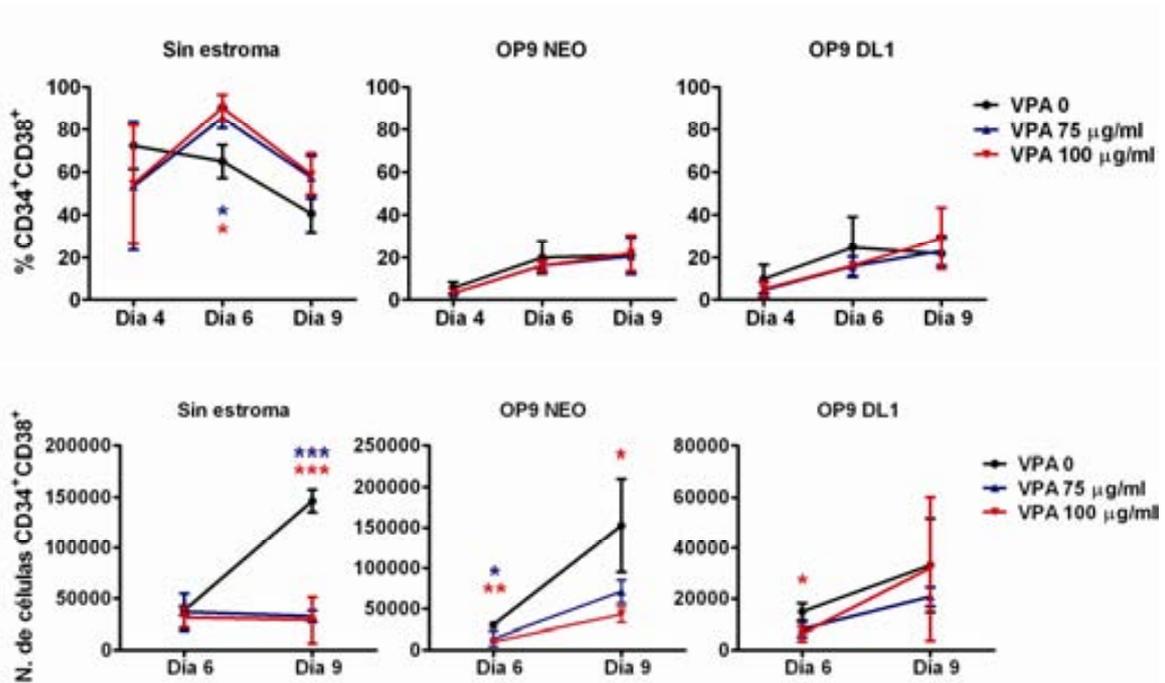


Figura 40. Análisis de la evolución de la población CD34⁺CD38⁺ en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 µg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 µg/ml (*).

2.2. Análisis del efecto del VPA sobre progenitores hematopoyéticos de linaje tras el cultivo

Por último, se analizó el efecto del tratamiento con VPA sobre la evolución de los diversos progenitores comprometidos de linaje CMP, GMP, MEP y CLP, en los tres sistemas de cultivo estudiados.

En general el tratamiento con VPA sólo afectaba a la proliferación haciendo que el número final de progenitores de linaje disminuyera.

En el caso de los CLPs, cuando se cultivaban los progenitores hematopoyéticos con OP9-DL1 y se trataban con VPA, el número de CLPs disminuía (figura 41). El número de CMPs también disminuía cuando se trataban con VPA los progenitores en cultivo sin estroma y en OP9 (figura 42). El número de GMPs también se veía afectado por el tratamiento con VPA en los tres sistemas experimentales (figura 43). Por el contrario, el porcentaje de MEP aumentaba cuando las células cultivadas sin estroma eran tratadas con VPA (figura 44).

Esto sugiere que el VPA además de reducir la proliferación de los progenitores hematopoyéticos, en ausencia de estroma favorece la diferenciación megacariocítica y eritroide.

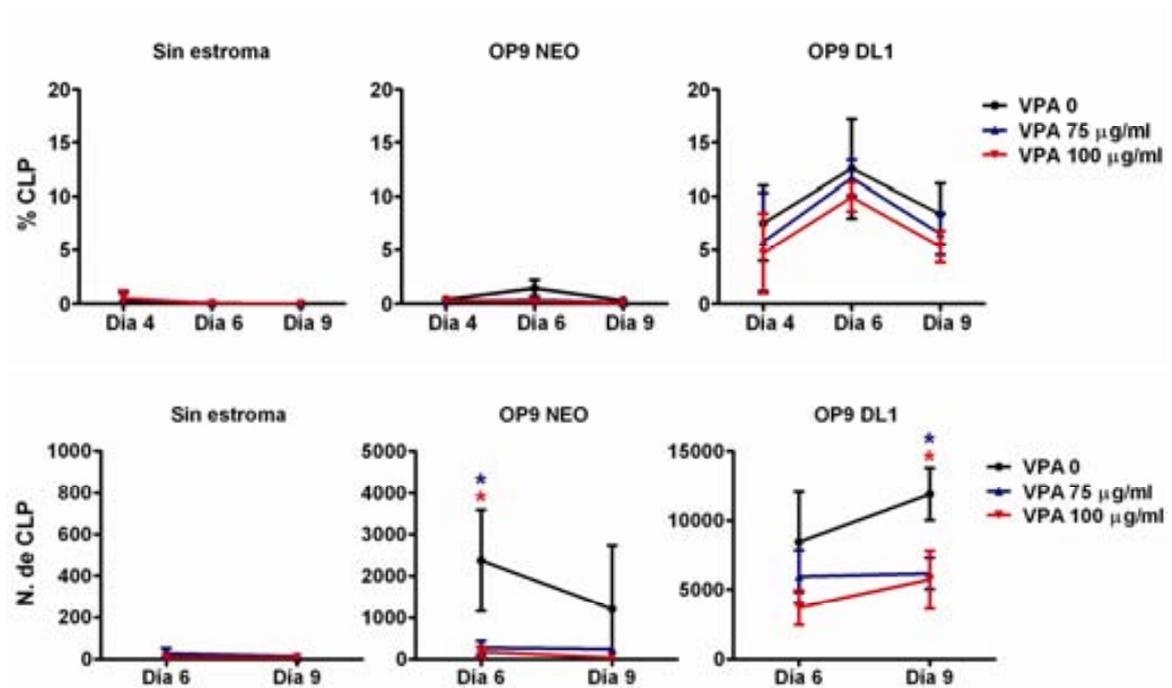


Figura 41. Análisis de la evolución de la población de CLP en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 μg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 μg/ml (*).

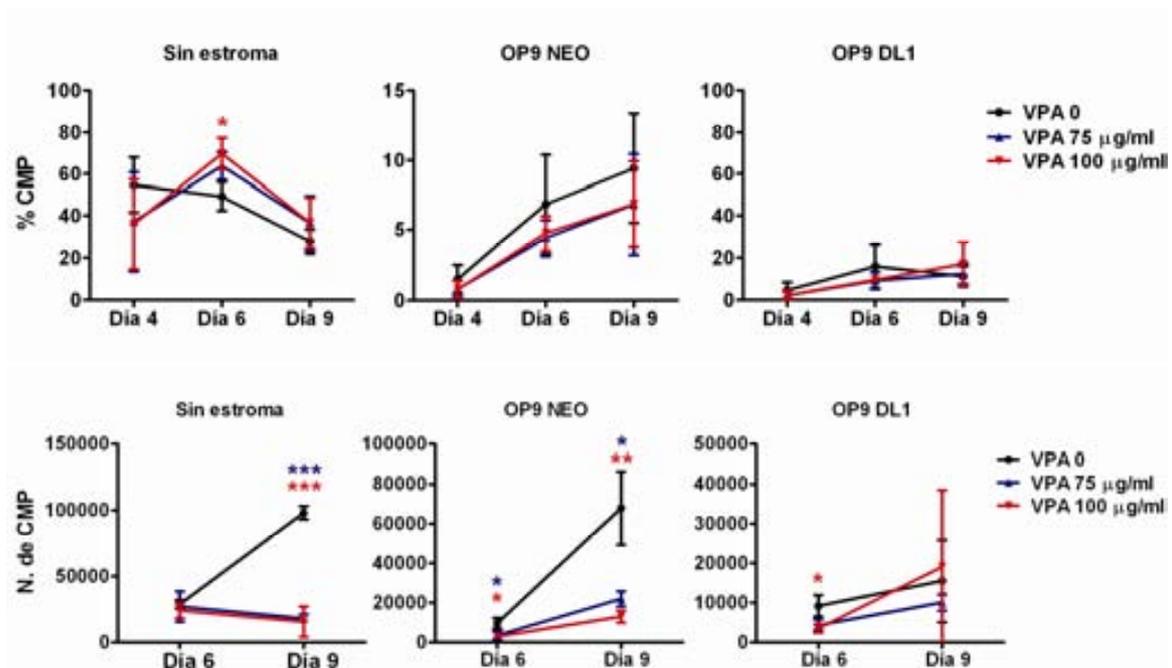


Figura 42. Análisis de la evolución de la población de CMP en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 μg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 μg/ml (*).

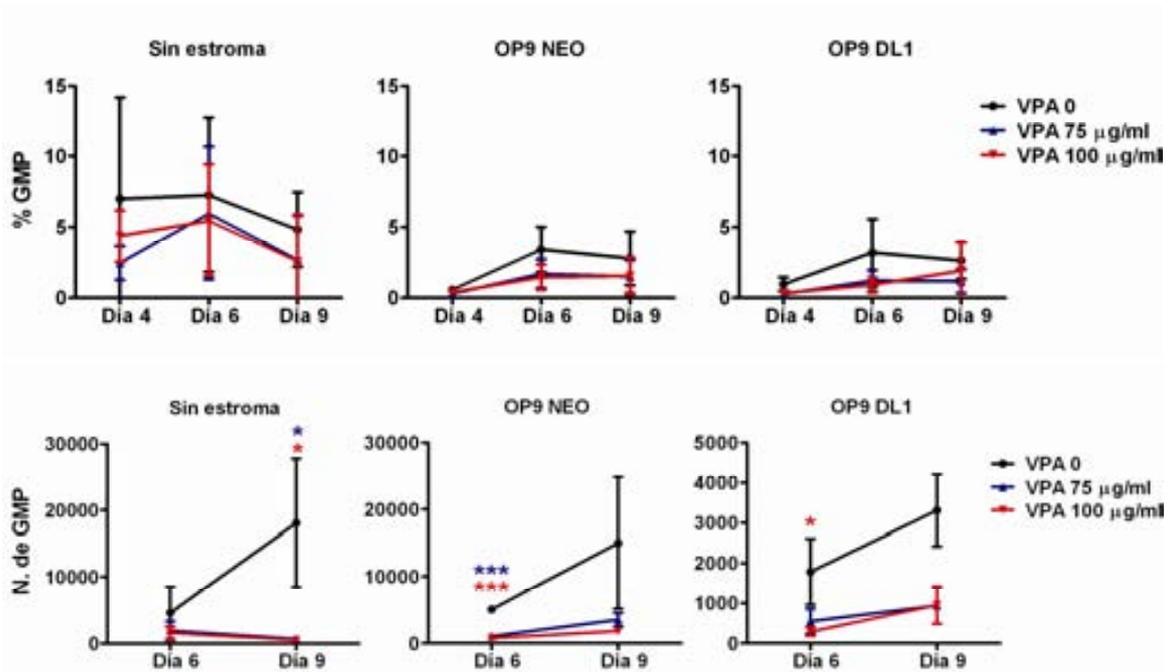


Figura 43. Análisis de la evolución de la población de GMP en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 µg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 µg/ml (*).

