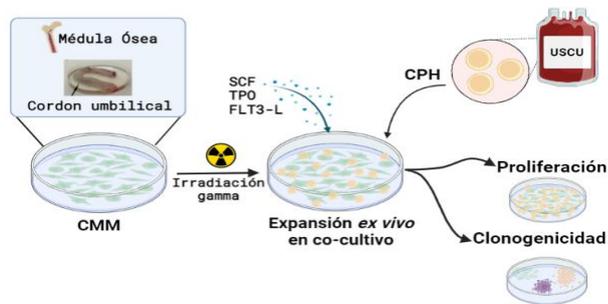


“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXPANSIÓN *EX VIVO* DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS AISLADAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE DIFERENTES TEJIDOS”

“STANDARDIZATION OF AN *EX VIVO* EXPANSION PROTOCOL OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS ISOLATED FROM UMBILICAL CORD BLOOD IN CO-CULTURE WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FROM DIFFERENT TISSUES”

Graphical Abstract (GA)

GA Figura:



GA Texto: Co-cultivo de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de sangre de cordón umbilical (USCU) con células madre mesenquimales (CMM).

“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXPANSIÓN *EX VIVO* DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS AISLADAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE DIFERENTES TEJIDOS”

“STANDARDIZATION OF AN *EX VIVO* EXPANSION PROTOCOL OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS ISOLATED FROM UMBILICAL CORD BLOOD IN CO-CULTURE WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FROM DIFFERENT TISSUES”

*Ana Milena Lara Rodriguez**

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Ximena Bonilla,
PhD y Nelson Enrique Arenas
PhD.*

Resumen

La sangre de cordón umbilical es empleada como fuente de células progenitoras hematopoyéticas, para la regeneración de los sistemas hematopoyético e inmunológico en diversas enfermedades hematológicas; sin embargo, su baja dosis celular limita su uso a pacientes pediátricos. En este trabajo se propone la estandarización de una técnica de expansión celular para compensar la dosis de células infundidas, a través de la manipulación *ex vivo* de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical antes del trasplante. El modelo de expansión se realizó mediante un co-cultivo con células madre mesenquimales de médula ósea y de tejidos fetales poco explorados. Los resultados demuestran que el co-cultivo con las células madre mesenquimales estudiadas permite maximizar la dosis celular de células progenitoras hematopoyéticas entre 5 y 16 veces, con un alto potencial clonogénico. Además, se evidenció que el tratamiento con irradiación gamma, mantiene la capacidad de soporte hematopoyético de las células madre mesenquimales de las tres fuentes estudiadas respecto a los tratamientos sin irradiación, favoreciendo las condiciones en el sistema de expansión *ex vivo* en co-cultivo. Se espera que este protocolo estandarizado contribuya al desarrollo de la expansión *ex vivo* a mayor escala, posibilitando su uso clínico y ampliando su aplicación en adultos.

Palabras clave: Cordón umbilical, expansión *ex vivo*, CD34⁺, células madre mesenquimales.

“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EXPANSIÓN *EX VIVO* DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS AISLADAS DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE DIFERENTES TEJIDOS”

“STANDARDIZATION OF AN *EX VIVO* EXPANSION PROTOCOL OF HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS ISOLATED FROM UMBILICAL CORD BLOOD IN CO-CULTURE WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FROM DIFFERENT TISSUES”

Abstract

Umbilical cord blood is used as a source of hematopoietic progenitor cells, for regeneration of the hemopoietic and immune systems in various hematological diseases; despite that, a low cellular dose limits its application in pediatric patients. In this study the standardization of cell expansion technique of compensation for the dose infused cells is proposed, through *ex vivo* manipulation of hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood before transplantation. The expansion model was performed by co-culture with mesenchymal stem cells and bone marrow fetal tissues unexplored. The results show that the mesenchymal stem cells co-culture studied allowed to maximize cell dose of hematopoietic progenitor cells between 5 and 16 folds, with high potential clonogenic. Moreover, evidence that treatment with gamma irradiation maintains the capacity to support hematopoietic mesenchymal stem cells from the three sources studied regarding the treatments without irradiation, promoting conditions in the *ex vivo* expansion system in co-culture. It is expected that this standardized protocol will contribute to the development of *ex vivo* expansion larger scale, towards enabling its clinical use and expand further application in adults.

Keywords: Umbilical cord, *ex vivo* expansión, CD34⁺, mesenchymal stem cells.

Introducción

La sangre de cordón umbilical (SCU) está siendo empleada cada vez más como fuente alternativa de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) para la reconstitución de los sistemas hematopoyético e inmunológico, actuando así como tratamiento para diversas enfermedades hematológicas como leucemias, linfomas, inmunodeficiencias, aplasias, entre otras (Emiloju et al., 2019; Lund et al., 2015; Pinho et al., 2019). La reconstitución exitosa de CPH, se consigue cuando: las CPH son capaces de migrar al microentorno o “nicho” de la médula ósea (MO) guiadas por distintos mediadores biológicos quimioatrayentes como el factor de células madre 1 (SDF-1), prostaglandina E2 (PGE₂), entre otros; luego, las CPH se injertan, expanden y ocupan el “nicho” medular; y por último, las CPH se diferencian ante diferentes estímulos, logrando de esta manera reconstituir el sistema hematopoyético compuesto por neutrófilos, glóbulos rojos, plaquetas, linfocitos, entre otros (Lund et al., 2015).

El uso progresivo de la SCU se debe principalmente a que es menos restrictiva en cuanto a compatibilidad entre el donante y el paciente, comparada con otras fuentes de CPH como MO y sangre periférica (SP) movilizada, de manera que al trasplantarse, permite la reconstitución inmunológica total en los pacientes, generando una menor intensidad e incidencia de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) (Gluckman et al., 2000; MacMillan et al., 2015). La EICH se considera una de las principales causas de mortalidad y morbilidad luego del trasplante de CPH debido a las diferencias de histocompatibilidad, causando daño tisular en el tracto gastrointestinal, la piel y el hígado principalmente (Gluckman et al., 2000; Metheny et al., 2013). La ventaja de la SCU frente a EICH, puede atribuirse a la inmadurez del sistema inmunitario del recién nacido, que se caracteriza por una disminución del potencial alorreactivo de los linfocitos del cordón umbilical, de manera que se disminuye el ataque al tejido receptor inmunodeficiente (Emiloju et al., 2019; MacMillan et al., 2015). Otra ventaja para destacar en el uso de SCU reside en que la unidad de sangre de cordón umbilical (USCU) puede colectarse al nacer sin generar ningún daño para el recién nacido (puesto que involucra procedimientos no invasivos para la donante) y posteriormente puede congelarse para su

almacenamiento y preservación, resultando fácilmente disponible en el tiempo para pacientes a través de bancos de sangre (Gounari et al., 2019; Lima de et al., 2012; Metheny et al., 2013). Además, se ha demostrado que las CPH producen colonias hematopoyéticas *in vitro*, demostrando así el mantenimiento de sus propiedades como células madre (“*stem*”), después de su manipulación (Gluckman et al., 2000). Las CPH poseen la propiedad de autorrenovación, proceso donde son capaces de dividirse produciendo células hijas idénticas a la célula progenitora inicial, conservando su estado indiferenciado y de diferenciación, generando así los diferentes linajes celulares (Frausin et al., 2015; Pimentel-Parra et al., 2017).

El principal problema de la SCU es su baja dosis celular, tanto de células nucleadas totales (CNT), que son un factor determinante para realizar el trasplante de acuerdo con el peso del paciente, como de CPH que son menores en proporción respecto a las demás fuentes (Cancelas et al., 1996). Esto conduce a tiempos prolongados de injerto (25 días) en relación con aloinjertos típicos de MO (17 días) o SP movilizada (14 días) (Emiloju et al., 2019; Lund et al., 2015) y posibles complicaciones infecciosas a corto y largo plazo (Hofmeister et al., 2007; Laughlin et al., 2004; Metheny et al., 2013). Por lo anterior, su uso está limitado principalmente a pacientes pediátricos (Laughlin et al., 2004), y restringe su uso en adultos, a menos que se utilice algún método para compensar la dosis de células injertadas (Chan et al., 2007; Lund et al., 2015; Metheny et al., 2013). Se han planteado varias alternativas para compensar la dosis de células injertadas, una de ellas es el trasplante de dos unidades de SCU, sin embargo, se ha encontrado que sólo una de las dos unidades trasplantadas es capaz de injertar y regenerar el sistema hematopoyético (Emiloju et al., 2019; Metheny et al., 2013). Otra herramienta utilizada es la manipulación *ex vivo* de las células de SCU antes del trasplante (Lund et al., 2015; Orticelli et al., 2021; Pinho et al., 2019), bien sea realizando modificaciones genéticas a una de las dos unidades o expandiendo las CPH, con el fin de mejorar la proporción de las mismas en el injerto (Emiloju et al., 2019; Robinson et al., 2006).

La expansión de las CPH ha sido abordada desde diferentes frentes basados en los mecanismos fisiológicos que permiten mantener un equilibrio entre el mantenimiento y la regeneración de CPH en

el entorno medular, es el caso del tratamiento con citoquinas presentes en el “nicho”, el bloqueo de diferentes moléculas de adhesión y la inhibición de la metilación del ADN (Hofmeister et al., 2007; Mendelson et al., 2014). Las anteriores estrategias favorecen el incremento en el número de células disponibles para el trasplante; sin embargo, ocurre una expansión de CPH con cierto grado de diferenciación en lugar de la expansión de células primitivas (Hofmeister et al., 2007; Robinson et al., 2006), lo que conduce a una disminución de la capacidad de anidación y reconstitución inmunológica, y que, entre otros factores, es determinante en la recuperación de los pacientes que reciben un trasplante (Lund et al., 2015).