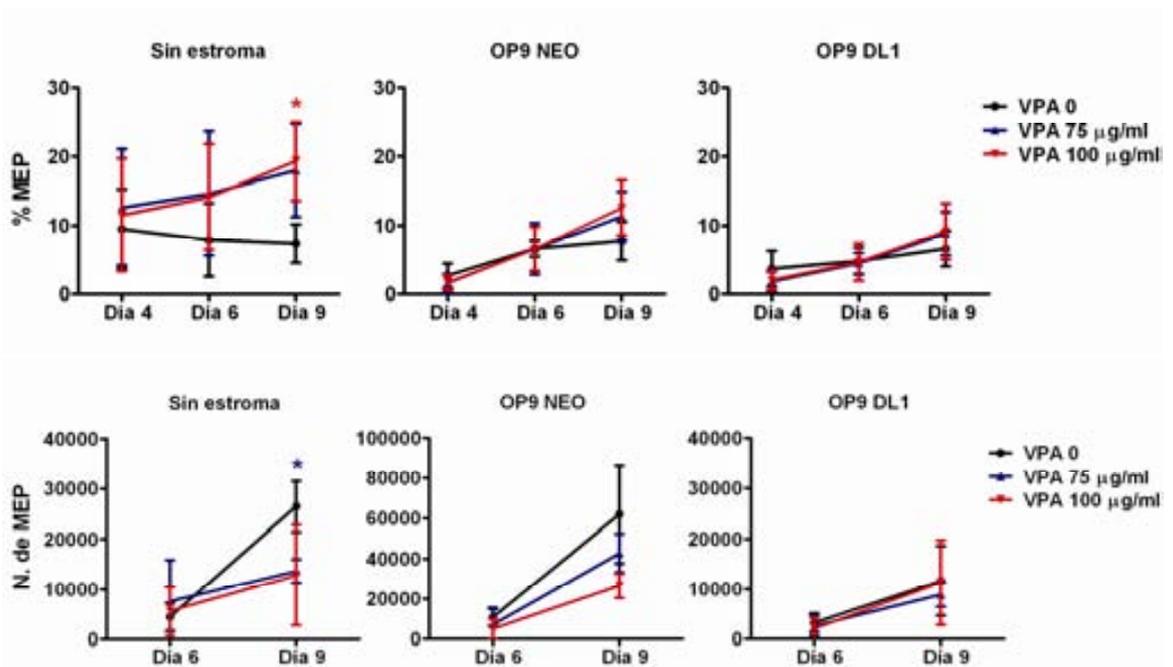


Figura 44. Análisis de la evolución de la población de MEP en el tratamiento con VPA. Los datos representados corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la significancia estadística entre las diferentes condiciones experimentales: VPA 0 y VPA 75 µg/ml (*); VPA 0 y VPA 100 µg/ml (*).

2.3. Análisis de la expresión de Hes1 en progenitores hematopoyéticos tras el cultivo con VPA y la activación de la vía de Notch

Los efectos obtenidos en el tratamiento con VPA y la inducción de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos son similares, tanto respecto al mantenimiento como a la expansión de los progenitores hematopoyéticos *in vitro*. Existen evidencias bibliográficas en otros sistemas celulares, que sugieren que el VPA activa la vía de Notch (Stockhausen, Sjolund et al. 2005; Greenblatt, Vaccaro et al. 2007).

Uno de los efectos de la activación de la vía de Notch es el aumento de expresión de Hes1. Por lo que se decidió estudiar la expresión de Hes1 en progenitores hematopoyéticos cultivados en diferentes condiciones experimentales: con VPA y con la vía de Notch activada. Para ello se co-cultivaron progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ con células estromales OP9 y OP9 DL1, y VPA a una dosis de 100 µg/ml, durante dos días. Para demostrar si la inducción de Hes1 era debida a la activación de la vía de Notch, se añadió un inhibidor de la vía, DAPT a una dosis de 5 µM. Tras dos días en cultivo se separaron las células CD34⁺ y se analizó la expresión de Hes1 mediante RT-PCR.

Se observó que el VPA inducía la expresión de Hes1 en progenitores hematopoyéticos cultivados con células estromales OP9 y, que ésta disminuía cuando se inhibía la vía con DAPT. En progenitores hematopoyéticos cultivados con células estromales OP9 DL1, la adición de DAPT hacía disminuir la expresión de Hes1 dejando una expresión basal (figura 45).

Estos resultados sugieren que el VPA podría estar activando la expresión de Hes1 por dos mecanismos diferentes, uno dependiente y otro independiente a la vía de Notch.

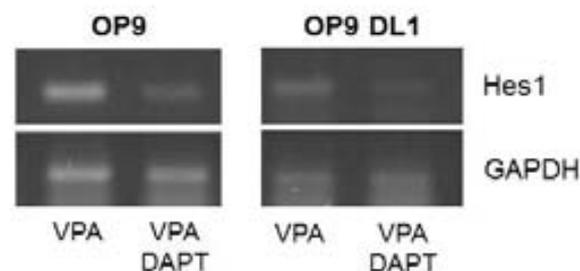


Figura 45. Análisis de la expresión de Hes1 en progenitores hematopoyéticos cultivados con células estromales y VPA. Se cultivaron 10.000 células CD34⁺CD38⁻ con células estromales OP9 y OP9 DL1, con VPA a 100 µg/ml y DAPT a 5 µM, durante dos días. Tras el cultivo, se separaron las células CD34⁺ y se analizó la expresión de Hes1 mediante RT-PCR.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

PARTE I. LA EXPRESIÓN DE CD150 EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS DEFINE UNA POBLACIÓN DE HSC CD34⁺CD38⁻ CON BAJA PROLIFERACIÓN

En las últimas décadas se ha estudiado la expresión de marcadores de superficie que permitan definir poblaciones enriquecidas en células madre y progenitores hematopoyéticos murinos y humanos.

Los miembros de la familia SLAM se expresan de forma diferencial entre las diferentes subpoblaciones de células madre y progenitores hematopoyéticos murinos. En ratón, según el código SLAM, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea se caracterizan por los marcadores CD150⁺CD244⁻CD48⁻, los progenitores multipotenciales (MPPs) por CD150⁻CD244⁺CD48⁻, y los progenitores oligopotenciales por CD150⁻CD244⁺CD48⁺ (Kiel, Yilmaz et al. 2005). Por otro lado, en ratón, el receptor tirosina kinasa de tipo III (FLT3/FLK2) ha sido identificado como uno de los marcadores útiles en la discriminación de las células madre hematopoyéticas. Diversos autores han observado que la combinación de los marcadores LSK (CD34⁻) Flt3⁻ define la población de LT-HSC en ratón y que la expresión de Flt3 va asociada a una pérdida en la capacidad de automantenimiento de las HSCs (Adolfsson, Borge et al. 2001; Christensen and Weissman 2001; Yang, Bryder et al. 2005).

A partir de los artículos publicados en progenitores hematopoyéticos de ratón, se estudió si los marcadores CD150 y CD135 permiten redefinir las poblaciones de células madre y progenitores hematopoyéticos en muestras humanas.

Este trabajo muestra la existencia de una población de células humanas incluida en la población de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical que comparte rasgos fenotípicos similares respecto a la expresión de los marcadores encontrados en ratón CD150⁺ y CD135⁻ (figura 14). Por otro lado, también se encontraron progenitores hematopoyéticos de sangre periférica movilizada Lin⁻CD34⁺ que expresaban CD150 (figura 15).

De forma similar, otros autores han observado expresión de CD150 en poblaciones de células madre y progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical, y de sangre periférica movilizada (Boussaad, Varagnolo et al. 2011; Laroche, Savona et al. 2011). Sin embargo, en otro estudio publicado que analiza la expresión de moléculas de la familia de receptores SLAM en diferentes fuentes de células madre y

progenitores hematopoyéticos humanos, no se observa una expresión significativa de CD150 en células $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ de sangre de cordón umbilical (Sintes, Romero et al. 2008). Tanto en este trabajo como en los de Boussaad y Laroche se ha utilizado el clon A12 del anticuerpo monoclonal CD150. En cambio, Sintes y colaboradores probaron seis anticuerpos monoclonales de CD150 que reconocían epítomos diferentes en células de sangre periférica movilizada. Sin embargo, no especifican si también probaron los diferentes clones en progenitores hematopoyéticos de médula ósea y de sangre de cordón umbilical. Por lo que el hecho de que no observaran expresión de CD150 podría ser debido al anticuerpo monoclonal utilizado.

También se ha estudiado el efecto de la expresión de Flt3 (CD135) en la caracterización fenotípica de las HSCs en diferentes fuentes de progenitores hematopoyéticos humanos. Tal y como se muestra en este trabajo (figura 14 y 15), Rappold y colaboradores estudiaron la expresión de Flt3 en progenitores hematopoyéticos CD34^+ de sangre de cordón umbilical y médula ósea, y observaron que la población $\text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ expresaba niveles muy bajos de Flt3 en ambas fuentes de progenitores hematopoyéticos. Por lo que la expresión de Flt3 estaba restringida a la población doble positiva para los marcadores CD34 y CD38 (Rappold, Ziegler et al. 1997). De forma similar, Aurran-Schleinitz y colaboradores encontraron que Flt3 se expresaba a niveles bajos en células CD34^+ de sangre periférica movilizada. Además, observaron que la expresión de Flt3 y CD38 aumentaba de forma paralela en estas células (Aurran-Schleinitz, Imbert et al. 1999). Por el contrario, Xiao y colaboradores encontraron que más del 90% de las células $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$ expresaban el antígeno de superficie Flt3. Y que tanto el porcentaje de células CD34^+ que expresaban Flt3 como la intensidad del marcaje de Flt3, disminuían a la vez que la expresión de CD38 aumentaba (Xiao, Oppenlander et al. 1999).

Una vez demostrada la existencia de la población definida por los marcadores $\text{CD150}^+ \text{CD135}^-$ dentro de la población de progenitores hematopoyéticos $\text{CD34}^+ \text{CD38}^-$, se realizaron ensayos funcionales que demostraran su multipotencialidad y capacidad de automantenimiento.

Los ensayos de formación de colonias y los ensayos de diferenciación revelaron que la población $\text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD150}^+ \text{CD135}^-$ posee capacidad multipotencial *in vitro* ya que a partir de células aisladas de sangre de cordón umbilical con este fenotipo se generaron células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos (figura 16, 17, 19, 20 y 21). Además, *in vivo*, estas células eran capaces de injertar en ratones

inmunodeficientes trasplantados y de generar células de los diferentes linajes hematopoyéticos (figuras 27-30 y tablas 4-5).

Larochelle, Boussaad y colaboradores, también observaron que los progenitores hematopoyéticos que expresaban CD150 eran capaces de injertar y generar células humanas de linaje mieloide y linfoide en la médula ósea y en el bazo de ratones trasplantados. En estos estudios se trasplantaron dosis celulares de 1×10^3 a 1×10^6 para observar injerto de células humanas (Boussaad, Varagnolo et al. 2011; Larochelle, Savona et al. 2011). Sin embargo en este trabajo, la inyección intrahepática de 100 progenitores hematopoyéticos en ratones neonatos, era suficiente como para observar injerto de células humanas. El hecho de que en los estudios citados anteriormente, se requieran dosis celulares infundidas tan elevadas para observar injerto de células humanas puede ser debido al lugar de inyección de los progenitores hematopoyéticos. El hígado fetal es uno de los lugares en los que tiene lugar el desarrollo de la hematopoyesis, y se ha descrito que mediante inyección intrahepática de progenitores hematopoyéticos humanos en ratones neonatos se consiguen niveles de injerto más elevados que en ratones adultos (Brehm, Cuthbert et al. 2010). El hígado de ratones neonatos podría ser un entorno más favorable para la migración de los progenitores hematopoyéticos hacia la médula ósea, lo que resultaría en un menor requerimiento de progenitores trasplantados para alcanzar injerto de células en la médula ósea. Otra posible explicación podría ser la relación entre el número de HSCs y la masa corporal. Existen estudios realizados con HSCs de sangre de cordón umbilical en los que muestran que el aumento del número de células por kilogramo de peso, resulta en un aumento del injerto y de la supervivencia de los humanos receptores (Gluckman and Rocha 2006).

El análisis de la evolución del injerto a lo largo de las semanas reveló la existencia de diferentes patrones de injerto de las células trasplantadas en ratones inmunodeficientes. El hecho que los ratones presentaran injerto a corto y largo plazo de células humanas, sugiere que existen progenitores con capacidad de reconstitución a corto y largo plazo en las poblaciones $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$. Esto podría ser debido a que una misma HSC da lugar a ST-HSC con capacidad de reconstitución a corto plazo y a LT-HSC con capacidad de reconstitución a largo plazo, o bien a diferentes poblaciones de progenitores que generan injerto a diferentes tiempos. Sin embargo, aunque ambas poblaciones de progenitores hematopoyéticos poseen la capacidad de reconstituir huéspedes trasplantados, la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ generaba niveles de injerto inferiores en cuanto a porcentaje de células humanas que provenían de esta población (figura 27). Esto

podría ser debido a que en el grupo de trasplante de la combinación de las dos poblaciones de progenitores, podría tener lugar una competencia por el anidamiento en la médula ósea entre ambas poblaciones. Sin embargo, cuando las poblaciones son trasplantadas de forma individual en ratones inmunodeficientes, las diferencias en los niveles de injerto no son tan acentuadas (figura 28). Este grupo de trasplante está representado por un tamaño muestral reducido por lo que sería necesario aumentar el tamaño de la muestra para poder obtener datos significativos.

La presencia de progenitores hematopoyéticos con capacidad de automantenimiento de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ se evaluó mediante los ensayos de trasplantes secundarios en ratones inmunodeficientes. Los trasplantes secundarios mostraron que ambas poblaciones presentan HSCs con capacidad de automantenimiento y renovación, ya que se observó injerto de células humanas en trasplantes realizados a un segundo huésped (tabla 6). Además, en los trasplantes secundarios se observó que los niveles de injerto generados a partir de la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ también eran inferiores a los de la población $CD34^+CD38^-$ (tabla 6).

Los ensayos funcionales realizados en este trabajo demostraron que la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ contiene células que comparten las principales características funcionales de las células madre hematopoyéticas ya que tienen capacidad multipotencial, de automantenimiento y de reconstitución de la hematopoyesis en huéspedes trasplantados. Tanto *in vitro* como *in vivo*, es posible generar células de los diferentes linajes hematopoyéticos, a partir de progenitores hematopoyéticos de ambas poblaciones. Por otro lado, se ha observado que las células $CD150^+CD135^-$ responden de forma diferente frente a los factores de crecimiento. Éstas presentan una tasa de proliferación inferior a las células $CD34^+CD38^-$, y requieren periodos de tiempo más largos para activarse, entrar en división y proliferar (figura 22 y 23). Además, la médula ósea y la sangre periférica de los ratones trasplantados, generalmente presentaba menos células humanas generadas a partir de progenitores hematopoyéticos $CD150^+CD135^-$. Por lo que aunque la población $CD34^+CD38^-CD150^+CD135^-$ no difiere de la población $CD34^+CD38^-$ en cuanto a su capacidad de diferenciación, los resultados obtenidos sugieren que, dentro de la población $CD34^+CD38^-$, las células con fenotipo $CD150^+CD135^-$ distinguen una subpoblación con un control específico de la entrada en ciclo. Larochelle, Boussaad y colaboradores, también observaron que la expresión de CD150 en progenitores hematopoyéticos hacía descender su capacidad clonogénica (Boussaad, Varagnolo et al. 2011; Larochelle, Savona et al. 2011).

Los resultados obtenidos de la baja capacidad clonogénica de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ podrían ser explicados por una baja tasa de proliferación ya que los ensayos de diferenciación, tanto a nivel clonal como a nivel poblacional, muestran que esta población contiene progenitores multipotenciales (figura 19 y 20). Los estudios de proliferación realizados revelaron que la capacidad de proliferación de las células de la población CD34⁺CD38⁻ era muy superior a la de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻. Además, mientras que en la población CD34⁺CD38⁻ la mayoría de los clones proliferaban durante las dos primeras semanas de cultivo, la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ contenía tanto clones que proliferaban de forma temprana como tardía distribuidos de forma proporcional (figura 23). De forma similar, anteriormente ha sido publicado que existen dos subtipos de progenitores diferentes dentro de la población CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical. Se observó que cuando los progenitores eran cultivados con citoquinas y células estromales de soporte, aparecían dos picos de expansión a diferentes tiempos de cultivo. Además, la respuesta a citoquinas que promueven la proliferación era más rápida en el caso de progenitores comprometidos CD34⁺CD38⁺ que en progenitores más inmaduros CD34⁺CD38⁻ (Hao, Shah et al. 1995). Esto sugiere que los progenitores hematopoyéticos responden de forma diferente a las señales de activación por parte del estroma. El primer pico de expansión tendría lugar a partir de progenitores activados capaces de responder a señales externas, y el segundo pico a partir de progenitores en reposo que necesitan una estimulación previa para poder activarse y responder a las señales externas de proliferación.

Del mismo modo, se observó que los factores secretados por las OP9 y los contactos intercelulares entre las OP9 y las HSCs, afectaban a la quiescencia y la proliferación de las HSCs ya que el cultivo de progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ con células estromales OP9, hacía aumentar la capacidad clonogénica de la población hasta niveles similares a los obtenidos a partir de células CD34⁺CD38⁻ aisladas directamente de sangre de cordón umbilical. Sin embargo, la capacidad clonogénica de la población CD34⁺CD38⁻ no se veía afectada tras el co-cultivo con células estromales. Por lo que las células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ se encontraban es un estado de respuesta a señales de activación y proliferación, diferente al de las células CD34⁺CD38⁻.

Las señales generadas por las OP9 son desconocidas, sin embargo, las células OP9 se comportan de forma similar a las MSCs (Nakano, Kodama et al. 1994). Las citoquinas y los contactos intercelulares con las células estromales son capaces de activar e inducir la proliferación de los progenitores hematopoyéticos. La proliferación

celular viene determinada por el estado del ciclo celular y las señales del entorno a las que está expuesta la célula. El balance entre la quiescencia y la proliferación celular está altamente regulado por múltiples factores. Por ejemplo, se ha identificado el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) que promueve la progresión del ciclo celular de las células madre hematopoyéticas, e interacciona con TGF β -1 en la regulación de la quiescencia y la proliferación celular (Chabanon, Desterke et al. 2008). En condiciones de regeneración tras daño hematopoyético, se ha observado un aumento de Wnt10b tanto en células madre como células estromales de la médula ósea, promoviendo la proliferación de las células madre hematopoyéticas (Congdon, Voermans et al. 2008). Además, los osteoblastos (OB) expresan moléculas esenciales para el mantenimiento de la quiescencia y la función de las HSCs, como por ejemplo, el SCF (Zhu, Ji et al. 2011), el ligando Ang-1 (Gomei, Nakamura et al. 2010) o la trombopoyetina (TPO) (Yoshihara, Arai et al. 2007).

Por otro lado, los componentes de la matriz extracelular como las N-cadherinas, las integrinas y la osteopontina, también están implicadas en la regulación del estado del ciclo celular de las HSCs (Arai, Hirao et al. 2004; Nilsson, Johnston et al. 2005; Yoshihara, Arai et al. 2007).

La necesidad de múltiples señales externas para activar las células y que éstas respondan a las señales de división y proliferación, es característica de progenitores hematopoyéticos inmaduros en un estado de reposo o quiescencia, de forma opuesta a lo que ocurre en el caso de progenitores más diferenciados (Borge, Ramsfjell et al. 1997; Zandstra, Conneally et al. 1997). Lo que sugiere que el subtipo celular CD150⁺CD135⁻ está formado por células madre hematopoyéticas en un estado quiescente, que requieren señales intrínsecas y extrínsecas para ser activadas, proliferar y diferenciarse.

A parte de las señales extrínsecas, existen numerosas moléculas implicadas en la regulación de la quiescencia mediante mecanismos intrínsecos. En este trabajo se ha analizado la expresión simultánea de TGF β 1, p21 y GAPDH en células CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻. El análisis de la expresión de TGF β 1 y p21 mostraba que existían más células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ que expresaban ambos genes a la vez. La expresión de p21 podría estar inducida por p53 (Cheng, Rodrigues et al. 2000) pero también por TGF β mediante un mecanismo independiente de p53 (Datto, Li et al. 1995). De hecho, Ducos y colaboradores demostraron que el mRNA de p21 está controlado por el TGF β 1 endógeno en células madre y progenitores hematopoyéticos quiescentes (Ducos, Panterne et al. 2000).

Estudios recientes han demostrado que la señalización de p53 a parte de participar en la respuesta celular frente a daños en el ADN, también es crítica en la regulación de la quiescencia de las HSCs en condiciones de homeostasis hematopoyética (Lacorazza, Yamada et al. 2006; Liu, Elf et al. 2009). p53 se expresa preferentemente en HSCs, en comparación con progenitores hematopoyéticos más comprometidos, y promueve la quiescencia en las HSCs (Liu, Elf et al. 2009). Una de las principales dianas de p53 es p21. Algunos estudios sugieren que p53 y p21 tienen un papel importante en la inhibición de la entrada en ciclo de las HSCs y en la regulación del reservorio de HSCs bajo condiciones de estrés (Cheng, Rodrigues et al. 2000). A parte de p21, han sido identificados otros dos genes diana de p53, *Gfi-1* y *Necdin*, como importantes reguladores de la quiescencia (Hock, Hamblen et al. 2004; Liu, Elf et al. 2009).

Existen numerosos estudios que relacionan TGF β 1 con el control de la quiescencia y la inhibición de la proliferación de las HSCs tanto *in vitro* como *in vivo* (Goey, Keller et al. 1989; Keller, McNiece et al. 1990; Lu, Xiao et al. 1993; Sitnicka, Ruscetti et al. 1996; Batard, Monier et al. 2000; Fan, Valdimarsdottir et al. 2002; Chabanon, Desterke et al. 2008), y que tanto la producción autocrina de TGF β 1 por parte de las HSCs como la producción de TGF β 1 por las células estromales del nicho, contribuyen en el mantenimiento de las HSCs (Kim and Letterio 2003; Ruscetti, Akel et al. 2005).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la inhibición de la proliferación mediada por TGF β 1, como por ejemplo alteraciones en la expresión de los receptores de citoquinas (Dubois, Ruscetti et al. 1990; Jacobsen, Ruscetti et al. 1991; Dubois, Ruscetti et al. 1994) o el aumento de la expresión de inhibidores de CDKs, como p21 (Datto, Li et al. 1995; Ducos, Panterne et al. 2000), p27 (Pierelli, Marone et al. 2000), p15 (Dao, Hwa et al. 2002) y p57 (Scandura, Boccuni et al. 2004; Umemoto, Yamato et al. 2005).

Otro mecanismo de regulación de la quiescencia por TGF β 1 es el postulado por Yamakazi y colaboradores, en el que la hibernación o la entrada en ciclo celular de las HSCs dependen de la regulación de los *lipid raft*. Se ha observado que la reorganización de los microdominios lipídicos inducida por las citoquinas es esencial para aumentar el nivel de la señal de las citoquinas y que las HSCs entren en ciclo. TGF β inhibe las señales de las citoquinas de reorganización de los microdominios, manteniendo las HSCs en hibernación. Además, se ha observado que las dianas de TGF β , Smad2 y Smad3, están activadas de forma específica en LSK CD34⁻ en hibernación pero no en progenitores más maduros LSK CD34⁺ (Yamazaki, Iwama et al. 2006; Yamazaki, Iwama et al. 2009).

Recientemente se ha publicado un estudio en el que demuestran que los diferentes subtipos de HSCs están regulados de forma diferente por TGFβ1. El conjunto de HSCs en individuos adultos está formado por subtipos de HSCs diferentes en cuanto a sus capacidades de autorrenovación y diferenciación. Challen y colaboradores observaron que TGFβ1 estimulaba la proliferación del subtipo de HSCs más inmaduro y quiescente, mientras que en el subtipo más proliferativo y maduro, inhibía la proliferación (Challen, Boles et al. 2010). Por lo que TGFβ1 podría estar actuando de forma diferente entre las HSCs y los progenitores de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻, e incluso podrían estar actuando otros mecanismos que ayudaran al mantenimiento de las células en su estado de reposo.

Por otro lado, se ha descrito que las diferentes isoformas de TGFβ son sintetizadas en forma de precursor biológicamente inactivo, por lo que se requiere un procesamiento de la proteína para dar lugar a formas maduras de TGFβ. Una vez sintetizados y procesados, son liberados por las células como TGFβ latentes, que son biológicamente inactivos. Tras ser liberados, los TGFβ latentes pueden ser activados mediante diferentes mecanismos y actuar de forma autocrina o paracrina (Fortunel, Hatzfeld et al. 2000). Yamazaki y colaboradores demostraron que células LSK CD34⁻ en presencia de la forma activa de TGFβ eran incapaces de generar colonias mientras que la forma latente de TGFβ no afectaba a la formación de colonias (Yamazaki, Iwama et al. 2009). Además, existen estudios que indican que la parada del ciclo celular mediada por TGFβ es reversible (Sitnicka, Ruscetti et al. 1996; Batard, Monier et al. 2000). Lo que está relacionado con el concepto de quiescencia reversible e irreversible. Las células diferenciadas permanecen en un estado de arresto permanente mientras que las células madre o progenitores están en un estado de arresto reversible y responden a señales de regeneración (como por ejemplo tras daño tisular), volviendo temporalmente a un estado proliferativo generando células nuevas para reparar el daño tisular.

En la literatura ha sido descrito que TGFβ1 está implicado en el control de la quiescencia de las HSCs. Sin embargo, éste necesita ser activado para ser funcional. TGFβ1 se expresa tanto en la población CD34⁺CD38⁻ como en la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻. Estas poblaciones fueron aisladas de sangre de cordón umbilical donde no existirían células del nicho que activaran la vía de TGFβ en las HSCs de forma paracrina. Por lo que en estos casos, TGFβ1 sería activado de forma autocrina y podría estar implicado en el mantenimiento de la quiescencia de las HSCs.