Se ha estudiado el concepto de “nicho” medular definido inicialmente como un microambiente anatómico y funcional, ubicado en la médula ósea, que está ocupado por células progenitoras hematopoyéticas cuyo entorno les permite mantenerse en un estado indiferenciado (Schofield, 1978). Posteriormente, otros estudios demostraron que en el nicho medular, las CPH se asocian con otros tipos celulares (células endoteliales, células del sistema inmune, neuronas de sistema periférico, osteoblastos, osteoclastos, células madre mesenquimales y células hematopoyéticas), componentes de la matriz extracelular y metabolitos que regulan sus actividades y determinan el momento en el que ocurren procesos de diferenciación, quiescencia o proliferación, de acuerdo con las necesidades del organismo en respuesta a estímulos fisiológicos (Metheny et al., 2013; Pinho et al., 2019). Con base en dichas interacciones en el nicho, se han explorado dos técnicas de expansión *ex vivo* de CPH: la primera, aislando CPH a partir de tejido hematopoyético fresco o congelado e incubándolas junto con una combinación de las citoquinas que participan en la homeostasis y proliferación de las CPH, y que incluye: el factor de células madre (SCF), el ligando de tirosina quinasa-3 similar a FMS (FLT3-L) y la trombopoyetina (TPO). Estas citoquinas se denominan citoquinas de acción temprana y poseen en conjunto, un efecto sinérgico para estimular la proliferación de las CPH *ex vivo*, simulando las condiciones del microambiente medular (Emiloju et al., 2019; Robinson et al., 2006; Zimran et al., 2021). La segunda técnica de expansión es a través del co-cultivo con células madre mesenquimales (CMM) dado que en el nicho, las CMM interactúan con las CPH ya sea por secreción de factores

solubles al microambiente por parte de las CMM o por interacción directa entre las dos poblaciones celulares a través de proteínas de superficie, lo cual respalda el mantenimiento de las propiedades *stem* de las CPH (Boulais et al., 2015; Lund et al., 2015). Además, se ha demostrado que las CMM pueden mantener *ex vivo* el estado de quiescencia de las CPH aisladas de la MO a través de estas mismas interacciones (Andrzejewska et al., 2019; Hofmeister et al., 2007).

Las CMM son células multipotenciales que dan lugar a células que constituyen el tejido conectivo en organismos adultos como huesos, cartílagos, tendones, ligamentos, músculos y médula ósea; por esta razón poseen potencial de diferenciación adipogénico, condrogénico y osteogénico y se caracterizan por su morfología fibroblastoide (Frausin et al., 2015; Krampera et al., 2013). Su identificación se basa en la propiedad de adherencia plástica *in vitro* que presentan en cultivo, y por su caracterización inmunofenotípica mediante citometría de flujo de acuerdo a los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), que define la expresión de los siguientes marcadores: CD105, CD90, CD73, CD44 y HLA-I y ausencia de los marcadores CD19, CD45, CD34, CD14, y HLA-II (Andrzejewska et al., 2019; Dominici et al., 2006). Las CMM pueden recolectarse de tejidos del cuerpo humano adulto como la MO, la SP, la pulpa dental, el tejido adiposo, la sangre menstrual, el endometrio y la leche materna. Así mismo, las CMM pueden obtenerse de tejidos fetales, como el líquido amniótico, las membranas, la placenta y el cordón umbilical (compuesto por gelatina de Wharton (GW) y SCU) (Hass et al., 2011; Katz 2005). Es de particular interés resaltar que las CMM de origen fetal en comparación con las células aisladas de tejidos del cuerpo humano adulto, se caracterizan por una tasa de proliferación más rápida (Andrzejewska et al., 2019; Lo Iacono et al., 2015).

En cuanto a la obtención de CPH, existe un método eficiente para su aislamiento y purificación bajo condiciones de esterilidad, basado en la expresión selectiva de la glucoproteína transmembrana característica de las CPH conocida como CD34, que actúa como marcador de superficie característico para la identificación de primitividad de las CPH. Este método consiste en la selección positiva de las células CD34 por inmunomagnetismo, empleando perlas magnéticas recubiertas por un anticuerpo monoclonal para CD34⁺; este método de aislamiento ha permitido obtener purezas entre 50-95%

(Cancelas et al., 1996; Kekarainen et al., 2006).

En contexto, diversos estudios han planteado una técnica de co-cultivo con CMM de MO suplementado con citoquinas de acción temprana para la expansión *ex vivo* de CPH de SCU, simulando en mayor medida las condiciones del nicho, lo cual ha permitido maximizar la dosis celular de CPH, entre 8 y 37 veces, manteniéndolas en un estado indiferenciado (Orticelli et al., 2021; Robinson et al., 2006). No obstante, su uso en clínica es limitado, por lo cual esta técnica debe optimizarse y escalarse.

Por otra parte, se ha estudiado que el uso de rayos gamma inhibe la proliferación de CMM hasta dos semanas después de la irradiación, conservando la viabilidad y funcionalidad celular (Nold et al., 2015), de manera que este acondicionamiento mejora la capacidad de soporte hematopoyético de CMM a bajas dosis de irradiación aumentando la capacidad de proliferación de CPH en un sistema de expansión *ex vivo* en co-cultivo (Preciado et al., 2018).

El presente estudio plantea la estandarización de las condiciones de cultivo para el desarrollo de un protocolo de expansión *ex vivo* de CPH aisladas de SCU, en co-cultivo con CMM de diferentes tejidos, como MO, SCU y GW, ya que se ha evidenciado la poca exploración de tejidos fetales como fuente de CMM, que sirvan como soporte para la expansión a través de los factores solubles liberados al medio o del contacto directo célula-célula; brindando así diferentes alternativas de fuentes de CMM soporte y que en mayor medida, contribuyan al desarrollo de una técnica estandarizada de expansión a mayor escala. Adicionalmente, es preciso determinar la capacidad de proliferación y clonogenicidad de las CPH de SCU después del proceso de expansión, como criterio preliminar para evaluar su funcionalidad y así garantizar el mantenimiento de sus propiedades *stem* que en consecuencia, posibilitarían su uso clínico, ampliando su aplicación en adultos y mejorando el injerto en los pacientes. Finalmente, se hace conveniente determinar el efecto de la irradiación gamma de CMM como técnica de pre-acondicionamiento para su posterior uso en el sistema de expansión *ex vivo* de CPH de SCU.

1. Materiales y Métodos

1.1 Descripción general del estudio

El presente estudio se desarrolló en el marco del proyecto de investigación 738 de 2018 financiado por MinCiencias: “Evaluación de la capacidad de soporte de las células madre mesenquimales de diferentes tejidos en la expansión de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical”, donde las actividades como la sensibilización de madres gestantes para donación de cordón umbilical con fines de investigación, la toma del consentimiento informado a las donantes (documento previamente aprobado por el comité de ética de la subred Norte en la ciudad de Bogotá), la obtención, el aislamiento y la caracterización de CMM bajo protocolos ya establecidos para generar líneas celulares a utilizar en este estudio, la colecta de USCU para aislamiento de CPH y la estandarización y validación del protocolo de aislamiento inmunomagnético de células CD34⁺, fueron llevadas a cabo por investigadores y personal de salud del Grupo de Investigación del Banco de Sangre de Cordón Umbilical (GIBSCU) del Instituto Distrital de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud (IDCBIS).

1.2 Criterios primarios para la selección de donantes de cordón umbilical

Dado que algunas patologías o factores de riesgo del donante pueden interferir con la calidad de las USCU colectadas, se definieron los siguientes criterios de inclusión para la selección de donantes basados en los criterios definidos previamente en el GIBSCU, tales como: edad de la gestante (mayor de 18 años), edad gestacional (mayor a 34 semanas), parto o cesárea sin complicaciones, ausencia de enfermedades infecciosas en la gestante, ausencia de antecedentes de cáncer familiar o hereditario, ausencia de enfermedades genéticas del sistema linfohematopoyético en la familia, entre otros.

1.3 Obtención, aislamiento y caracterización de CMM

Previo a este estudio se obtuvieron y aislaron CMM provenientes de MO, SCU y GW de

diferentes donantes en la ciudad de Bogotá, después de dar su consentimiento informado de forma escrita para su uso en investigación.

1.3.1 Obtención de muestras de MO

Las muestras de MO se obtuvieron de 2 pacientes sanos sometidos al procedimiento de recolección de médula ósea para trasplante a paciente relacionado, en el Hospital de la Misericordia (HOMI) previa firma de consentimiento informado de los padres y/o representante legal. La muestra fue tomada por el hemato-oncólogo pediatra y recibida en un tubo estéril con ácido etilendiaminotetraacético 0.5 M (EDTA; Invitrogen, USA) al 0,25% en buffer fosfato 1X (PBS; Gibco, USA).

1.3.2 Obtención de muestras de SCU y GW

El cordón umbilical se obtuvo de 5 donantes con embarazos únicos y a término en la Subred Integrada de Servicios de Salud Norte -Centro de Servicios Especializados Suba. Las donantes se seleccionaron de acuerdo a los criterios definidos en el procedimiento operativo estandarizado actual del GIBSCU para unidades destinadas a investigación, siguiendo los requisitos de calidad de la Fundación Internacional Netcord y la Fundación para la acreditación de Terapia Celular (NETCORD-FACT), definidos en el Manual de acreditación de estándares internacionales de sangre de cordón umbilical, 2019. La recolección de SCU se realizó mediante punción de la vena umbilical in-útero (antes del alumbramiento de la placenta) y/o ex-útero (posterior al alumbramiento de la placenta), de acuerdo al procedimiento operativo del GIBSCU y fue recibida en bolsa Terumo o Pall con anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa (CPD). Para la recolección de GW se colectaron fragmentos de cordón umbilical de 15 cm en un tubo Falcon estéril en solución salina con antibiótico (penicilina/estreptomicina; Gibco, USA) al 1%.

1.3.3 Aislamiento de CMM y generación de líneas celulares

Las CMM de MO se utilizaron como control positivo de proliferación dado que se encuentran naturalmente en el nicho medular y ya se han diseñado diversas metodologías experimentales que demuestran su capacidad de soporte hematopoyético. (Robinson et al., 2006). El aislamiento de CMM provenientes de SCU y MO se realizó a partir de células mononucleares totales (CMT) criopreservadas (6×10^7 células por vial), de acuerdo al procedimiento operativo del GIBSCU. La descongelación de los crioviales se realizó empleando una solución de descongelación que contenía PBS 1X, albúmina humana (Biotest, UK) al 4.2% e hidroxietil-almidón al 0.6% (HES; Grifols, USA) en una proporción 1:8 respecto al volumen del criovial, siendo la solución de descongelación la de mayor proporción. Posterior a 30 minutos de estabilización post-descongelación a temperatura ambiente, se realizó conteo de las CMT mediante hematocitómetro y se determinó viabilidad celular por tinción con 7-amino-actinomicina D (7-AAD; BD Biosciences, USA). La suspensión celular se centrifugó a $400 \times g$ durante 7 minutos sin freno y el pellet obtenido se resuspendió en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB; Biowest, USA) al 30% y 100 nM de dexametasona (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) con el fin de evitar adherencia de los monocitos. Se cultivaron 1×10^6 cél/mL en cajas plásticas Petri de 10 cm^2 en medio DMEM. Las células se incubaron a 37°C con 5% CO_2 durante 48 h y se verificó por microscopía óptica invertida la presencia de células adheridas. Se retiró el medio con las células no adheridas y se reemplazó con DMEM suplementado cada tres días hasta que las células alcanzaron confluencia del 80%. Posteriormente se tripsinizaron y se sembraron 3×10^4 cel/mL en cajas de 75 cm^2 . Una vez alcanzaron confluencia del 80% se tripsinizaron y se suspendieron en una solución de DMEM al 50%, SFB al 40% y dimetil sulfóxido (DMSO; WAK-Chemie, Alemania) al 10%, con una densidad celular de 1×10^6 cel/mL. Luego se criopreservaron en alícuotas de 1 mL a -196°C en nitrógeno líquido con previo acondicionamiento en gradiente de temperatura.