En el estudio molecular de las poblaciones de progenitores hematopoyéticos aisladas directamente de sangre de cordón umbilical, se observaron diferencias en el patrón de expresión de GAPDH. El número de células CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ que expresaban GAPDH era significativamente inferior al número de células CD34⁺CD38⁻. Estas diferencias no eran debidas a la metodología utilizada ya que el patrón de expresión del ARN ribosomal 18s, que es otro control endógeno ampliamente utilizado, era similar en ambas poblaciones. Por lo que las diferencias observadas en el patrón de expresión de GAPDH eran consecuencia de diferencias poblacionales.

Warren y colaboradores realizaron un estudio del patrón de transcripción por RT-PCR digital de diferentes genes en progenitores hematopoyéticos individuales. Analizaron la expresión de GAPDH en células madre y progenitores hematopoyéticos murinos de forma individual. Tras el análisis, observaron que dentro de la población de HSCs murinas, los niveles de expresión de GAPDH no eran constantes ya que había células que presentaban niveles de expresión casi indetectables (Warren, Bryder et al. 2006). GAPDH es un enzima glicolítico, por lo que su baja expresión en el subtipo celular CD150⁺CD135⁻ podría estar asociada con cambios metabólicos en vez de a diferentes estadios del desarrollo hematopoyético. Se ha descrito que después de la activación de las células T, tiene lugar un cambio metabólico reversible de fosforilación oxidativa a glicólisis. Las células T en reposo utilizan aminoácidos, lípidos y glucosa para la generación de ATP, mientras que las células activadas que proliferan, presentan un aumento de la metabolización de la glucosa para satisfacer los altos requerimientos energéticos (Fox, Hammerman et al. 2005). Por lo que podría tener lugar un cambio similar de catabolismo a anabolismo en el compartimento de las HSCs, donde las células CD150⁺CD135⁻ con un metabolismo aerobio representarían al conjunto de HSCs quiescentes. Además, la inducción de la oxidación de ácidos grasos durante el catabolismo podría alterar la formación de *lipid rafts* afectando a la señalización celular, tal y como ocurre en HSCs tratadas con TGFβ1 (Pearce 2010).

La médula ósea presenta un ambiente con bajos niveles de oxígeno, lo que protege a las células de la exposición a estrés oxidativo. Se han identificado varios factores implicados en el mantenimiento de bajos niveles oxidativos en las HSCs. Las especies reactivas de oxígeno están implicadas en la regulación del mantenimiento de las HSCs (Ito, Hirao et al. 2004; Tothova, Kollipara et al. 2007). El grupo FoxO incluye cuatro miembros (FoxO1, FoxO3a, FoxO4 y FoxO6). Las proteínas FoxO son activadas en respuesta a estrés oxidativo, y activan la expresión de genes que participan en procesos de detoxificación de ROS y parada del ciclo celular. Las HSCs obtenidas de un modelo de ratón deficiente en FoxO1, FoxO3 y FoxO4, muestran elevados niveles

de ROS, aumento de la actividad del ciclo celular y de la apoptosis, y fallo en la capacidad de reconstitución a largo plazo (Tothova, Kollipara et al. 2007). Los efectos provocados por la ausencia de FoxO pueden ser revertidos mediante la administración de antioxidantes. ATM, es un regulador de puntos de control del ciclo celular activado después de daños en el ADN, y también regula los niveles de ROS (Ito, Hirao et al. 2004). ATM se expresa principalmente en HSCs en ciclo, y los modelos murinos deficientes en ATM muestran elevados niveles de ROS, ausencia de HSCs quiescentes, y fallos en la médula ósea (Ito, Hirao et al. 2004). El tratamiento con antioxidantes reestablece la quiescencia y la capacidad de repoblación de la médula ósea de las HSCs ATM^{-/-}.

Existen zonas de la médula ósea en las que se mantiene un ambiente hipóxico. Se ha observado que la mayoría de las células con baja actividad mitótica se localizan en este ambiente hipóxico cercano a la superficie del hueso y alejado de los capilares (Kubota, Takubo et al. 2008). En los mecanismos moleculares implicados en el efecto de la hipoxia sobre las HSCs, interviene la regulación de los niveles de factor HIF-1 α que mantiene las HSCs en un estado quiescente (Takubo, Goda et al. 2010).

Una de las principales características que definen las HSCs es su estado de quiescencia, es decir, su estado de no división en G₀. La quiescencia de las HSCs está relacionada con su capacidad de reconstituir a largo plazo. Las HSCs se mantienen en un estado de reposo o proliferan, para automantenerse o generar células maduras del sistema hematopoyético. Sin embargo, la mayoría permanecen quiescentes mientras que sólo un pequeño número entra en ciclo. En cambio, en situaciones de estrés, las HSCs salen de su estado quiescente, se expanden y diferencian rápidamente hasta recuperar la homeostasis hematopoyética. Cuando en situaciones de estrés, el restablecimiento del estado de quiescencia celular de las HSCs falla, éstas no pueden mantenerse en la fase del ciclo celular G₀. Esto conlleva a la extinción del reservorio de HSCs, pérdida de la capacidad de automantenimiento y reconstitución, finalmente causando un fallo hematológico. La quiescencia de las HSCs no sólo es crítica en la protección y el mantenimiento del reservorio de HSCs, sino que también es crítica en la protección de las HSCs frente a la acumulación de mutaciones asociadas a la replicación del ADN celular, confiere resistencia frente a agentes tóxicos externos, etc.

El balance entre los estados de quiescencia y proliferación de las HSCs está finamente regulado por mecanismos tanto intrínsecos de las HSC como por

interacciones con su microambiente en el nicho, a través de contactos intercelulares, contactos con la matriz extracelular e interacciones de tipo ligando-receptor.

En este trabajo se ha aislado una población de sangre de cordón umbilical caracterizada por los marcadores CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻, que está formada por células que cumplen las características que definen a las células madre hematopoyéticas ya que presentan capacidad multipotencial, de automantenimiento y de reconstitución del sistema hematopoyético de los huéspedes trasplantados. Además, las células de esta población se encuentran en un estado de quiescencia reversible. En el mantenimiento de la quiescencia se ha observado que podrían jugar un papel importante TGFβ1 y p21. Estas células son capaces de revertir su estado de quiescencia respondiendo a estímulos externos provenientes del estroma, como por ejemplo la vía de TGFβ. La tendencia actual es que la quiescencia no es sólo un estado pasivo de arresto del ciclo celular caracterizado únicamente por una reducción del metabolismo, sino que es un estado altamente regulado mantenido por un patrón de transcripción concreto que incluye la inducción de un amplio número de genes. Los factores de transcripción que promueven la quiescencia son diferentes de los factores que determinan las decisiones de diferenciación irreversible. Sin embargo, los mecanismos que regulan estos genes, y su activación y represión, no están claros.

PARTE II. NOTCH Y VPA FAVORECEN LA EXPANSIÓN Y EL MANTENIMIENTO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS CD34⁺CD38⁻ IN VITRO

La sangre de cordón umbilical se ha convertido en una fuente importante de células madre hematopoyéticas para su uso en el tratamiento de enfermedades hematológicas en adultos, debido a su disponibilidad, a que permite una mayor disparidad en la compatibilidad de HLA, y presenta una menor incidencia de enfermedad de injerto contra el huésped. Todo ello hace que sea una fuente muy atractiva de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, la mayor limitación para su uso en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, es que presenta un bajo número de progenitores hematopoyéticos. Existe una correlación entre la dosis de células nucleadas totales trasplantadas y el peso del receptor del trasplante. Por este motivo, el trasplante de unidades de cordón umbilical es más eficiente en niños, y en adulto está asociado a un retraso en el injerto y a una mayor incidencia de infecciones. En los últimos años, la infusión de más de una unidad de cordón umbilical y la expansión de progenitores de sangre de cordón umbilical han sido las aproximaciones más prometedoras para aumentar la dosis de progenitores trasplantados y mejorar la eficiencia del injerto (Tung, Parmar et al. 2010). El objetivo de este trabajo es la expansión *ex vivo* de progenitores hematopoyéticos con la finalidad de conseguir un número óptimo de HSCs para el injerto del trasplante pero también un número adecuado de progenitores específicos de linaje que recuperen rápidamente al huésped trasplantado de la pancitopenia. Para ello se han estudiado diferentes sistemas de expansión para definir las condiciones óptimas que favorecen el mantenimiento y la proliferación de los progenitores hematopoyéticos *in vitro*.

En este trabajo se ha analizado el efecto de las células estromales y las citoquinas sobre el mantenimiento, proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical.

En el cultivo de progenitores hematopoyéticos, se observó que el número total y el porcentaje de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ y CD34⁺CD38⁻ obtenido a final del cultivo era superior cuando los progenitores hematopoyéticos eran cultivados con células estromales OP9 de soporte (figura 33 y 34). Existen numerosas evidencias que demuestran que el estroma favorece la proliferación y el mantenimiento *in vitro* de los progenitores hematopoyéticos a través de los contactos intercelulares y los factores solubles secretados por las células estromales (Kusadasi, Koevoet et al. 2001; da Silva, Goncalves et al. 2010). Fei y colaboradores observaron que la expansión de progenitores hematopoyéticos cultivados una o dos semanas con células

mesenquimales de la médula ósea, mejoraba los niveles de injerto a corto plazo en ratones NOD/SCID de los progenitores hematopoyéticos trasplantados (Fei, Wu et al. 2007).

También se analizó la evolución de la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos cuando éstos eran cultivados con células estromales. El estudio de la evolución de las diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos sugiere que existe una jerarquía de diferenciación de poblaciones según la expresión de los marcadores CD34 y CD38. Donde la población más indiferenciada es la población CD34⁺CD38⁻ y a medida que avanza el cultivo esta población se va diferenciando generando células CD34⁺CD38⁺ que corresponderían a una población en un estadio más avanzado de diferenciación incorporando la expresión del marcador CD38 (D'Arena, Musto et al. 1996; Hogan, Shpall et al. 2002).

Por otro lado, el análisis fenotípico de las diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos específicos de linaje, mostró que el cultivo con células estromales frenaba la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos ya que tanto el porcentaje como el número total de CMP eran inferiores respecto al cultivo líquido sin células estromales (figura 35). A medida que avanza el cultivo sin estroma, esta población se va perdiendo posiblemente porque se va diferenciando a progenitores más comprometidos de linaje.

En la literatura se ha descrito que la población CMP es una población de progenitores mieloides inmaduros y, a partir de la diferenciación de estos progenitores, se generan los GMP y MEP (Akashi, Traver et al. 2000; Manz, Miyamoto et al. 2002). Aunque el cultivo con células estromales OP9 frenaba la diferenciación, existía un número de células que se diferenciaban generando progenitores más maduros. Estas condiciones experimentales podrían favorecer la diferenciación a megacariocitos y eritrocitos, ya que el número total de MEP al final del cultivo con células estromales estaba aumentado respecto a las otras condiciones experimentales de cultivo.

En la regulación de las células madre hematopoyéticas participan tanto señales intrínsecas como extrínsecas. Una de las vías de señalización celular identificada en la regulación de las células madre hematopoyéticas es la vía de Notch. Tanto los receptores Notch como sus ligandos están expresados en la médula ósea (Radtke, Wilson et al. 2004), por lo que es posible que la vía de Notch juegue un papel importante en el automantenimiento y expansión de las HSCs (Varnum-Finney, Xu et al. 2000; Duncan, Rattis et al. 2005). A partir de estas evidencias, se decidió estudiar

la influencia de la activación de la vía de Notch en el automantenimiento y expansión de progenitores hematopoyéticos *in vitro*.

La activación de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ aislados de sangre de cordón umbilical, tenía lugar a través del co-cultivo con células estromales OP9 que expresaban DL1, uno de los ligandos de la vía de Notch (figura 10). Esta activación inhibía la proliferación y mantenía a los progenitores en un estado menos diferenciado ya que *in vitro* la proporción de células que conservaban el fenotipo inicial CD34⁺CD38⁻ era mayor en el sistema de co-cultivo con OP9-DL1 (figura 36). Uno de los principales efectos observados de la activación de la vía de Notch es la inhibición de la diferenciación y la determinación a un linaje concreto, manteniendo los progenitores en un estado indiferenciado (Milner, Kopan et al. 1994; Han, Ye et al. 2000).

También se ha observado que la activación de la vía de Notch induce apoptosis en determinados tipos celulares (Chadwick, Nostro et al. 2007). Por lo que el efecto de Notch sobre la expansión y diferenciación, también podría ser debido a que Notch induce apoptosis en las células más diferenciadas que son las que tienen un índice de proliferación mayor. Así, se enriquecería la población en progenitores hematopoyéticos que tienen una tasa de división menor.

Otra posible explicación es que Notch inhiba la progresión del ciclo celular de los progenitores hematopoyéticos. Se ha descrito que niveles altos de expresión de HES1, uno de los genes diana de la vía de Notch, se encontraron en células progenitoras que se mantenían en un estado quiescente mientras que la expresión se reducía en células que se habían dividido (Yu, Alder et al. 2006).

Por otro lado, el análisis fenotípico de las diferentes poblaciones de progenitores hematopoyéticos específicos de linaje, mostró que la activación de la vía de Notch favorecía la diferenciación linfoide ya que aumentaba el número y porcentaje de CLPs disminuyendo los CMP, GMP y MEP (figura 35).

Estos resultados revelan que a parte de la función en el mantenimiento y expansión de las HSCs, la señalización de Notch también está implicada en la diferenciación linfoide. Existen estudios en los que han observado que Notch1 inhibe la diferenciación a células mieloides, B, pDC y cDC; de las células que migran de la médula ósea al timo, asegurando una diferenciación eficiente a células de linaje T (Bell and Bhandoola 2008; Wada, Masuda et al. 2008; Feyerabend, Terszowski et al. 2009). Además, a partir de experimentos realizados *in vitro*, DL1 y DL4 fueron identificados como los

ligandos de Notch implicados en la diferenciación a célula T (Jaleco, Neves et al. 2001; Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002). Estos datos fueron confirmados y ampliados por Zuniga-Pflucker y colaboradores, que demostraron que células CD34⁺ de sangre de cordón umbilical y médula ósea co-cultivadas con células estromales OP9-DL1, IL-7 y Flt3L, eran capaces de generar células T maduras (La Motte-Mohs, Herer et al. 2005, De Smedt, 2004 #149).

Existen varios estudios que analizan el efecto de agentes farmacológicos que inducen cambios epigenéticos como la 5aza 2'deoxicitidina (5azaD), la tricostatina A (TSA) o el ácido valproico (VPA); en el mantenimiento, la expansión y la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos *in vitro*. El ácido valproico (VPA) es un fuerte inhibidor de las histona deacetilasas y, se ha observado que actúa como un regulador epigenético del mantenimiento de las características que definen las células madre hematopoyéticas, y de la diferenciación de los progenitores comprometidos a los diferentes linajes (Bug, Gul et al. 2005; De Felice, Tatarelli et al. 2005). Por lo que se decidió estudiar el efecto del VPA en el mantenimiento, expansión y diferenciación de progenitores hematopoyéticos humanos.

In vitro, el tratamiento con VPA disminuye el número total de células generadas *ex vivo*. Sin embargo, el porcentaje de células que retienen el fenotipo de progenitor hematopoyético CD34⁺CD38⁻ tras 9 días de cultivo, es significativamente más alto que respecto al cultivo sin VPA (figura 39). Por lo que la adición de VPA al co-cultivo de progenitores hematopoyéticos con células estromales, mejoraba la expansión de los progenitores hematopoyéticos. Al efecto del estroma sobre el mantenimiento y expansión de los progenitores hematopoyéticos, se sumaba el efecto del VPA en la inhibición de la proliferación y diferenciación celular. Esto podría ser debido a que el cultivo con células estromales podría mejorar la supervivencia de los progenitores hematopoyéticos en respuesta al VPA, tal y como observaron Koh y colaboradores cuando cultivaban progenitores CD34⁺ con 5azaD y TSA, y células mesenquimales (Koh, Choi et al. 2005). De forma alternativa, también podría ser posible que el tratamiento con VPA tuviera un efecto citotóxico sobre los progenitores más comprometidos, obteniendo así un enriquecimiento en HSCs.

Los resultados del análisis de las poblaciones de progenitores hematopoyéticos indicaban que el tratamiento con ácido valproico inhibía la proliferación y diferenciación celular, manteniendo los progenitores en un estado más indiferenciado (figura 41-44). La progresión del ciclo celular de las HSC está asociada con la decisión de las HSC de automantenerse o diferenciarse. Los agentes modificadores de la cromatina pueden

afectar a los tiempos de duplicación regulando la maquinaria del ciclo celular, esto explicaría la disminución observada en la proliferación (Schwarz, Romanski et al. 2011). Al mantener las células indiferenciadas, éstas sufren un número limitado de divisiones debido a su estado quiescente ya que las células progenitoras se dividen más lentamente que las células comprometidas (Araki, Yoshinaga et al. 2007). De Felice y colaboradores observaron que los cultivos con VPA presentaban un número inferior de células en la fase activa del ciclo celular (S-G₂-M), y un elevado número de células en fase G1 (De Felice, Tatarelli et al. 2005). Además se ha observado que el tratamiento con agentes modificadores de la cromatina aumenta la expresión de genes relacionados con la regulación de las HSC (De Felice, Tatarelli et al. 2005) ya que alteran el estado de metilación y desacetilación de los promotores de genes críticos en el mantenimiento y proliferación de HSC. La metilación cambia las interacciones entre las proteínas y el ADN, lo que lleva a una alteración en la estructura de la cromatina provocando un aumento o una disminución de la tasa de transcripción de determinados genes (Jaenisch and Bird 2003). Estos cambios en el patrón de metilación y acetilación de las histonas, estarían activando genes implicados en el automantenimiento de los progenitores hematopoyéticos e inhibiendo genes implicados en la diferenciación. Por ejemplo, Araki y colaboradores observaron que el tratamiento con 5aza 2'deoxicitidina (5azaD) y tricostatina A (TSA), agentes farmacológicos que inducen cambios epigenéticos, resulta en un aumento de la expresión de *HOXB4*, *BMI-1*, *GATA-2*, *p21* y *p27*, que son genes implicados en la regulación de las HSCs (Araki, Mahmud et al. 2006; Araki, Yoshinaga et al. 2007). Estos tratamientos no sólo previenen la pérdida de las HSC sino que promueven la división simétrica dando como resultado la expansión de células con capacidad de reconstitución.

Los resultados del mantenimiento y la expansión de progenitores co-cultivados con células estromales y VPA, eran similares a los obtenidos en co-cultivo con OP9-DL1. La adición de VPA al co-cultivo de progenitores hematopoyéticos con OP9-DL1, no tenía efecto sobre el mantenimiento y la expansión de los progenitores hematopoyéticos ya que los porcentajes y los niveles de proliferación se mantenían (figura 39). Sin embargo, sí que reducía el número total de células CD34⁺ cuyo fenotipo se corresponde con células maduras (figura 38). Lo que indicaría un posible efecto sinérgico del VPA y Notch, en la inhibición de la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos. Este efecto también se veía reflejado en el análisis de los diferentes progenitores comprometidos de linaje, los cuales se veían afectados en número y porcentaje cuando se añadía VPA al cultivo (figura 41-44).

Los efectos del tratamiento con VPA y la inducción de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos son similares, tanto respecto al mantenimiento como a la expansión de los progenitores hematopoyéticos *in vitro*. Existen evidencias bibliográficas de que el VPA activa la vía de Notch en otros sistemas celulares (Stockhausen, Sjolund et al. 2005; Greenblatt, Vaccaro et al. 2007). Recientemente se ha publicado un estudio en el cual muestran como LAQ824, un inhibidor de las histona deacetilasas, inducía la señalización de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos CD34⁺CD38⁻ aislados de médula ósea (Schwarz, Romanski et al. 2011). Sin embargo, un efecto directo de la activación de la vía de Notch es el notable aumento de la población CLP. Y el análisis de esta población cuando se añadía VPA en el sistema OP9, no mostraba el aumento observado en OP9-DL1. Por lo tanto, si VPA activa la vía de Notch lo hace de manera diferente a la activación inducida por DL1. Schwartz y colaboradores observaron que LAQ824 inducía la activación de la expresión de MAML2 y BAF60C mediante la inhibición directa de HDAC1, que forma parte del complejo represor CBF1/RBP-J, remodelando las zonas de unión a la cromatina del complejo activador Notch/CBF (Schwarz, Romanski et al. 2011). Esto induciría la expresión de las dianas de la vía de Notch, Hes1 y Hey1. Otro posible mecanismo sería un aumento en la actividad del complejo γ -secretasa debido a un aumento inducido por el tratamiento con VPA, en la actividad de su promotor.

A partir de estas evidencias es posible que el VPA favorezca la expansión y el automantenimiento de las HSCs mediante un mecanismo de reprogramación transcripcional que tendría como consecuencia la activación de la vía de Notch.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PARTE I. LA EXPRESIÓN DE CD150 EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS DEFINE UNA POBLACIÓN DE HSC CD34⁺CD38⁻ CON BAJA PROLIFERACIÓN

1. El marcador CD150 de la familia SLAM y el marcador CD135, identifican una población minoritaria dentro de la población CD34⁺CD38⁻ de sangre de cordón umbilical. Por otro lado, el marcador CD150 también se expresa en progenitores hematopoyéticos Lin⁻CD34⁺ de sangre periférica movilizada.
2. Las células de la población CD34⁺CD38⁻CD150⁺CD135⁻ de sangre de cordón umbilical y de la población Lin⁻CD34⁺CD150⁺ de sangre periférica movilizada, presentan una baja eficiencia clonogénica. Sin embargo, las señales externas procedentes de las células estromales son capaces de aumentar su eficiencia clonogénica.
3. Esta población contiene progenitores multipotenciales capaces de diferenciarse a células mieloides, NK, B y T.
4. La población podría estar constituida por células quiescentes debido a la baja tasa de proliferación observada y al largo periodo de latencia observado hasta que las células se activan y proliferan. La expresión simultánea de TGFβ1 y p21 también es un indicador de la existencia de células quiescentes dentro de la población de progenitores hematopoyéticos.
5. Esta población posee capacidad de migración, anidamiento y reconstitución de la médula ósea de huéspedes trasplantados. Además contiene células con capacidad de autorenovación y repoblación en trasplantes secundarios de progenitores hematopoyéticos.

PARTE II. NOTCH Y VPA FAVORECEN LA EXPANSIÓN Y EL MANTENIMIENTO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS HUMANOS CD34⁺CD38⁻ *IN VITRO*

1. Las interacciones celulares entre las células estromales y los progenitores hematopoyéticos aumentan la proliferación, reduciendo los procesos de diferenciación de los progenitores hematopoyéticos.
2. La activación de la vía de Notch induce la diferenciación a células T y favorece el mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos en cultivo.
3. Los agentes modificadores de la cromatina como el ácido valproico, un inhibidor de las histona deacetilasas, inhiben la proliferación y la diferenciación de las células madre y los progenitores hematopoyéticos. Estos efectos son similares a los observados tras la activación de la vía de Notch en progenitores hematopoyéticos.
4. Los progenitores hematopoyéticos cultivados con ácido valproico expresan Hes1. La inhibición de la vía de Notch reduce la expresión de Hes1 manteniendo niveles basales de expresión, por lo que la inducción de Hes1 podría ser debida a un mecanismo dependiente o independiente a la activación de la vía de Notch.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G. B., K. T. Chabner, et al. (2006). "Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor." *Nature* **439**(7076): 599-603.
- Adolfsson, J., O. J. Borge, et al. (2001). "Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity." *Immunity* **15**(4): 659-669.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* **404**(6774): 193-197.
- Arai, F., A. Hirao, et al. (2004). "Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche." *Cell* **118**(2): 149-161.
- Araki, H., S. Baluchamy, et al. (2009). "Cord blood stem cell expansion is permissive to epigenetic regulation and environmental cues." *Exp Hematol* **37**(9): 1084-1095.
- Araki, H., N. Mahmud, et al. (2006). "Expansion of human umbilical cord blood SCID-repopulating cells using chromatin-modifying agents." *Exp Hematol* **34**(2): 140-149.
- Araki, H., K. Yoshinaga, et al. (2007). "Chromatin-modifying agents permit human hematopoietic stem cells to undergo multiple cell divisions while retaining their repopulating potential." *Blood* **109**(8): 3570-3578.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* **284**(5415): 770-776.
- Aurran-Schleinitz, T., A. M. Imbert, et al. (1999). "Early progenitor cells from human mobilized peripheral blood express low levels of the flt3 receptor, but exhibit various biological responses to flt3-L." *Br J Haematol* **106**(2): 357-367.
- Austin, T. W., G. P. Solar, et al. (1997). "A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells." *Blood* **89**(10): 3624-3635.
- Bachier, C. R., E. Gokmen, et al. (1999). "Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer." *Exp Hematol* **27**(4): 615-623.
- Baldrige, M. T., K. Y. King, et al. (2010). "Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection." *Nature* **465**(7299): 793-797.
- Baldrige, M. T., K. Y. King, et al. (2011). "Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells." *Trends Immunol* **32**(2): 57-65.
- Batard, P., M. N. Monier, et al. (2000). "TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation." *J Cell Sci* **113** (Pt 3): 383-390.
- Baum, C. M., I. L. Weissman, et al. (1992). "Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 2804-2808.
- Beckmann, J., S. Scheitza, et al. (2007). "Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins." *Blood* **109**(12): 5494-5501.
- Bell, J. J. and A. Bhandoola (2008). "The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential." *Nature* **452**(7188): 764-767.
- Bensinger, W. I., P. J. Martin, et al. (2001). "Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers." *N Engl J Med* **344**(3): 175-181.
- Bhardwaj, G., B. Murdoch, et al. (2001). "Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation." *Nat Immunol* **2**(2): 172-180.