Para GW se realizó fragmentación del cordón en ambiente estéril, los fragmentos se lavaron con PBS 1X, penicilina/estreptomicina 1X y se sometieron a agitación. Posteriormente se realizó un corte

lateral del fragmento, se separaron los vasos y se realizó un raspado de la GW. Los explantes de GW se colocaron en caja plástica estéril de 10 cm², dividida en 4 cuadrantes, y en cada cuadrante se colocaron cerca de ocho explantes de GW. Se incubó a 37°C con 5% CO₂ durante 5 minutos y se adicionó medio DMEM suplementado con SFB 10%. Las cajas se incubaron durante 48 h a 37°C con 5% CO₂ y se verificó por microscopía óptica invertida la presencia de células adheridas. El medio de cultivo DMEM suplementado fue reemplazado cada 48 h, hasta observar confluencia del 80%. Para los cultivos primarios se siguieron los mismos lineamientos de tripsinización, siembra y criopreservación, descritos para SCU y MO.

1.3.4 Caracterización de CMM

La identificación de CMM se basó en la observación al microscopio invertido de su propiedad de adherencia plástica *in vitro* con morfología fibroblastoide. Por último, se realizó una caracterización inmunofenotípica de la población expandida para las tres fuentes de CMM mediante un citómetro de flujo BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA), utilizando un panel de anticuerpos monoclonales para la identificación y cuantificación de expresión de proteínas de superficie característicos de CMM, estos marcadores han sido definidos por la ISCT (Krampera et al., 2013): CD105-aloficocianina (APC), CD90-isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD73- APC, CD44-ficoeritrina-cianina 7 (PECy7), HLA-ABC-Alexa fluor, como marcadores positivos y CD45-ficoeritrina (PE), CD54-Pacific Blue, HLA-DR-PECy7 como marcadores negativos para la población diana. Todos los anticuerpos se adquirieron de Biolegend (San Diego CA, USA). Se tomaron 1x10⁵ cel y se transfirieron a tubos de citometría (uno por cada marcador utilizado y uno correspondiente al blanco de cada fuente de CMM). Los tubos se centrifugaron a 400 x g por 7 minutos. El pellet se resuspendió en 100µl - 300µl de PBS 1X. Las células marcadas se incubaron a 4°C por 15 minutos en oscuridad y se analizaron en el citómetro de flujo, definiendo las poblaciones según su complejidad y tamaño e identificando el desplazamiento por la intensidad de fluorescencia media de los marcadores de superficie característicos de CMM. Los datos se analizaron con el software FlowJo 10.4.0 (Tree Star, Ashland, OR)

1.4 Obtención, aislamiento y caracterización de CPH

En este estudio se obtuvieron y aislaron CPH frescas de diferentes donantes en la ciudad de Bogotá, después de dar su consentimiento informado por escrito para su uso en investigación y aprobar los criterios primarios de selección de donantes.

1.4.1 Obtención de muestras de SCU

Las unidades de SCU se obtuvieron de embarazos únicos y a término en la Subred Integrada de Servicios de Salud Norte -Centro de Servicios Especializados Suba. Las donantes se seleccionaron según lo descrito en el apartado de obtención de muestras de SCU y GW para el aislamiento de CMM (sección 1.3.2) de este documento. Adicionalmente, se seleccionaron USCU con CNT mayores o iguales a 8×10^8 células. La recolección de SCU se realizó en bolsa Terumo o Pall con CPD (Figura 1). El tiempo transcurrido entre la colecta y el aislamiento de CPH no fue mayor a 24 horas.



Figura 1. USCU seleccionada para aislamiento de CPH frescas

1.4.2 Aislamiento de CPH

El protocolo de aislamiento inmunomagnético de células $CD34^+$, fue previamente estandarizado y validado por investigadores del GIBSCU, según criterios ya establecidos por el proveedor de las columnas inmunomagnéticas (MACS Miltenyi Biotec). La unidad de SCU en su totalidad se colectó en frascos Falcon estériles de 50 mL, que posteriormente se sometieron a dos ciclos de centrifugación a $800 \times g$ por 20 minutos sin freno, para eliminación del plasma y anticoagulante. Luego, las CMT se aislaron en un gradiente de densidad de Ficoll (Lymphoprep, AXIS-SHIELD PoCAs, Oslo, Norway),

mediante centrifugación a 500 x g por 30 minutos sin freno. El pellet de células se obtuvo luego de dos ciclos de centrifugación a 700 x g durante 10 minutos con freno y lavado con PBS 1X. Luego se realizó conteo de CMT mediante hematocitometría o cámara de Neubauer. El pellet se suspendió en solución de PBS 1X, BSA 0,5 % (Gibco, USA) y EDTA 2 mM, en una proporción de 100 μ l de solución por cada 1×10^8 CMT y posteriormente la suspensión celular se incubó en oscuridad por 15 minutos a 4°C con anticuerpos contra el receptor Fc (FcR Blocking Reagent; MACS Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) para bloquear la unión inespecífica a linfocitos, monocitos y macrófagos, y luego se incubó en oscuridad a 4°C con anticuerpos conjugados con perlas magnéticas contra CD34 (MACS Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) por 50 minutos a 4°C. Las CPH se purificaron por selección de células CD34⁺ usando columnas inmunomagnéticas; para ello la suspensión celular se separó en columnas MACS LS (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) colocadas en un magneto para la retención de las células CD34⁺ (Figura 2A). Después de lavar las columnas con 50 mL de solución de PBS/BSA/EDTA, se retiraron del magneto, eluyendo la fracción con células CD34⁺ (Figura 2B).

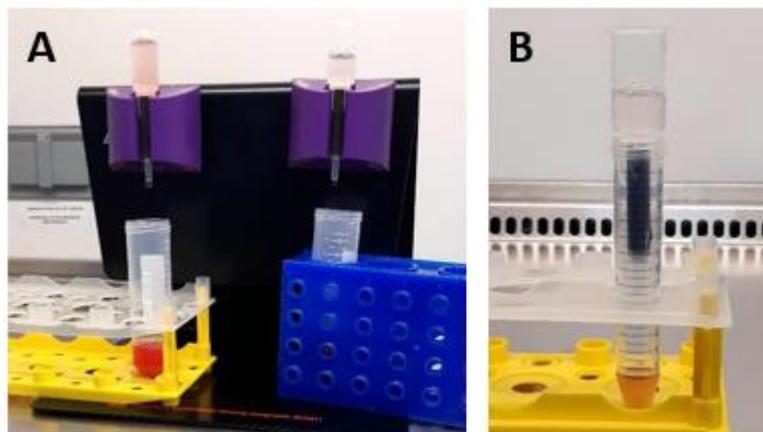


Figura 2. Método de selección inmunomagnética para aislamiento de CD34⁺ frescas de SCU, utilizando columnas MACS LS. (A) Lavado de las columnas y aislamiento inmunomagnético de la fracción CD34⁺. (B) Elución de la fracción CD34⁺, luego del lavado con solución PBS/BSA/EDTA.

La fracción eluida se centrifugó a 400 x g durante 7 minutos y se resuspendió en medio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI; Gibco, USA). Se realizó conteo de las CPH recién enriquecidas mediante hematocitometría o cámara de Neubauer.

1.4.3 Caracterización de CPH

La pureza de la fracción CD34⁺ que se eluyó tras la separación inmunomagnética, se determinó mediante citometría de flujo, según criterios definidos por el proveedor de las columnas inmunomagnéticas (MACS Miltenyi Biotec), utilizando el anticuerpo monoclonal contra CD34 - Proteína peridínina-clorofila-cianina5-5 (PerCP-Cy5-5; BD Biosciences, USA) para el marcaje. 1×10^5 cel/mL se dividieron en 2 tubos, uno correspondiente al blanco y el otro para el anticuerpo anti-CD34⁺ PerCP-Cy5-5. Los tubos se centrifugaron a 400 x g por 7 minutos. El pellet se resuspendió en 100 μ l - 300 μ l de PBS 1X. Las células marcadas se incubaron en oscuridad a 4°C por 15 minutos y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACS Canto II, definiendo las poblaciones CD34⁺ según sus propiedades de dispersión frontal y lateral (FSC/SSC), identificando el desplazamiento de CD34⁺ por la intensidad de fluorescencia de PerCP-Cy5-5. Los datos se analizaron con el software FlowJo 10.4.0.

1.5 Preparación de CMM para siembra en co-cultivo con CPH

Las CMM de MO, SCU y MO fueron descongeladas a 37°C en baño serológico hasta observar cambio de fase en los crioviales, luego se suspendieron en medio DMEM suplementado y se centrifugaron a 500 x g durante 7 minutos para eliminar posteriormente el DMSO. El pellet de células obtenido se suspendió en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, las células se sembraron en cajas de 75 cm², se expandieron de 4 a 7 días y se tripsinizaron hasta pase 2, 3 y 4. Seguidamente se realizó conteo mediante cámara de Neubauer con azul de tripán y se sembraron en cajas de 6 pozos 1×10^4 cel/mL en cada pozo, para hacer controles con adición de citoquinas de acción temprana y sin adición de citoquinas, y en cajas de 10 cm² se sembraron 3×10^4 cel/mL para evaluar el efecto de la irradiación. Se realizó mantenimiento de cultivos hasta obtener una confluencia mayor al 80%, haciendo cambio de medio cada 48 horas.

1.6 Siembra de CPH en co-cultivo con CMM

Para realizar la expansión celular de CPH sobre la monocapa alimentadora de CMM de MO, GW y SCU, las CPH recién enriquecidas se suspendieron en una solución de RPMI suplementado con SFB al 10% y con adición de 50 ng/mL de citoquinas de acción temprana (SCF, TPO y FLT3-L; Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Luego se cultivaron a una concentración de 1×10^5 cel/mL en cajas Petri de 10 cm^2 y 2×10^5 cel/mL en cajas de 6 pozos. Adicionalmente se realizó un cultivo de CPH sin CMM soporte, a una concentración de 2×10^5 cel/mL en cajas de 6 pozos, como control positivo de proliferación. Posteriormente se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% CO_2 , con adición de medio suplementado con citoquinas (50ng/mL) a los 4 días de co-cultivo para la posterior evaluación de funcionalidad de CPH a los 7 días de co-cultivo.