- Bhatia, M., J. C. Wang, et al. (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5320-5325.
- Bigas, A., D. I. Martin, et al. (1998). "Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines." Mol Cell Biol **18**(4): 2324-2333.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Blaise, D., M. Kuentz, et al. (2000). "Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle." J Clin Oncol **18**(3): 537-546.
- Blank, U., G. Karlsson, et al. (2008). "Signaling pathways governing stem-cell fate." Blood **111**(2): 492-503.
- Boiron, J. M., B. Dazey, et al. (2006). "Large-scale expansion and transplantation of CD34(+) hematopoietic cells: in vitro and in vivo confirmation of neutropenia abrogation related to the expansion process without impairment of the long-term engraftment capacity." Transfusion **46**(11): 1934-1942.
- Borge, O. J., V. Ramsfjell, et al. (1997). "Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin." Blood **90**(6): 2282-2292.
- Boussaad, I., L. Varagnolo, et al. (2011). "Wild-type Measles Virus (MV) interferes with short term engraftment of human CD34+ hematopoietic progenitor cells." J Virol.
- Brehm, M. A., A. Cuthbert, et al. (2010). "Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation." Clin Immunol **135**(1): 84-98.
- Broske, A. M., L. Vockentanz, et al. (2009). "DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction." Nat Genet **41**(11): 1207-1215.
- Brown, G., P. J. Hughes, et al. (2007). "The sequential determination model of hematopoiesis." Trends Immunol **28**(10): 442-448.
- Bruckner, K., L. Perez, et al. (2000). "Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions." Nature **406**(6794): 411-415.
- Bueno, C., R. Montes, et al. (2010). "Intra-bone marrow transplantation of human CD34(+) cells into NOD/LtSz-scid IL-2rgamma(null) mice permits multilineage engraftment without previous irradiation." Cytotherapy **12**(1): 45-49.
- Bug, G., H. Gul, et al. (2005). "Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells." Cancer Res **65**(7): 2537-2541.
- Butler, J. M., D. J. Nolan, et al. (2010). "Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **6**(3): 251-264.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-846.
- Congdon, K. L., C. Voermans, et al. (2008). "Activation of Wnt signaling in hematopoietic regeneration." Stem Cells **26**(5): 1202-1210.
- Couban, S., D. R. Simpson, et al. (2002). "A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies." Blood **100**(5): 1525-1531.
- Craig, W., R. Kay, et al. (1993). "Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells." J Exp Med **177**(5): 1331-1342.
- Chabanon, A., C. Desterke, et al. (2008). "A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling

- switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin." Stem Cells **26**(12): 3150-3161.
- Chadwick, N., M. C. Nostro, et al. (2007). "Notch signaling induces apoptosis in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells." Stem Cells **25**(1): 203-210.
- Challen, G. A., N. C. Boles, et al. (2010). "Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1." Cell Stem Cell **6**(3): 265-278.
- Chan, C. K., C. C. Chen, et al. (2009). "Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation." Nature **457**(7228): 490-494.
- Cheng, T., N. Rodrigues, et al. (2000). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science **287**(5459): 1804-1808.
- Cheng, T., H. Shen, et al. (2001). "Transforming growth factor beta 1 mediates cell-cycle arrest of primitive hematopoietic cells independent of p21(Cip1/Waf1) or p27(Kip1)." Blood **98**(13): 3643-3649.
- Cheng, X., T. L. Huber, et al. (2008). "Numb mediates the interaction between Wnt and Notch to modulate primitive erythropoietic specification from the hemangioblast." Development **135**(20): 3447-3458.
- Christensen, J. L. and I. L. Weissman (2001). "Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14541-14546.
- Chuang, D. M., Y. Leng, et al. (2009). "Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions." Trends Neurosci **32**(11): 591-601.
- Chung, Y. J., B. B. Park, et al. (2006). "Unique effects of Stat3 on the early phase of hematopoietic stem cell regeneration." Blood **108**(4): 1208-1215.
- D'Arena, G., P. Musto, et al. (1996). "Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34+ hematopoietic progenitor cells." Haematologica **81**(5): 404-409.
- D'Souza, B., L. Meloty-Kapella, et al. (2010). "Canonical and non-canonical Notch ligands." Curr Top Dev Biol **92**: 73-129.
- da Silva, C. L., R. Goncalves, et al. (2010). "Dynamic cell-cell interactions between cord blood haematopoietic progenitors and the cellular niche are essential for the expansion of CD34+, CD34+CD38- and early lymphoid CD7+ cells." J Tissue Eng Regen Med **4**(2): 149-158.
- Dallas, M. H., B. Varnum-Finney, et al. (2005). "Density of the Notch ligand Delta1 determines generation of B and T cell precursors from hematopoietic stem cells." J Exp Med **201**(9): 1361-1366.
- Danet, G. H., Y. Pan, et al. (2003). "Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions." J Clin Invest **112**(1): 126-135.
- Dao, M. A., J. Hwa, et al. (2002). "Molecular mechanism of transforming growth factor beta-mediated cell-cycle modulation in primary human CD34(+) progenitors." Blood **99**(2): 499-506.
- Datto, M. B., Y. Li, et al. (1995). "Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5545-5549.
- De Felice, L., C. Tatarelli, et al. (2005). "Histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances the cytokine-induced expansion of human hematopoietic stem cells." Cancer Res **65**(4): 1505-1513.
- de La Coste, A. and A. A. Freitas (2006). "Notch signaling: distinct ligands induce specific signals during lymphocyte development and maturation." Immunol Lett **102**(1): 1-9.
- de Pooter, R. F., T. M. Schmitt, et al. (2006). "Notch signaling requires GATA-2 to inhibit myelopoiesis from embryonic stem cells and primary hemopoietic progenitors." J Immunol **176**(9): 5267-5275.
- Delaney, C., S. Heimfeld, et al. (2010). "Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution." Nat Med **16**(2): 232-236.

- Delaney, C., B. Varnum-Finney, et al. (2005). "Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells." *Blood* **106**(8): 2693-2699.
- DiGiusto, D., S. Chen, et al. (1994). "Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34." *Blood* **84**(2): 421-432.
- Domen, J., S. H. Cheshier, et al. (2000). "The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential." *J Exp Med* **191**(2): 253-264.
- Domen, J., K. L. Gandy, et al. (1998). "Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation." *Blood* **91**(7): 2272-2282.
- Domen, J. and I. L. Weissman (2000). "Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other." *J Exp Med* **192**(12): 1707-1718.
- Domen, J. and I. L. Weissman (2003). "Hematopoietic stem cells and other hematopoietic cells show broad resistance to chemotherapeutic agents in vivo when overexpressing bcl-2." *Exp Hematol* **31**(7): 631-639.
- Doulatov, S., F. Notta, et al. (2010). "Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development." *Nat Immunol* **11**(7): 585-593.
- Driessen, R. L., H. M. Johnston, et al. (2003). "Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region." *Exp Hematol* **31**(12): 1284-1291.
- Du, X. X. and D. A. Williams (1994). "Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment." *Blood* **83**(8): 2023-2030.
- Dubois, C. M., F. W. Ruscetti, et al. (1990). "Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action." *J Exp Med* **172**(3): 737-744.
- Dubois, C. M., F. W. Ruscetti, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors." *Blood* **83**(11): 3138-3145.
- Ducos, K., B. Panterne, et al. (2000). "p21(cip1) mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells." *J Cell Physiol* **184**(1): 80-85.
- Duncan, A. W., F. M. Rattis, et al. (2005). "Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance." *Nat Immunol* **6**(3): 314-322.
- Eberharter, A. and P. B. Becker (2002). "Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics." *EMBO Rep* **3**(3): 224-229.
- Elizalde, C., J. Fernandez-Rueda, et al. (2012). "Histone Deacetylase 3 Modulates the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells." *Stem Cells Dev.*
- Essers, M. A., S. Offner, et al. (2009). "IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo." *Nature* **458**(7240): 904-908.
- Fan, X., G. Valdimarsdottir, et al. (2002). "Transient disruption of autocrine TGF-beta signaling leads to enhanced survival and proliferation potential in single primitive human hemopoietic progenitor cells." *J Immunol* **168**(2): 755-762.
- Fei, X. M., Y. J. Wu, et al. (2007). "Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice." *Cytotherapy* **9**(4): 338-347.
- Felli, M. P., M. Maroder, et al. (1999). "Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development." *Int Immunol* **11**(7): 1017-1025.

- Feyerabend, T. B., G. Terszowski, et al. (2009). "Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms." *Immunity* **30**(1): 67-79.
- Fleming, H. E., V. Janzen, et al. (2008). "Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo." *Cell Stem Cell* **2**(3): 274-283.
- Fortunel, N. O., A. Hatzfeld, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis." *Blood* **96**(6): 2022-2036.
- Foudi, A., K. Hochedlinger, et al. (2009). "Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells." *Nat Biotechnol* **27**(1): 84-90.
- Fox, C. J., P. S. Hammerman, et al. (2005). "Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response." *Nat Rev Immunol* **5**(11): 844-852.
- Fukuda, S., H. E. Broxmeyer, et al. (2005). "Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha(CXCL12)/CXCR4 axis." *Blood* **105**(8): 3117-3126.
- Galy, A., M. Travis, et al. (1995). "Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset." *Immunity* **3**(4): 459-473.
- Gallacher, L., B. Murdoch, et al. (2000). "Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7." *Blood* **95**(9): 2813-2820.
- Gao, J., S. Graves, et al. (2009). "Hedgehog signaling is dispensable for adult hematopoietic stem cell function." *Cell Stem Cell* **4**(6): 548-558.
- Gluckman, E. and V. Rocha (2006). "Donor selection for unrelated cord blood transplants." *Curr Opin Immunol* **18**(5): 565-570.
- Goey, H., J. R. Keller, et al. (1989). "Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor-beta 1." *J Immunol* **143**(3): 877-880.
- Gomei, Y., Y. Nakamura, et al. (2010). "Functional differences between two Tie2 ligands, angiopoietin-1 and -2, in regulation of adult bone marrow hematopoietic stem cells." *Exp Hematol* **38**(2): 82-89.
- Gong, J. K. (1978). "Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells." *Science* **199**(4336): 1443-1445.
- Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." *J Exp Med* **183**(4): 1797-1806.
- Gotze, K. S., M. Ramirez, et al. (1998). "Flt3high and Flt3low CD34+ progenitor cells isolated from human bone marrow are functionally distinct." *Blood* **91**(6): 1947-1958.
- Graf, T. (2002). "Differentiation plasticity of hematopoietic cells." *Blood* **99**(9): 3089-3101.
- Greenblatt, D. Y., A. M. Vaccaro, et al. (2007). "Valproic acid activates notch-1 signaling and regulates the neuroendocrine phenotype in carcinoid cancer cells." *Oncologist* **12**(8): 942-951.
- Guitart, A. V., C. Debeissat, et al. (2011). "Very low oxygen concentration (0.1%) reveals two FDCP-Mix cell subpopulations that differ by their cell cycling, differentiation and p27KIP1 expression." *Cell Death Differ* **18**(1): 174-182.
- Guo, M., L. Y. Jan, et al. (1996). "Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch." *Neuron* **17**(1): 27-41.
- Han, H., K. Tanigaki, et al. (2002). "Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision." *Int Immunol* **14**(6): 637-645.
- Han, W., Q. Ye, et al. (2000). "A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells." *Blood* **95**(5): 1616-1625.
- Hao, Q. L., A. J. Shah, et al. (1995). "A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow." *Blood* **86**(10): 3745-3753.