1.7 Evaluación de la capacidad de proliferación

Para obtener el punto inicial de proliferación, se realizó el conteo de las CPH recién enriquecidas antes de hacer el co-cultivo con CMM, mediante hematocitometría o cámara de Neubauer. Transcurridos nueve días del co-cultivo, el medio se recogió en un tubo Falcon estéril por cada tratamiento, se realizó lavado con PBS 1X y se centrifugó a $500 \times g$ por 7 minutos. El pellet se resuspendió en PBS 1X y se realizó el conteo de las CPH mediante hematocitometría o cámara de Neubauer. Con estos datos se calculó la capacidad de proliferación expresada como el número de veces que las CPH se duplicaron, respecto al punto inicial de proliferación. Se establecieron las siguientes condiciones de cultivo a evaluar: 1) CPH sin CMM (CPH exp), 2) CPH en co-cultivo con CMM de MO sin irradiar, 3) CPH en co-cultivo con CMM de MO irradiadas, 4) CPH en co-cultivo con CMM de GW sin irradiar, 5) CPH en co-cultivo con CMM de GW irradiadas, 6) CPH en co-cultivo con CMM de SCU sin irradiar y 7) CPH en co-cultivo con CMM de SCU irradiadas.

1.8 Evaluación de la capacidad de clonogenicidad

La clonogenicidad de las CPH en cada una de las condiciones definidas previamente y

adicionando un control de CPH recién aisladas de SCU sin expandir (frescas), se evaluó teniendo en cuenta su capacidad para formar colonias en un medio con factores de crecimiento y citoquinas que inducen la diferenciación hacia los diferentes linajes hematopoyéticos. Para ello, se tomaron 450 cel/mL de CPH recién enriquecidas y se suspendieron en 300 μ L de medio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM; Gibco, USA) suplementado con SFB 2%; posteriormente se transfirieron a una alícuota de 3 mL de medio de inducción de colonias a base de metilcelulosa con citoquinas recombinantes sin eritropoyetina (EPO) (Methocult H4035 Optimum Without EPO; Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Esta solución se mezcló con vórtex durante 1 minuto y se transfirió a placas de 6 pozos, garantizando humedad del cultivo con adición de agua estéril en 2 pozos. Las células permanecieron en cultivo por 14 días. El recuento se realizó mediante observación en microscopio invertido con ayuda de una cuadrícula de conteo para cajas de 6 pozos (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Se tuvo como criterio un mínimo de 50 células para definir una colonia (Velier et al., 2019). Para evaluar el efecto de los tratamientos con CMM de MO, SCU y GW en el modelo de expansión *ex vivo* de CPH, se realizó el mismo procedimiento con las CPH que se sembraron en co-cultivo en las diferentes condiciones, transcurridos 7 y 9 días, luego de evaluar su capacidad de proliferación.

1.9 Irradiación de CMM

Para evaluar el efecto de la irradiación de CMM en el modelo de expansión *ex vivo* de CPH, se cultivaron separadamente 3×10^4 cel/mL de CMM aisladas de MO, SCU y GW en cajas Petri estériles de 10 cm², hasta observar confluencia del 80%. Se realizó un ensayo por cada fuente de CMM, cada vez que se procesó unidad de SCU para aislamiento de CPH frescas, con el fin de detener la proliferación celular de CMM y mantener su confluencia durante el proceso de co-cultivo. Para ello, las CMM se sometieron a un único ciclo de irradiación ionizante de 25 Gray (Gy), durante 20-30 minutos, en un irradiador gamma del Banco de Sangre del IDCBIS, que utiliza una fuente de Cesio 137. El procedimiento se realizó 4 horas antes de la realización del co-cultivo.

1.10 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron usando GraphPad Prism 9.1.3 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para correlacionar los datos obtenidos en todos los experimentos se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Los promedios de dos tratamientos se compararon utilizando una prueba t de Student pareada. Para determinar la correlación entre las variables estudiadas se construyó un modelo lineal y se verificó su significancia estadística mediante un análisis de Pearson ($P \leq 0,05$).

2. Resultados y Discusión

2.1 Caracterización de CMM de MO, GW y SCU

Las CMM de MO, SCU y GW mostraron una morfología fibroblastoide y adherencia plástica (Figura 3A). En el análisis inmunofenotípico por citometría de flujo se observaron que las 3 poblaciones de células expresaron los marcadores CD73, CD90, CD105, CD44, HLA-ABC, mostraron una expresión casi nula ($<0,8\%$) para los marcadores hematopoyéticos y endoteliales CD45 y CD54 respectivamente, y expresaron de modo variable el marcador inmunológico HLA-DR (Figura 3B). Los marcadores negativos CD45 y CD54 aseguran la ausencia de otros linajes celulares que podrían encontrarse en los cultivos de CMM, tales como células hematopoyéticas, progenitores hematopoyéticos primitivos o células endoteliales (Krampera et al., 2013).

En conjunto, las CMM de MO, SCU y GW presentan un perfil inmunofenotípico característico de las CMM en las 3 fuentes estudiadas, según los criterios de la ISCT para definir las CMM humanas, donde establece que mínimo el 95% de la población debe expresar CD90, CD73 y CD105 y no debe expresar ($\leq 2\%$ positivas) CD45 y HLA-DR (Dominici et al., 2006; Krampera et al., 2013). Aunque en la población de CMM de SCU los marcadores CD90 y HLA-ABC no alcanzan el 95% de células positivas con un 89% para CD90 y 90% para HLA-ABC (Figura 3B), se considera que los resultados en conjunto con la expresión de los demás marcadores, indican características inmunofenotípicas de CMM. Si bien HLA-DR, es un marcador que debería estar ausente en CMM, se ha encontrado que en respuesta a ciertos estímulos también pueden expresar moléculas de superficie HLA-DR debido a sus

propiedades inmunomoduladoras; de manera que la ISCT indica que estas células aún pueden denominarse CMM (Dominici et al., 2006; Krampera et al., 2013). Existen estudios recientes que demuestran la expresión dinámica de HLA-DR en cultivos de CMM de MO grado clínico, donde soportan que su expresión no afecta el fenotipo ni la funcionalidad *in vitro* de estas células (Grau-Vorster et al., 2019).

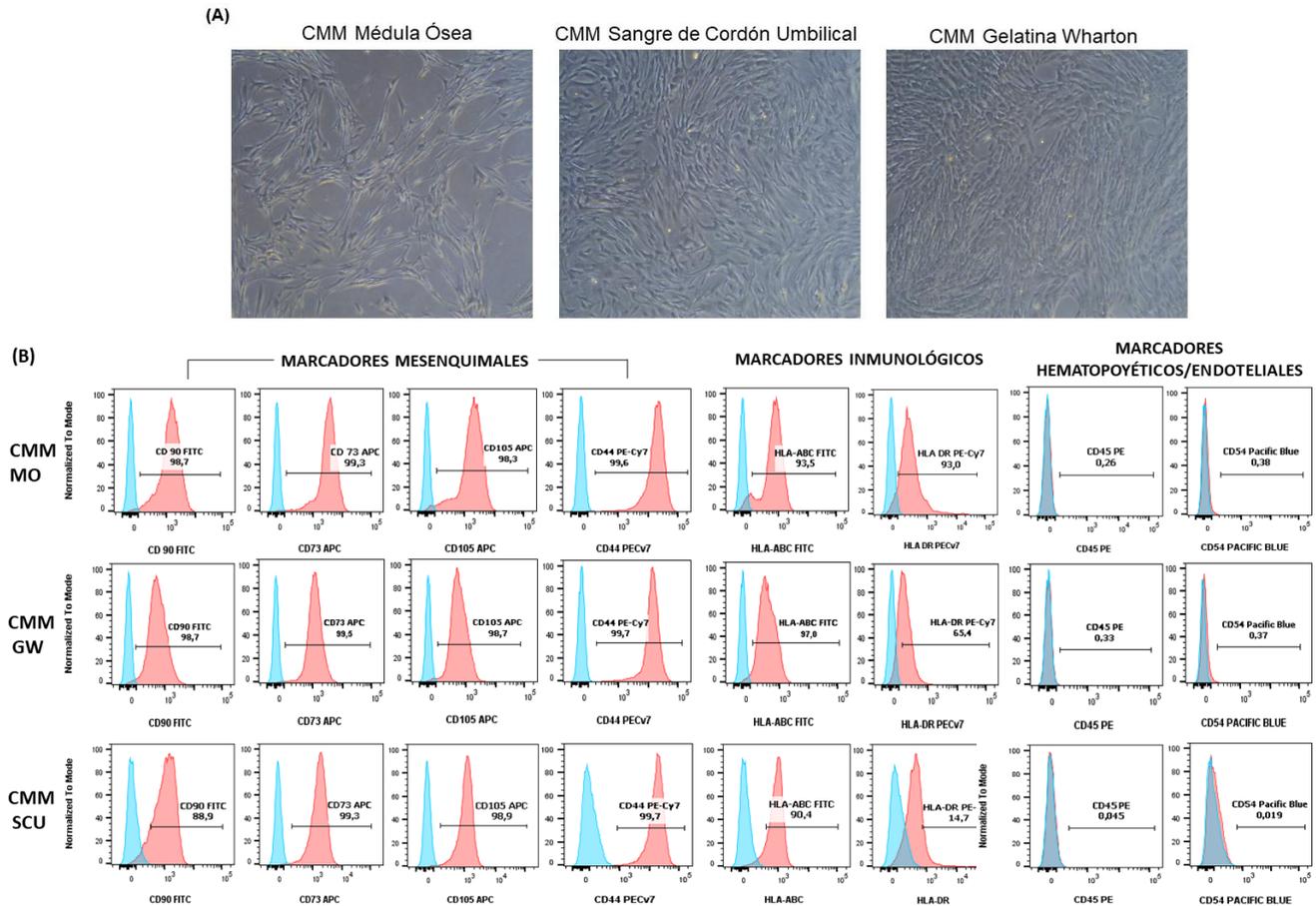


Figura 3. Caracterización morfológica e inmunofenotípica de CMM de MO, GW y SCU. (A) Observación al microscopio invertido (5X) de morfología fibroblastoide y adherencia plástica *in vitro* de CMM de las tres fuentes estudiadas. (B) Caracterización inmunofenotípica de la población expandida (pase 3) para las tres fuentes de CMM mediante citometría de flujo, utilizando 8 anticuerpos monoclonales para el marcaje positivo y negativo de la población en estudio. La figura es representativa de las líneas celulares generadas en este estudio para cada fuente de CMM.

2.2 Evaluación de la pureza de CPH de SCU después de su aislamiento inmunomagnético

Se realizaron tres análisis independientes de pureza por citometría de flujo de la fracción eluida tras la separación inmunomagnética, donde se obtuvo un $70,02 \pm 6,59\%$ de células $CD34^+$ (Figura 4). Otros estudios presentan purezas variables de $CD34^+$ (60% - 92%) (Belvedere et al., 1999; Kekarainen et al., 2006; Li et al., 2019; Melnik et al., 2001; Preciado et al., 2018). Se ha

reportado la presencia de precursores eritroides nucleados, tras el aislamiento por inmunomagnetismo (Kekarainen et al., 2006), de manera que esta población podría estar contenida en el 30% de células no marcadas con el anticuerpo antiCD34⁺ (Figura 4). La presencia de esta población en la fracción eluida puede atribuirse a la primera fase de aislamiento por gradiente de densidad de Ficoll donde se observó que los progenitores eritroides se retienen en la interfase de plasma y Ficoll, en lugar de sedimentarse como las células eritroides maduras. Por lo anterior, se establece que es conveniente repetir el proceso de aislamiento de CPH en una segunda columna MACS LS para obtener una fracción más purificada de CD34⁺. Otros estudios sugieren realizar un marcaje adicional entre las dos separaciones por columna, para aumentar la pureza a >90 % (Kekarainen et al., 2006).

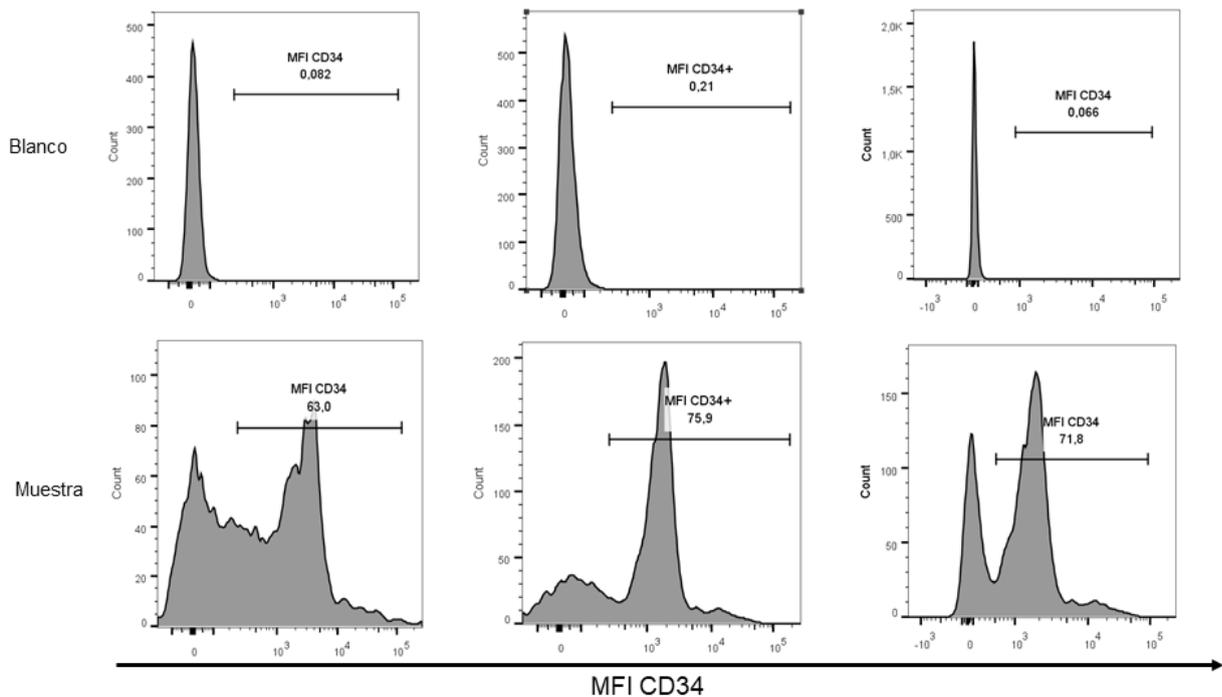


Figura 4. Evaluación de pureza de la fracción de células CD34⁺ mediante citometría de flujo. La pureza de las células CD34⁺ se realizó después de la separación inmunomagnética a través de una sola columna. La población CD34⁺ se definió utilizando el anticuerpo monoclonal antiCD34-PerCP-Cy5-5 e identificando el desplazamiento de CD34⁺ por la intensidad de fluorescencia del marcador. El porcentaje que indica la pureza de la fracción de células CD34⁺ se muestra en el gráfico como MFI de cada muestra. MFI: Fluorescencia media. n=3.

2.3 Evaluación de la concentración de CMM a sembrar para el co-cultivo

Para determinar la concentración óptima de CMM que soportaría el cultivo de CPH de SCU en el modelo de expansión *ex vivo*, se sembraron tres concentraciones diferentes de CMM de MO,

GW y SCU en cajas de 6 pozos y se realizó un seguimiento por microscopio invertido de la expansión y confluencia del cultivo durante 4 días (Figura 5). Este experimento se realizó con CMM descongeladas, de 3 donantes diferentes, en pase 2 y 3.

Para la concentración de 5×10^3 cel/mL se observó poca confluencia (10-20%) de CMM en los 3 ensayos con las 3 fuentes de CMM (Figura 5A); para la concentración de 1×10^4 cel/mL, se observó una confluencia del 40-50% en los 3 ensayos con las 3 fuentes de CMM (Figura 5B) y para la concentración de $1,5 \times 10^4$ cel/mL se observó una confluencia variable entre las 3 fuentes de CMM (Figura 5C); por tanto, se determinó la concentración de 1×10^4 cel/mL como óptima para la siembra en co-cultivo en caja de 6 pozos.

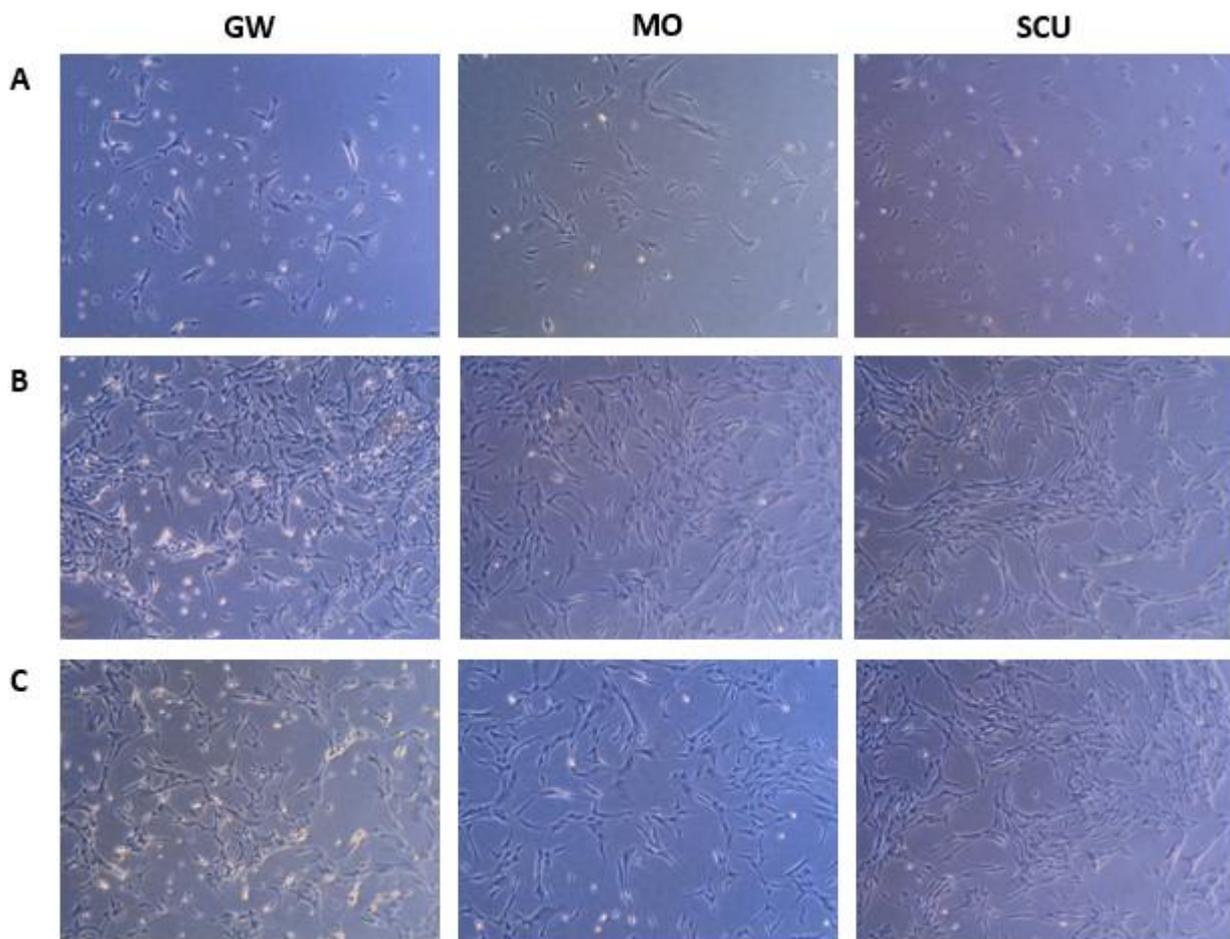


Figura 5. Observación al microscopio invertido (5X) de 3 concentraciones sembradas de CMM de GW, MO y SCU para estandarizar en co-cultivo con CPH de SCU. Concentración de CMM (A) 5×10^3 cel/mL. (B) 1×10^4 cel/mL. (C) $1,5 \times 10^4$ cel/mL. Las CMM fueron descongeladas y sembradas el mismo día, en pase 2 y 3, n=9.

Para la siembra de CMM en cajas Petri de 10 cm² se siguió el mismo procedimiento de estandarización y se determinó la concentración de 3×10^4 cel/mL como óptima para la siembra en co-cultivo, n=9.

2.4 Evaluación de la concentración de citoquinas de acción temprana

Para establecer la concentración óptima de citoquinas de acción temprana (SCF, TPO y FLT3-L) adicionadas en el co-cultivo de CPH y CMM, se partió de una concentración evaluada en estudios anteriores (Lima de et al., 2012; Robinson et al., 2006; Ueda et al., 2000). Esta concentración fue 100 ng/mL para cada citoquina, partiendo de moléculas recombinantes puras. Sin embargo, esta concentración de citoquinas produjo tasas de proliferación muy altas (hasta 72 duplicaciones tras 9 días de co-cultivo), consumiendo los nutrientes del medio de forma acelerada, lo cual era observable en el co-cultivo debido al cambio de color del medio (rojo a amarillo). Por ello se redujo la concentración adicionada a 50 ng/mL de cada citoquina, ya que esta concentración había sido evaluada en estudios similares mostrando resultados favorables para la expansión de CPH (Lima de et al., 2008). Los resultados demostraron que 50 ng/mL es una concentración que induce la expansión de las CPH en co-cultivo para todos los tratamientos estudiados en el tiempo estipulado.