- Heitzler, P. and P. Simpson (1991). "The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*." Cell **64**(6): 1083-1092.
- Hermitte, F., P. Brunet de la Grange, et al. (2006). "Very low O₂ concentration (0.1%) favors G₀ return of dividing CD34+ cells." Stem Cells **24**(1): 65-73.
- Hicks, C., S. H. Johnston, et al. (2000). "Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2." Nat Cell Biol **2**(8): 515-520.
- Hidalgo, A., L. A. Weiss, et al. (2002). "Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally." J Clin Invest **110**(4): 559-569.
- Hirano, T., K. Yasukawa, et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." Nature **324**(6092): 73-76.
- Hock, H., M. J. Hamblen, et al. (2004). "Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells." Nature **431**(7011): 1002-1007.
- Hock, H., E. Meade, et al. (2004). "Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival." Genes Dev **18**(19): 2336-2341.
- Hoebeke, I., M. De Smedt, et al. (2007). "T-, B- and NK-lymphoid, but not myeloid cells arise from human CD34(+)CD38(-)CD7(+) common lymphoid progenitors expressing lymphoid-specific genes." Leukemia **21**(2): 311-319.
- Hofmann, I., E. H. Stover, et al. (2009). "Hedgehog signaling is dispensable for adult murine hematopoietic stem cell function and hematopoiesis." Cell Stem Cell **4**(6): 559-567.
- Hogan, C. J., E. J. Shpall, et al. (2002). "Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 413-418.
- Hozumi, K., N. Negishi, et al. (2004). "Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo." Nat Immunol **5**(6): 638-644.
- Ihle, J. N., J. Keller, et al. (1982). "Procedures for the purification of interleukin 3 to homogeneity." J Immunol **129**(6): 2431-2436.
- Ikuta, K. and I. L. Weissman (1992). "Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1502-1506.
- Ito, K., A. Hirao, et al. (2004). "Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells." Nature **431**(7011): 997-1002.
- Iwama, A., H. Oguro, et al. (2004). "Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1." Immunity **21**(6): 843-851.
- Jacobsen, S. E., F. W. Ruscetti, et al. (1991). "Transforming growth factor-beta transmodulates the expression of colony stimulating factor receptors on murine hematopoietic progenitor cell lines." Blood **77**(8): 1706-1716.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." Nat Genet **33** **Suppl**: 245-254.
- Jaleco, A. C., H. Neves, et al. (2001). "Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation." J Exp Med **194**(7): 991-1002.
- Jang, Y. Y. and S. J. Sharkis (2007). "A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche." Blood **110**(8): 3056-3063.
- Jones, P., G. May, et al. (1998). "Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells." Blood **92**(5): 1505-1511.
- Jones, P. A. and D. Takai (2001). "The role of DNA methylation in mammalian epigenetics." Science **293**(5532): 1068-1070.
- Jung, Y., J. Wang, et al. (2006). "Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing." Bone **38**(4): 497-508.

- Karanu, F. N., B. Murdoch, et al. (2000). "The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(9): 1365-1372.
- Kass, S. U., D. Pruss, et al. (1997). "How does DNA methylation repress transcription?" Trends Genet **13**(11): 444-449.
- Katayama, Y., A. Hidalgo, et al. (2004). "Integrin alpha4beta7 and its counterreceptor MAdCAM-1 contribute to hematopoietic progenitor recruitment into bone marrow following transplantation." Blood **104**(7): 2020-2026.
- Kato, Y., A. Iwama, et al. (2005). "Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis." J Exp Med **202**(1): 169-179.
- Keller, J. R., I. K. McNiece, et al. (1990). "Transforming growth factor beta directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation." Blood **75**(3): 596-602.
- Kessler, C. B. and A. M. Delany (2007). "Increased Notch 1 expression and attenuated stimulatory G protein coupling to adenylyl cyclase in osteonectin-null osteoblasts." Endocrinology **148**(4): 1666-1674.
- Khandanpour, C., C. Kosan, et al. (2011). "Growth factor independence 1 protects hematopoietic stem cells against apoptosis but also prevents the development of a myeloproliferative-like disease." Stem Cells **29**(2): 376-385.
- Kiel, M. J., M. Acar, et al. (2009). "Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance." Cell Stem Cell **4**(2): 170-179.
- Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2006). "Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche." Immunity **25**(6): 862-864.
- Kiel, M. J. and S. J. Morrison (2008). "Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells." Nat Rev Immunol **8**(4): 290-301.
- Kiel, M. J., G. L. Radice, et al. (2007). "Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance." Cell Stem Cell **1**(2): 204-217.
- Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.
- Kim, I., S. He, et al. (2006). "Enhanced purification of fetal liver hematopoietic stem cells using SLAM family receptors." Blood **108**(2): 737-744.
- Kim, M., D. D. Cooper, et al. (1998). "Rhodamine-123 staining in hematopoietic stem cells of young mice indicates mitochondrial activation rather than dye efflux." Blood **91**(11): 4106-4117.
- Kim, S. J. and J. Letterio (2003). "Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis." Leukemia **17**(9): 1731-1737.
- Kirstetter, P., K. Anderson, et al. (2006). "Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block." Nat Immunol **7**(10): 1048-1056.
- Ko, K. H., T. Holmes, et al. (2011). "GSK-3beta inhibition promotes engraftment of ex vivo-expanded hematopoietic stem cells and modulates gene expression." Stem Cells **29**(1): 108-118.
- Koh, S. H., H. S. Choi, et al. (2005). "Co-culture of human CD34+ cells with mesenchymal stem cells increases the survival of CD34+ cells against the 5-aza-deoxycytidine- or trichostatin A-induced cell death." Biochem Biophys Res Commun **329**(3): 1039-1045.
- Kollet, O., A. Dar, et al. (2006). "Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells." Nat Med **12**(6): 657-664.
- Kondo, M., I. L. Weissman, et al. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell **91**(5): 661-672.

- Krause, D. S., M. J. Fackler, et al. (1996). "CD34: structure, biology, and clinical utility." Blood **87**(1): 1-13.
- Kubota, Y., K. Takubo, et al. (2008). "Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche." Biochem Biophys Res Commun **366**(2): 335-339.
- Kumano, K., S. Chiba, et al. (2003). "Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells." Immunity **18**(5): 699-711.
- Kunisato, A., S. Chiba, et al. (2003). "HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo." Blood **101**(5): 1777-1783.
- Kusadasi, N., J. L. Koevoet, et al. (2001). "Stromal support augments extended long-term ex vivo expansion of hemopoietic progenitor cells." Leukemia **15**(9): 1347-1358.
- La Motte-Mohs, R. N., E. Herer, et al. (2005). "Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro." Blood **105**(4): 1431-1439.
- Lacorazza, H. D., T. Yamada, et al. (2006). "The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells." Cancer Cell **9**(3): 175-187.
- Lai, E. C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate." Development **131**(5): 965-973.
- Larochelle, A., M. Savona, et al. (2011). "Human and rhesus macaque hematopoietic stem cells cannot be purified based only on SLAM family markers." Blood **117**(5): 1550-1554.
- Lee, F., T. Yokota, et al. (1986). "Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell- and mast-cell-stimulating activities." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(7): 2061-2065.
- Lehar, S. M., J. Dooley, et al. (2005). "Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors." Blood **105**(4): 1440-1447.
- Li, L. and R. Bhatia (2011). "Stem cell quiescence." Clin Cancer Res **17**(15): 4936-4941.
- Li, L., L. A. Milner, et al. (1998). "The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1." Immunity **8**(1): 43-55.
- Li, Z. and L. Li (2006). "Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments." Trends Biochem Sci **31**(10): 589-595.
- Liu, Y., S. E. Elf, et al. (2009). "p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence." Cell Stem Cell **4**(1): 37-48.
- Lu, L., M. Xiao, et al. (1993). "Comparative effects of suppressive cytokines on isolated single CD34(3+) stem/progenitor cells from human bone marrow and umbilical cord blood plated with and without serum." Exp Hematol **21**(11): 1442-1446.
- Lyman, S. D., L. James, et al. (1993). "Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells." Cell **75**(6): 1157-1167.
- Maillard, I., U. Koch, et al. (2008). "Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **2**(4): 356-366.
- Majeti, R., C. Y. Park, et al. (2007). "Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood." Cell Stem Cell **1**(6): 635-645.
- Mancini, S. J., N. Mantei, et al. (2005). "Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Blood **105**(6): 2340-2342.
- Manz, M. G., T. Miyamoto, et al. (2002). "Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11872-11877.
- Marks, P. A., V. M. Richon, et al. (2000). "Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells." J Natl Cancer Inst **92**(15): 1210-1216.

- Matsunaga, T., T. Kato, et al. (1998). "Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6." Blood **92**(2): 452-461.
- Matsuno, K., R. J. Diederich, et al. (1995). "Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats." Development **121**(8): 2633-2644.
- Matthews, W., C. T. Jordan, et al. (1991). "A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations." Cell **65**(7): 1143-1152.
- Mayani, H., W. Dragowska, et al. (1993). "Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines." Blood **82**(9): 2664-2672.
- McCabe, P. H. (2000). "New anti-epileptic drugs for the 21st century." Expert Opin Pharmacother **1**(4): 633-674.
- McCune, J. M., R. Namikawa, et al. (1988). "The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hemolymphoid differentiation and function." Science **241**(4873): 1632-1639.
- McKenzie, J. L., K. Takenaka, et al. (2007). "Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population." Blood **109**(2): 543-545.
- McKinney-Freeman, S. L., O. Naveiras, et al. (2009). "Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells." Blood **114**(2): 268-278.
- Metcalfe, D. and N. A. Nicola (1983). "Proliferative effects of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells." J Cell Physiol **116**(2): 198-206.
- Milhem, M., N. Mahmud, et al. (2004). "Modification of hematopoietic stem cell fate by 5-aza 2'-deoxycytidine and trichostatin A." Blood **103**(11): 4102-4110.
- Milner, L. A., A. Bigas, et al. (1996). "Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13014-13019.
- Milner, L. A., R. Kopan, et al. (1994). "A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors." Blood **83**(8): 2057-2062.
- Moazed, D. (2001). "Common themes in mechanisms of gene silencing." Mol Cell **8**(3): 489-498.
- Moloney, D. J., V. M. Panin, et al. (2000). "Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch." Nature **406**(6794): 369-375.
- Morita, Y., H. Ema, et al. (2010). "Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment." J Exp Med **207**(6): 1173-1182.
- Muench, M. O., L. Humeau, et al. (2000). "Differential effects of interleukin-3, interleukin-7, interleukin 15, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the generation of natural killer and B cells from primitive human fetal liver progenitors." Exp Hematol **28**(8): 961-973.
- Murray, L., D. DiGiusto, et al. (1994). "Analysis of human hematopoietic stem cell populations." Blood Cells **20**(2-3): 364-369; discussion 369-370.
- Nakano, T., H. Kodama, et al. (1994). "Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture." Science **265**(5175): 1098-1101.
- Namen, A. E., S. Lupton, et al. (1988). "Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7." Nature **333**(6173): 571-573.
- Nemeth, M. J., L. Topol, et al. (2007). "Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15436-15441.
- Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2001). "Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches." Blood **97**(8): 2293-2299.

- Nilsson, S. K., H. M. Johnston, et al. (2005). "Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells." Blood **106**(4): 1232-1239.
- Nobta, M., T. Tsukazaki, et al. (2005). "Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling." J Biol Chem **280**(16): 15842-15848.
- Notta, F., S. Doulatov, et al. (2011). "Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment." Science **333**(6039): 218-221.
- Nygren, J. M., D. Bryder, et al. (2006). "Prolonged cell cycle transit is a defining and developmentally conserved hemopoietic stem cell property." J Immunol **177**(1): 201-208.
- Oh, I. H. and K. R. Kwon (2010). "Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations." Stem Cells **28**(7): 1243-1249.
- Ohishi, K., N. Katayama, et al. (2003). "Notch signalling in hematopoiesis." Semin Cell Dev Biol **14**(2): 143-150.
- Ohishi, K., B. Varnum-Finney, et al. (2002). "Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells." J Clin Invest **110**(8): 1165-1174.
- Ohishi, K., B. Varnum-Finney, et al. (2000). "Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1." Blood **95**(9): 2847-2854.
- Okajima, T., A. Matsuura, et al. (2008). "Biological functions of glycosyltransferase genes involved in O-fucose glycan synthesis." J Biochem **144**(1): 1-6.
- Ong, C. T., H. T. Cheng, et al. (2006). "Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability." J Biol Chem **281**(8): 5106-5119.
- Opferman, J. T., H. Iwasaki, et al. (2005). "Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells." Science **307**(5712): 1101-1104.
- Orford, K. W. and D. T. Scadden (2008). "Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation." Nat Rev Genet **9**(2): 115-128.
- Osawa, M., K. Hanada, et al. (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science **273**(5272): 242-245.
- Papayannopoulou, T. (2003). "Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles." Curr Opin Hematol **10**(3): 214-219.
- Park, I. K., D. Qian, et al. (2003). "Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells." Nature **423**(6937): 302-305.
- Pearce, E. L. (2010). "Metabolism in T cell activation and differentiation." Curr Opin Immunol **22**(3): 314-320.
- Pearson, T., L. D. Shultz, et al. (2008). "Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment." Clin Exp Immunol **154**(2): 270-284.
- Peled, A., O. Kollet, et al. (2000). "The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice." Blood **95**(11): 3289-3296.
- Peled, A., I. Petit, et al. (1999). "Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4." Science **283**(5403): 845-848.
- Pereira, R. M., A. M. Delany, et al. (2002). "Cortisol regulates the expression of Notch in osteoblasts." J Cell Biochem **85**(2): 252-258.
- Perry, J. M., X. C. He, et al. (2011). "Cooperation between both Wnt/{beta}-catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion." Genes Dev **25**(18): 1928-1942.

- Petit, I., P. Goichberg, et al. (2005). "Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells." J Clin Invest **115**(1): 168-176.
- Petit, I., M. Szyper-Kravitz, et al. (2002). "G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4." Nat Immunol **3**(7): 687-694.
- Pierelli, L., M. Marone, et al. (2000). "Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF-beta1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential." Blood **95**(10): 3001-3009.
- Pineault, N., C. D. Helgason, et al. (2002). "Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny." Exp Hematol **30**(1): 49-57.
- Plzak, L. F., W. Fried, et al. (1955). "Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe59." J Lab Clin Med **46**(5): 671-678.
- Pui, J. C., D. Allman, et al. (1999). "Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination." Immunity **11**(3): 299-308.
- Qian, H., N. Buza-Vidas, et al. (2007). "Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **1**(6): 671-684.
- Qian, H., K. Tryggvason, et al. (2006). "Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins." Blood **107**(9): 3503-3510.
- Radtke, F., N. Fasnacht, et al. (2010). "Notch signaling in the immune system." Immunity **32**(1): 14-27.
- Radtke, F., A. Wilson, et al. (2004). "Notch regulation of lymphocyte development and function." Nat Immunol **5**(3): 247-253.
- Radtke, F., A. Wilson, et al. (1999). "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1." Immunity **10**(5): 547-558.
- Rappold, I., B. L. Ziegler, et al. (1997). "Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase." Blood **90**(1): 111-125.
- Reya, T., A. W. Duncan, et al. (2003). "A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells." Nature **423**(6938): 409-414.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Rice, K. L., I. Hormaeche, et al. (2007). "Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis." Oncogene **26**(47): 6697-6714.
- Robb, R. J., R. M. Kutny, et al. (1983). "Purification and partial sequence analysis of human T-cell growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(19): 5990-5994.
- Robey, E., D. Chang, et al. (1996). "An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages." Cell **87**(3): 483-492.
- Ruscetti, F. W., S. Akel, et al. (2005). "Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context." Oncogene **24**(37): 5751-5763.
- Sacchetti, B., A. Funari, et al. (2007). "Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment." Cell **131**(2): 324-336.
- Salter, A. B., S. K. Meadows, et al. (2009). "Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo." Blood **113**(9): 2104-2107.
- Sauvageau, G., N. N. Iscove, et al. (2004). "In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells." Oncogene **23**(43): 7223-7232.
- Sauvageau, G., P. M. Lansdorp, et al. (1994). "Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 12223-12227.

- Scandura, J. M., P. Boccuni, et al. (2004). "Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(42): 15231-15236.
- Scott, L. M., G. V. Priestley, et al. (2003). "Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing." Mol Cell Biol **23**(24): 9349-9360.
- Schepers, H., D. van Gosliga, et al. (2007). "STAT5 is required for long-term maintenance of normal and leukemic human stem/progenitor cells." Blood **110**(8): 2880-2888.
- Schmitt, T. M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2002). "Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro." Immunity **17**(6): 749-756.
- Schmitz, N., M. Beksac, et al. (2002). "Transplantation of mobilized peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia." Blood **100**(3): 761-767.
- Schwarz, K., A. Romanski, et al. (2011). "The deacetylase inhibitor LAQ824 induces notch signalling in haematopoietic progenitor cells." Leuk Res **35**(1): 119-125.
- Seita, J. and I. L. Weissman (2010). "Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **2**(6): 640-653.
- Shima, H., K. Takubo, et al. (2009). "Reconstitution activity of hypoxic cultured human cord blood CD34-positive cells in NOG mice." Biochem Biophys Res Commun **378**(3): 467-472.
- Shpall, E. J., R. Quinones, et al. (2002). "Transplantation of ex vivo expanded cord blood." Biol Blood Marrow Transplant **8**(7): 368-376.
- Singh, N., R. A. Phillips, et al. (2000). "Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis." Exp Hematol **28**(5): 527-534.
- Sintes, J., X. Romero, et al. (2008). "Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells." Exp Hematol **36**(9): 1199-1204.
- Sitnicka, E., N. Lin, et al. (1996). "The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells." Blood **87**(12): 4998-5005.
- Sitnicka, E., F. W. Ruscetti, et al. (1996). "Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells." Blood **88**(1): 82-88.
- Snow, J. W., N. Abraham, et al. (2002). "STAT5 promotes multilineage hematology development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells." Blood **99**(1): 95-101.
- Soderberg, S. S., G. Karlsson, et al. (2009). "Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling." Ann N Y Acad Sci **1176**: 55-69.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld, et al. (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.
- Srour, E. F., J. E. Brandt, et al. (1991). "Human CD34+ HLA-DR- bone marrow cells contain progenitor cells capable of self-renewal, multilineage differentiation, and long-term in vitro hematopoiesis." Blood Cells **17**(2): 287-295.
- Stier, S., T. Cheng, et al. (2002). "Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome." Blood **99**(7): 2369-2378.
- Stockhausen, M. T., J. Sjolund, et al. (2005). "Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells." Br J Cancer **92**(4): 751-759.
- Storms, R. W., P. D. Green, et al. (2005). "Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34." Blood **106**(1): 95-102.

- Sugiyama, T., H. Kohara, et al. (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-988.
- Tadokoro, Y., H. Ema, et al. (2007). "De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells." J Exp Med **204**(4): 715-722.
- Takubo, K., N. Goda, et al. (2010). "Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells." Cell Stem Cell **7**(3): 391-402.
- To, L. B., D. N. Haylock, et al. (1997). "The biology and clinical uses of blood stem cells." Blood **89**(7): 2233-2258.
- Topol, L., X. Jiang, et al. (2003). "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." J Cell Biol **162**(5): 899-908.
- Tothova, Z., R. Kollipara, et al. (2007). "FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress." Cell **128**(2): 325-339.
- Trevisan, M. and N. N. Iscove (1995). "Phenotypic analysis of murine long-term hemopoietic reconstituting cells quantitated competitively in vivo and comparison with more advanced colony-forming progeny." J Exp Med **181**(1): 93-103.
- Trowbridge, J. J., M. P. Scott, et al. (2006). "Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14134-14139.
- Trowbridge, J. J., J. W. Snow, et al. (2009). "DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells." Cell Stem Cell **5**(4): 442-449.
- Tung, S. S., S. Parmar, et al. (2010). "Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation." Best Pract Res Clin Haematol **23**(2): 245-257.
- Ulyanova, T., L. M. Scott, et al. (2005). "VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin." Blood **106**(1): 86-94.
- Umemoto, T., M. Yamato, et al. (2005). "p57Kip2 is expressed in quiescent mouse bone marrow side population cells." Biochem Biophys Res Commun **337**(1): 14-21.
- Van Coppennolle, S., S. Vanhee, et al. (2012). "Notch induces human T-cell receptor gammadelta+ thymocytes to differentiate along a parallel, highly proliferative and bipotent CD4 CD8 double-positive pathway." Leukemia **26**(1): 127-138.
- van Os, R., L. M. Kamminga, et al. (2007). "A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning." Stem Cells **25**(4): 836-843.
- Varnum-Finney, B., C. Brashem-Stein, et al. (2003). "Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability." Blood **101**(5): 1784-1789.
- Varnum-Finney, B., L. M. Halasz, et al. (2011). "Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells." J Clin Invest **121**(3): 1207-1216.
- Varnum-Finney, B., L. E. Purton, et al. (1998). "The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells." Blood **91**(11): 4084-4091.
- Varnum-Finney, B., L. Xu, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med **6**(11): 1278-1281.
- Visan, I., J. S. Yuan, et al. (2006). "Regulation of intrathymic T-cell development by Lunatic Fringe- Notch1 interactions." Immunol Rev **209**: 76-94.
- Wada, H., K. Masuda, et al. (2008). "Adult T-cell progenitors retain myeloid potential." Nature **452**(7188): 768-772.

- Walker, L., A. Carlson, et al. (2001). "The notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse." Stem Cells **19**(6): 543-552.
- Walker, L., M. Lynch, et al. (1999). "The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro." Stem Cells **17**(3): 162-171.
- Warren, L., D. Bryder, et al. (2006). "Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17807-17812.
- Washburn, T., E. Schweighoffer, et al. (1997). "Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision." Cell **88**(6): 833-843.
- Weber, J. M., S. R. Forsythe, et al. (2006). "Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells." Bone **39**(3): 485-493.
- Weidinger, G. and R. T. Moon (2003). "When Wnts antagonize Wnts." J Cell Biol **162**(5): 753-755.
- Weissman, I. L. and J. A. Shizuru (2008). "The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases." Blood **112**(9): 3543-3553.
- Wendling, F., E. Maraskovsky, et al. (1994). "cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis." Nature **369**(6481): 571-574.
- Wilson, A., E. Laurenti, et al. (2008). "Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair." Cell **135**(6): 1118-1129.
- Wilson, A., H. R. MacDonald, et al. (2001). "Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus." J Exp Med **194**(7): 1003-1012.
- Wilson, A., G. M. Oser, et al. (2007). "Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches." Ann N Y Acad Sci **1106**: 64-75.
- Willert, K., J. D. Brown, et al. (2003). "Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors." Nature **423**(6938): 448-452.
- Wognum, A. W., A. C. Eaves, et al. (2003). "Identification and isolation of hematopoietic stem cells." Arch Med Res **34**(6): 461-475.
- Wright, D. E., S. H. Cheshier, et al. (2001). "Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor causes selective mobilization of bone marrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle." Blood **97**(8): 2278-2285.
- Wu, L., J. C. Aster, et al. (2000). "MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors." Nat Genet **26**(4): 484-489.
- Wu, M., H. Y. Kwon, et al. (2007). "Imaging hematopoietic precursor division in real time." Cell Stem Cell **1**(5): 541-554.
- Xiao, M., B. K. Oppenlander, et al. (1999). "Expression of Flt3 and c-kit during growth and maturation of human CD34+CD38- cells." Exp Hematol **27**(5): 916-927.
- Yamazaki, S., A. Iwama, et al. (2009). "TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation." Blood **113**(6): 1250-1256.
- Yamazaki, S., A. Iwama, et al. (2006). "Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells." EMBO J **25**(15): 3515-3523.
- Yang, L., D. Bryder, et al. (2005). "Identification of Lin(-)Sca1(+), kit(+), CD34(+), Flt3(-) short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients." Blood **105**(7): 2717-2723.
- Yang, L. T., J. T. Nichols, et al. (2005). "Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1." Mol Biol Cell **16**(2): 927-942.

- Yilmaz, O. H., M. J. Kiel, et al. (2006). "SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity." *Blood* **107**(3): 924-930.
- Yilmaz, O. H., R. Valdez, et al. (2006). "Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells." *Nature* **441**(7092): 475-482.
- Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **90**(12): 5002-5012.
- Yong, K. L., M. Watts, et al. (1998). "Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31)." *Blood* **91**(4): 1196-1205.
- Yoshihara, H., F. Arai, et al. (2007). "Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche." *Cell Stem Cell* **1**(6): 685-697.
- Yu, X., J. K. Alder, et al. (2006). "HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding." *Stem Cells* **24**(4): 876-888.
- Zandstra, P. W., E. Conneally, et al. (1997). "Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4698-4703.
- Zeng, H., R. Yucel, et al. (2004). "Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells." *EMBO J* **23**(20): 4116-4125.
- Zhang, J., C. Niu, et al. (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." *Nature* **425**(6960): 836-841.
- Zhao, C., A. Chen, et al. (2009). "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." *Nature* **458**(7239): 776-779.
- Zhao, X., G. Ren, et al. (2010). "Brief report: interferon-gamma induces expansion of Lin(-)Sca-1(+)C-Kit(+) Cells." *Stem Cells* **28**(1): 122-126.
- Zhu, H. H., K. Ji, et al. (2011). "Kit-Shp2-Kit signaling acts to maintain a functional hematopoietic stem and progenitor cell pool." *Blood* **117**(20): 5350-5361.
- Zhu, J. and S. G. Emerson (2002). "Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment." *Oncogene* **21**(21): 3295-3313.
- Zlotoff, D. A. and A. Bhandoola (2011). "Hematopoietic progenitor migration to the adult thymus." *Ann N Y Acad Sci* **1217**: 122-138.