2.5 Evaluación del tiempo de cultivo de CMM y co-cultivo con CPH

Para determinar un cronograma de ensayos de funcionalidad en el modelo de expansión *ex vivo* de CPH frescas, fue necesario estandarizar el tiempo de expansión de las CMM posterior a los procesos de descongelación, tripsinización y siembra de CMM para co-cultivo con CPH, hasta una confluencia mayor o igual al 80%. En la Tabla 1, se observa que las CMM de las tres fuentes estudiadas alcanzan una confluencia del 80% pos-descongelación en 5 días, después de la tripsinización (pase 2 a 4) en 8 días y luego de la siembra de CMM para co-cultivo con CPH en 7 días.

Tabla 1. *Tiempo de expansión in vitro de CMM de MO, GW y SCU*

	Descongelación	Tripsinización	Siembra para co-cultivo
Días para alcanzar confluencia del 80%	5±0,84	8±0,72	7±0,58

Los resultados se expresan como media ± SEM. n=5

Respecto al del tiempo en co-cultivo, se observó que a los 3 días hubo poca proliferación (menos de 1 duplicación), a los 6 días las CPH se duplicaron 1 o 2 veces y a los 9 días se obtuvieron los mejores resultados. No obstante, en 3 de los 6 experimentos realizados, fue necesario hacer el conteo a los 7 y no a los 9 días de co-cultivo, ya que se observó al microscopio gran proliferación de CPH, hasta el punto de no permitir la observación de la monocapa alimentadora de CMM, que en algunos casos dio lugar a la pérdida de adherencia de las CMM y ello podría interferir en la evaluación posterior de la funcionalidad de las CPH a través de los ensayos de proliferación y clonogenicidad (datos no mostrados). Por lo anterior, se sugiere realizar el conteo de CPH a los 7 días de co-cultivo con CMM.

2.6 Efecto de las citoquinas de acción temprana en el co-cultivo de CPH con CMM

Inicialmente se evaluó el efecto de las citoquinas de acción temprana en la expansión ex vivo de CPH en co-cultivo con CMM de MO (control positivo de proliferación) y SCU, utilizando una concentración de 50 ng/mL de cada citoquina. Los resultados obtenidos reafirman su efecto sinérgico en la proliferación de CPH en el nicho medular (Figura 6), que previamente ha sido expuesto en diferentes estudios (Breems et al., 1998; Orticelli et al., 2021; Ueda et al., 2000) donde además se ha demostrado que la eliminación de SCF produce agotamiento de CPH (Ding et al., 2012), lo cual es consistente con este estudio (Figura 6). Por otro lado, se observó un efecto aún más favorable en el co-cultivo con CMM de SCU, representado en un aumento estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) de hasta 13 veces en la población de CPH respecto al control de la misma fuente de CMM sin

citoquinas. En general, se ha estudiado que las células endoteliales presentes en el nicho medular sintetizan y secretan SCF y FLT3-L y éstos a su vez activan sus receptores tirosina quinasa específicos en las CPH (c-Kit y FLT3 respectivamente), transduciendo señales importantes para el mantenimiento y la regeneración (autorrenovación) de las CPH (Matthews et al., 1991; Williams et al., 1992). Además, el receptor c-MPL de CPH activado por TPO transduce señales que estimulan la expansión de las células hematopoyéticas primitivas (Hawley et al., 2006; Ueda et al., 2000).

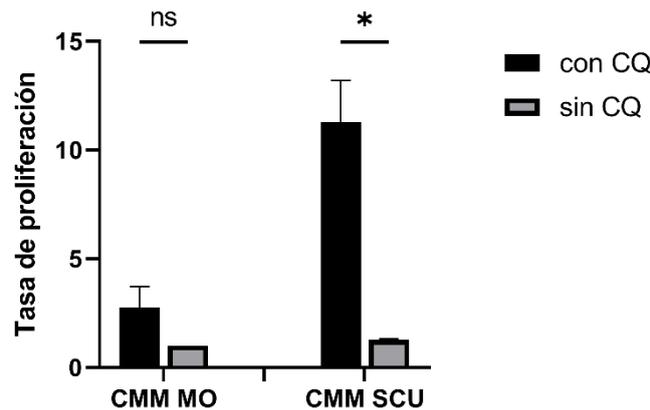


Figura 6. Evaluación del efecto de las citoquinas de acción temprana (100 ng/mL) en un modelo de expansión *ex vivo* de CPH frescas, en co-cultivo con CMM de MO (control positivo de proliferación) y SCU. Los valores se representan como el número de veces que las CPH se duplicaron \pm SEM. El conteo se realizó tras 9 días de incubación a 37°C y 5% CO₂. Los resultados se analizaron con Two-way ANOVA Grouped para dos conjuntos de datos (n=2). ns: diferencia no significativa estadísticamente. *Diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$).

2.7 Capacidad de proliferación

Se ha documentado que la expansión *ex vivo* de CPH se ve notablemente mejorada por el co-cultivo con CMM (Lima de et al., 2012; Orticelli et al., 2021; Robinson et al., 2006). En este estudio se observa que los ensayos de proliferación confirman la capacidad de expansión *ex vivo* de CPH en co-cultivo con CMM (Figura 7A), con duplicaciones promedio entre 5 y 16 veces tras 7 días de co-cultivo con CMM de las 3 fuentes estudiadas (Figura 7B). Se observó que los co-cultivos con CMM de SCU y GW presentan tasas de proliferación similares respecto al control positivo de proliferación (CMM de MO) tanto para CMM irradiadas como para CMM sin irradiar. Además, se observa que la irradiación de CMM de MO y SCU antes de la siembra en co-cultivo, indujo un incremento en la tasa de proliferación de CPH (5 veces \pm 1,99) (Figura 7B) respecto a los co-cultivos de las mismas fuentes sin irradiación. El cultivo con adición de citoquinas sin monocapa de CMM, superó las tasas de

proliferación en la mayoría de condiciones estudiadas. Sin embargo, ya está bien documentado que ocurre una expansión de CPH maduras en lugar de inmaduras, imposibilitando su repoblación temprana en la médula (Emiliju et al., 2019; Hofmeister et al., 2007; Robinson et al., 2006).

Por lo anterior, se sugiere que la expansión de CPH *ex vivo* está dada tanto por la adición de citoquinas de acción temprana, como por la presencia de CMM que secretan factores solubles al medio, mejorando la supervivencia y la proliferación de las CPH, pero manteniendo su estado indiferenciado. Otros estudios que respaldan el papel regulador de las CMM en la diferenciación de CPH, han explicado este efecto a través de la caracterización de medios condicionados de CMM, donde se identifican las siguientes citoquinas secretadas: factor de células madre 1 (SDF-1), factor estimulante de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 11 (IL-11) (Cordeiro Gomes et al., 2016; Van Overstraeten-Schlogel et al., 2006).

La logística entre el tiempo necesario para generar CMM confluentes al 80% y la colecta de USCU para aislamiento de CPH frescas limitaron la realización de un mayor número de experimentos para los ensayos de funcionalidad.

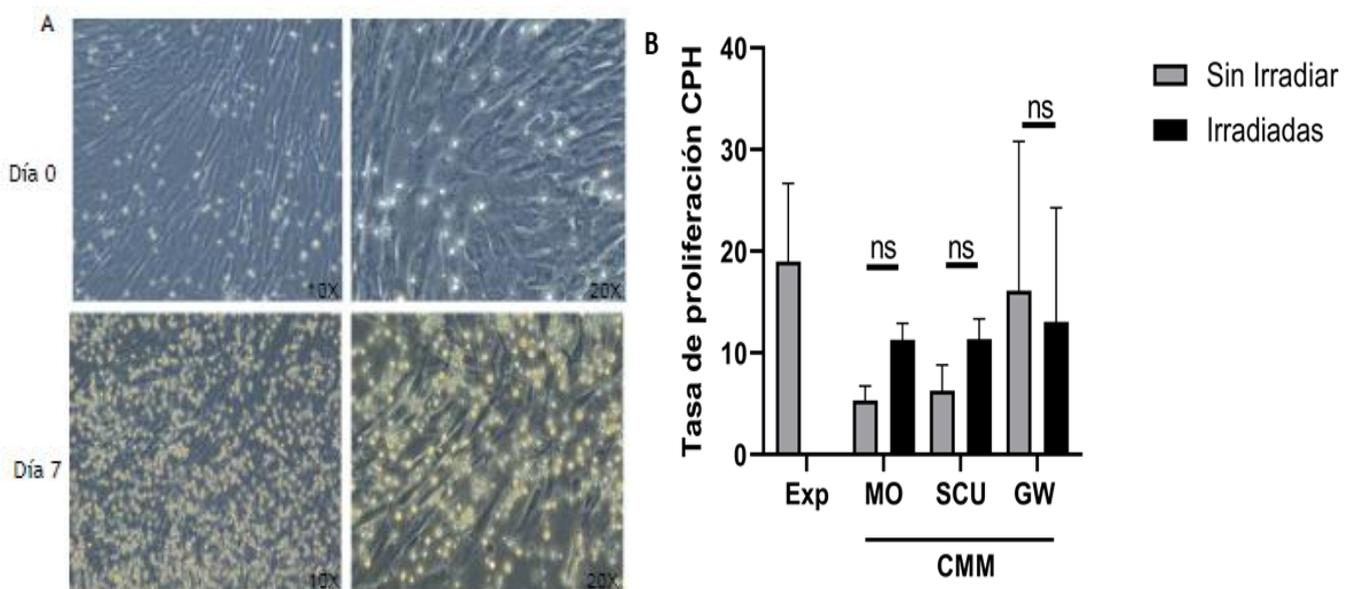


Figura 7. Evaluación de la capacidad de proliferación de CPH en co-cultivo con CMM de MO, GW y SCU. (A) Observación al microscopio invertido en 10X y 20X del co-cultivo de CPH con CMM de GW, en el día de siembra de CPH frescas sobre la monocapa alimentadora (día 0) y luego de 7 días de incubación a 37°C y 5% CO₂ (día 7). Se observa la monocapa alimentadora de CMM de GW con morfología fibroblastoide y adherencia plástica y la expansión de CPH (células redondeadas de color amarillo brillante). (B) Tasa de proliferación de CPH sometidas a diferentes condiciones de cultivo e incubadas durante 7 días a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM con adición de un cóctel de citoquinas de acción temprana.

temprana SCF, TPO y FLT3-L (50 ng/ mL). Los datos se expresan como la media \pm SEM de 3 experimentos independientes, con diferentes donantes. Exp: CPH expandidas sin monocapa alimentadora de CMM. ns: diferencia no significativa estadísticamente.

2.8 Clonogenicidad

La observación al microscopio (Figura 8A) y el posterior recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) (Figura 8B), confirman la capacidad clonogénica de CPH en el modelo de expansión *ex vivo* en co-cultivo con CMM. Este hallazgo sugiere una diferenciación hacia diferentes linajes de células hematopoyéticas (Gounari et al., 2019), que se ve representado en un aumento de células con potencial de repoblación temprana en el microambiente (Lima de et al., 2012), especialmente después de estar en co-cultivo durante 14 días con CMM de SCU. Además, el pre-acondicionamiento con irradiación de las CMM de MO y SCU, parece mantener un impacto positivo en el potencial clonogénico de las CPH. En contraste al ensayo de proliferación, se observa que el cultivo de CPH con adición de citoquinas sin la monocapa de CMM, indujo una reducción de UFC respecto al control de CPH sin expansión (frescos) ($57 \pm 2,67$ frente a $20 \pm 6,37$) y respecto al control positivo CMM-MO ($22,5 \pm 4,50$ frente a $20 \pm 6,37$) (Figura 8B). Existen estudios que también demuestran un aumento en el número de colonias de CPH en co-cultivo con CMM respecto a CPH cultivadas sin CMM soporte (Breems et al., 1998; Orticelli et al., 2021), lo que confirma la diferenciación prematura de CPH sin la monocapa de CMM que impide una rápida reconstitución hematopoyética (Emiloju et al., 2019; Hofmeister et al., 2007; Robinson et al., 2006). Por lo anterior, se sugiere que tanto el co-cultivo de CPH con CMM de MO como los co-cultivos con CMM de SCU y GW mantienen el potencial clonogénico de las CPH expandidas *ex vivo*.

Aunque en este estudio no se analizó la clonogenicidad según el tipo de colonias formadas, la observación al microscopio permitió identificar UFC de granulocitos, eritrocitos, monocitos-macrófagos y megacariocitos (UFC-GEMM) que se muestran como las colonias más grandes y compactas, además de presentar más de un núcleo oscuro de formación. Por otro lado, se observaron UFC de granulocitos-macrófagos (UFC-GM) que presentan un núcleo y células

individuales de mayor tamaño dispersas en la periferia del núcleo (Figura 8A) (Velier et al., 2019).

La variabilidad en los resultados de los dos ensayos de funcionalidad de CPH expandidas *ex vivo* (proliferación y clonogenicidad), puede explicarse por varias razones: 1) el donante de CMM, lo cual puede comprobarse en otros estudios por la amplitud del rango de sus resultados (Lima de et al., 2012), 2) la diferencia en el pase celular (Krampera et al., 2013) y 3) la fuente de CMM, la ISCT establece que no puede suponerse que todas las CMM derivadas de diferentes tejidos muestren propiedades inmunomoduladoras equivalentes (Krampera et al., 2013).

Se hace necesario un mayor número de experimentos de expansión de CPH *ex vivo* en co-cultivo, para analizar características individuales de cada donante y así establecer correlaciones entre las variables estudiadas.

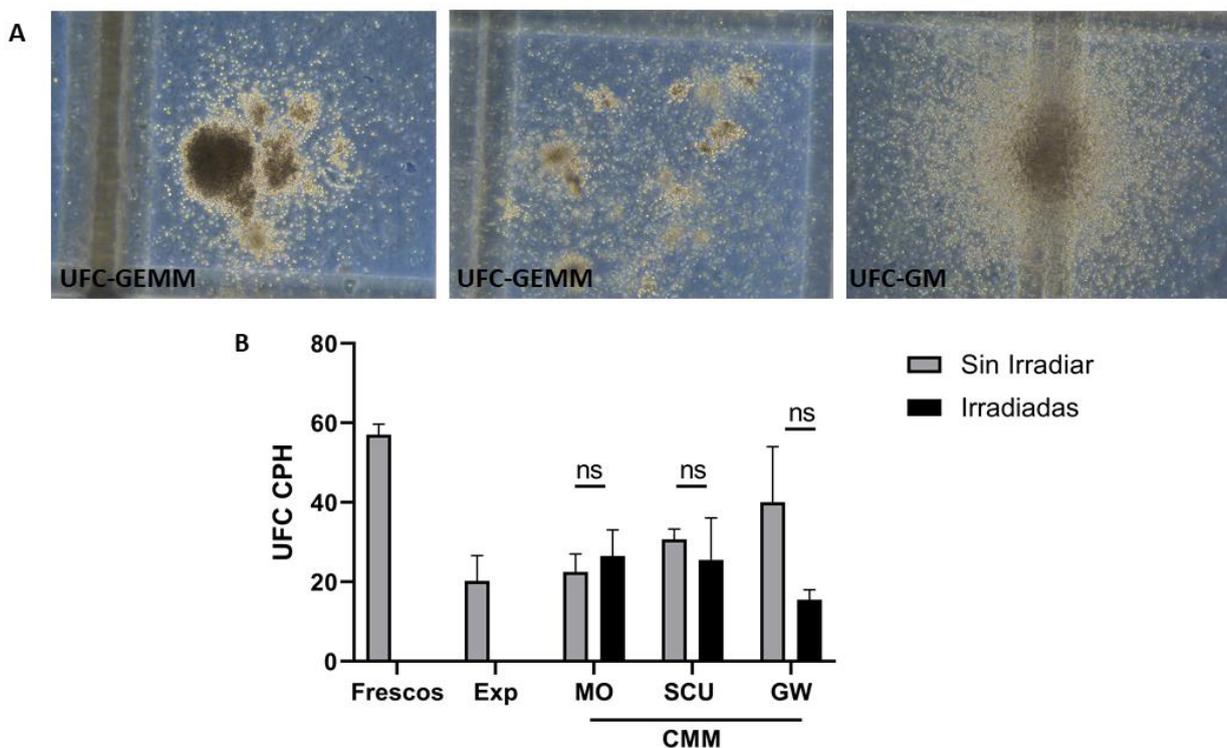


Figura 8. Evaluación del potencial clonogénico de CPH sometidas a co-cultivo con CMM de MO, GW y SCU. (A) Observación al microscopio invertido en 5X de colonias de CPH previamente expandidas en co-cultivo con CMM de SCU, formadas en cultivo de metilcelulosa (Methocult), tras 14 días de incubación a 37°C y 5% CO₂. GEMM: granulocitos, eritrocitos, monocitos-macrófagos, megacariocitos. GM: granulocitos, macrófagos. (B) Recuento de UFC de CPH sometidas a diferentes condiciones de cultivo e incubadas durante 14 días a 37°C y 5% CO₂ en Methocult. Los datos se expresan como la media de 3 experimentos independientes ± SEM con diferentes donantes de CMM y CPH. ns: diferencia no significativa estadísticamente.

2.9 Efecto del pre-acondicionamiento con irradiación gamma de cultivos de CMM

En general, los cultivos de CMM que fueron previamente acondicionados con irradiación gamma, no muestran diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) en cuanto al mejoramiento de la capacidad de proliferación y clonogenicidad, respecto a los cultivos de CMM sin irradiación en las 3 fuentes estudiadas (figura 7B, 8B). Por otro lado, no se observan impactos negativos en la funcionalidad de CPH expandidas *ex vivo*, por lo cual se sugiere realizar este pre-acondicionamiento con el fin de detener la proliferación celular de CMM y mantener su confluencia durante el proceso de co-cultivo, ya que un sobre-crecimiento de esta población, podría tener como consecuencia la pérdida de adherencia de las células (tal como se observó en el estudio), lo cual representa una interferencia en el co-cultivo con CPH para la determinación de la capacidad proliferativa y clonogénica.

En resumen, este estudio demuestra que un sólo ciclo de 25 Gy es suficiente para detener la proliferación de CMM, mejorando las condiciones experimentales en el proceso de expansión *ex vivo* de CPH.

3. Conclusiones

Por medio de este trabajo fue posible estandarizar las condiciones de co-cultivo para garantizar la expansión *ex vivo* de CPH aisladas de SCU, obteniendo resultados favorables de proliferación y clonogenicidad, estas condiciones incluyen: concentración de CMM a sembrar para la posterior siembra de CPH de SCU, tiempo de co-cultivo, concentración de citoquinas de acción temprana a adicionar en el co-cultivo e irradiación gamma para CMM, como técnica de pre-acondicionamiento de la monocapa alimentadora para las CPH.

Por otro lado, se establece que este protocolo estandarizado de co-cultivo de CPH con CMM de MO, GW y SCU, suplementado con citoquinas de acción temprana, permite la expansión *ex vivo* de CPH frescas de SCU, entre 5 y 16 veces, con un potencial clonogénico expresado entre 20 y 40 UFC, demostrando que las CMM de GW y SCU pueden ser fuentes alternativas de soporte hematopoyético

respecto a CMM de MO. Así mismo, se establece que el pre-acondicionamiento de las CMM con una sola dosis de 25 Gy de irradiación gamma detiene la proliferación de las CMM sin afectar de manera significativa su capacidad de soporte en la expansión de las CPH de SCU.

Por lo anterior, se pone en evidencia que el uso de cordón umbilical (que generalmente es un producto de desecho, una vez ocurre el alumbramiento), a través de la SCU y la GW es una fuente adecuada de CMM, que sirven como soporte para la expansión *ex vivo* de CPH frescas de SCU, garantizando el mantenimiento de sus propiedades *stem* y brindando así fuentes alternativas de CMM, aparte de MO que ya ha sido bien estudiada, utilizando técnicas de obtención y aislamiento menos invasivas y fácilmente disponibles en el tiempo para pacientes que requieran trasplante.

4. Perspectivas

En estudios posteriores se caracterizarán medios condicionados del co-cultivo, con el fin de determinar los factores solubles responsables de la capacidad de soporte de las CMM. Se espera que este protocolo estandarizado contribuya al desarrollo de la expansión *ex vivo* a mayor escala, realizando un mayor número de ensayos de funcionalidad con condiciones estandarizadas, que en un futuro permita su ejecución en ámbito clínico, posibilitando su aplicación en adultos. Cabe resaltar, que son necesarios ensayos de funcionalidad tales como migración, clonogenicidad y evaluación de la expresión de marcadores de progenitores diferenciados mediante citometría de flujo, para confirmar que con esta técnica de expansión *ex vivo* de CPH en co-cultivo con CMM irradiadas, se conservan las propiedades *stem* de las CPH.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por su bondad, amor y dirección en cada momento de mi vida. Gracias infinitas a mis padres, quien con su amor y apoyo incondicional, me acompañan en cada paso que doy. A mi hijo Nicolas por convertirme en mamá, por ceder ante los momentos que mamá no podía

estar y por ser la motivación para este proyecto que se traduce en un paso de esperanza para muchas mamás que al igual que yo queremos ver crecer a sus hijos sanos y fuertes.

En segundo lugar, agradezco a mi directora Ximena Bonilla del IDCBIS por su inmensa bondad al permitirme hacer parte de este proyecto, por su guía y continuo acompañamiento en el ámbito personal y profesional durante todo este proceso formativo. A Tatys por su ayuda y compañerismo en el IDCBIS y a todo el personal del GIBSCU que trabajó para que ese proyecto fuera posible. Agradezco al profesor Nelson Arenas de la UAN, por creer en mis capacidades aún cuando yo puse barreras que no existían para ello. A la profesora Alejandra Baena de la UAN por su apoyo transversal para culminar este proyecto. A mis compañeros de pregrado que me brindaron su apoyo.

Referencias

- Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 37(7), 855–864. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Belvedere, O., Feruglio, C., Malangone, W., Bonora, M. L., Donini, A., Dorotea, L., Tonutti, E., Rinaldi, C., Pittino, M., Baccarani, M., Del Frate, G., Biffoni, F., Sala, P., Hilbert, D. M., & Deggrasi, A. (1999). Phenotypic Characterization of Immunomagnetically Purified Umbilical Cord Blood CD34+ Cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 25(3), 141–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/bcmd.1999.0239>
- Breems, D. A., Blokland, E. A. W., Siebel, K. E., Mayen, A. E. M., Engels, L. J. A., & Ploemacher, R. E. (1998). Stroma-Contact Prevents Loss of Hematopoietic Stem Cell Quality During Ex Vivo Expansion of CD34+ Mobilized Peripheral Blood Stem Cells. *Blood*, 91(1), 111–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V91.1.111>
- Boulais, P. E., & Frenette, P. S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125(17), 2621–2629. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-570192>

- Cancelas, J. A., Querol, S., Martín-Henao, G., Canals, C., Azqueta, C., Petriz, J., Inglés-Esteve, J., Amill, B., & Garcia, J. (1996). Isolation of hematopoietic progenitors. An approach to two different immunomagnetic methods at the lab scale. *Pure and Applied Chemistry*, 68(10), 1897–1901. <https://doi.org/10.1351/pac199668101897>
- Chan, S. L., Choi, M., Wnendt, S., Kraus, M., Teng, E., Leong, H. F., & Merchav, S. (2007). Enhanced In Vivo Homing of Uncultured and Selectively Amplified Cord Blood CD34+ Cells by Cotransplantation with Cord Blood-Derived Unrestricted Somatic Stem Cells. *Stem Cells*, 25(2), 529–536. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0639>
- Cordeiro Gomes, A., Hara, T., Lim, V. Y., Herndler-Brandstetter, D., Nevius, E., Sugiyama, T., Taniichi, S., Schlenner, S., Richie, E., Rodewald, H.-R., Flavell, R. A., Nagasawa, T., Ikuta, K., & Pereira, J. P. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niches Produce Lineage-Instructive Signals to Control Multipotent Progenitor Differentiation. *Immunity*, 45(6), 1219–1231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.11.004>
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382), 457–462. <https://doi.org/10.1038/nature10783>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Emiloju, O. E., Potdar, R., Jorge, V., Gupta, S., & Varadi, G. (2019). Clinical Advancement and Challenges of ex vivo Expansion of Human Cord Blood Cells. *Clinical Hematology International*, 2(1), 18–26. <https://doi.org/10.2991/chi.d.191121.001>

- Frausin, S., Viventi, S., Verga Falzacappa, L., Quattromani, M. J., Leanza, G., Tommasini, A., & Valencic, E. (2015). Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Acta Histochemica*, 117(4), 329–338. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.005>
- Gluckman, E. (2000). Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 28(11), 1197–1205. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(00\)00540-3](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00540-3)
- Gounari, E., Daniilidis, A., Tsagias, N., Michopoulou, A., Kouzi, K., & Koliakos, G. (2019). Isolation of a novel embryonic stem cell cord blood–derived population with in vitro hematopoietic capacity in the presence of Wharton's jelly–derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 21(2), 246–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.11.006>
- Grau-Vorster, M., Laitinen, A., Nystedt, J., & Vives, J. (2019). HLA-DR expression in clinical-grade bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells: a two-site study. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1279-9>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hawley, R. G., Ramezani, A., & Hawley, T. S. (2006). Hematopoietic stem cells. *Methods in Enzymology*, 419, 149–179. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19007-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19007-2)
- Hofmeister, C. C., Zhang, J., Knight, K. L., Le, P., & Stiff, P. J. (2007). Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation: growing knowledge from the hematopoietic niche. *Bone Marrow Transplantation*, 39(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705538>

- Katz, A. J., Tholpady, A., Tholpady, S. S., Shang, H., & Ogle, R. C. (2005). Cell Surface and Transcriptional Characterization of Human Adipose-Derived Adherent Stromal (hADAS) Cells. *Stem Cells*, 23(3), 412–423. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0021>
- Kekarainen, T., Mannelin, S., Laine, J., & Jaatinen, T. (2006). Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biology*, 7(1), 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-30>
- Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., & Sensebe, L. (2013). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells—The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*, 15(9), 1054–1061. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.010>
- Laughlin, M. J., Eapen, M., Rubinstein, P., Wagner, J. E., Zhang, M.-J., Champlin, R. E., Stevens, C., Barker, J. N., Gale, R. P., Lazarus, H. M., Marks, D. I., van Rood, J. J., Scaradavou, A., & Horowitz, M. M. (2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 351(22), 2265–2275. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041276>
- Li, D., Chiu, G., Lipe, B., Hopkins, R. A., Lillis, J., Ashton, J. M., Paul, S., & Aljittawi, O. S. (2019). Decellularized Wharton jelly matrix: a biomimetic scaffold for ex vivo hematopoietic stem cell culture. *Blood Advances*, 3(7), 1011–1026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018019315>
- Lima de, M., McMannis, J., Gee, A., Komanduri, K., Couriel, D., Andersson, B. S., Hosing, C., Khouri, I., Jones, R., Champlin, R., Karandish, S., Sadeghi, T., Peled, T., Grynspan, F., Daniely, Y., Nagler, A., & Shpall, E. J. (2008). Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplantation*, 41(9), 771–778. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705979>

- Lima de, M., McNiece, I., Robinson, S. N., Munsell, M., Eapen, M., Horowitz, M., Alousi, A., Saliba, R., McMannis, J. D., Kaur, I., Kebriaei, P., Parmar, S., Popat, U., Hosing, C., Champlin, R., Bollard, C., Molldrem, J. J., Jones, R. B., Nieto, Y., ... Shpall, E. J. (2012). Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *The New England Journal of Medicine*, 367(24), 2305–2315. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal207285>
- Lund, T. C., Boitano, A. E., Delaney, C. S., Shpall, E. J., & Wagner, J. E. (2015). Advances in umbilical cord blood manipulation—from niche to bedside. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 12(3), 163–174. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.215>
- Lo Iacono, M., Baiamonte, E., Di Stefano, R., Spina, B., Sacco, M., Di Maggio, R., Vitrano, A., Maggio, A., & Acuto, S. (2015). Wharton's Jelly- MSC As Effective Tool for Expansion of Purified Human Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem Cells. *Blood*, 126(23), 4770. <https://doi.org/https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.4770.4770>
- MacMillan, M. L., Robin, M., Harris, A. C., DeFor, T. E., Martin, P. J., Alousi, A., Ho, V. T., Bolaños-Meade, J., Ferrara, J. L. M., Jones, R., Arora, M., Blazar, B. R., Holtan, S. G., Jacobsohn, D., Pasquini, M., Socie, G., Antin, J. H., Levine, J. E., & Weisdorf, D. J. (2015). A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 21(4), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.01.001>
- Matthews, W., Jordan, C. T., Wiegand, G. W., Pardoll, D., & Lemischka, I. R. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*, 65(7), 1143–1152. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90010-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90010-V)
- Melnik, K., Nakamura, M., Comella, K., Lasky, L. C., Zborowski, M., & Chalmers, J. J. (2001). Evaluation of eluents from separations of CD34+ cells from human cord blood using a commercial,

immunomagnetic cell separation system. *Biotechnology progress*, 17(5), 907-916.

<https://doi.org/10.1021/bp010079r>

Mendelson, A., & Frenette, P. S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature Medicine*, 20(8), 833–846. <https://doi.org/10.1038/nm.3647>

Metheny, L., Caimi, P., Lima de, M. (2013). Cord Blood Transplantation: Can We Make it Better? *Frontiers in Oncology*, 3, 238. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00238>

Nold, P., Hackstein, H., Riedlinger, T., Kasper, C., Neumann, A., Mernberger, M., Fölsch, C., Schmitt, J., Fuchs-Winkelmann, S., Barckhausen, C., Killer, M., Neubauer, A., & Brendel, C. (2015). Immunosuppressive capabilities of mesenchymal stromal cells are maintained under hypoxic growth conditions and after gamma irradiation. *Cytotherapy*, 17(2), 152–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.10.004>

Orticelli, V., Papait, A., Vertua, E., Bonassi Signoroni, P., Romele, P., Di Pietro, L., Magatti, M., Teofili, L., Silini, A. R., & Parolini, O. (2021). Human amniotic mesenchymal stromal cells support the ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 10(11), 1516–1529. <https://doi.org/10.1002/sctm.21-0130>

Pimentel-Parra, G. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2017). Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(1), 28–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rprh.2017.10.013>

Pinho, S., & Frenette, P. S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(5), 303–320. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0103-9>

Preciado, S., Muntión, S., Rico, A., Pérez-Romasanta, L. A., Ramos, T. L., Ortega, R., Borrajo, J., Corchete, L. A., Rodríguez, C., Díez-Campelo, M., Sánchez-Abarca, L. I., Del Cañizo, M.-C., &

Sánchez-Guijo, F. (2018). Mesenchymal Stromal Cell Irradiation Interferes with the Adipogenic/Osteogenic Differentiation Balance and Improves Their Hematopoietic-Supporting Ability. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 24(3), 443–451.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.007>

Robinson, S. N., Ng, J., Niu, T., Yang, H., McMannis, J. D., Karandish, S., Kaur, I., Fu, P., Del Angel, M., Messinger, R., Flagge, F., Lima de, M., Decker, W., Xing, D., Champlin, R., & Shpall, E. J. (2006). Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplantation*, 37(4), 359–366.

<https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705258>

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1–2), 7–25.

Ueda, T., Tsuji, K., Yoshino, H., Ebihara, Y., Yagasaki, H., Hisakawa, H., Mitsui, T., Manabe, A., Tanaka, R., Kobayashi, K., Ito, M., Yasukawa, K., & Nakahata, T. (2000). Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(7), 1013–1021.

<https://doi.org/10.1172/JCI8583>

Van Overstraeten-Schlogel, N., Beguin, Y., & Gothot, A. (2006). Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *European Journal of Haematology*, 76(6), 488–493. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2006.00633.x>

Velier, M., Chateau, A.-L., Malenfant, C., Ouffai, S., Calmels, B., Chabannon, C., & Lemarié, C. (2019). Validation of a semi automatic device to standardize quantification of Colony-Forming Unit (CFU) on hematopoietic stem cell products. *Cytotherapy*, 21(8), 820–823.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.06.005>

Williams, D. E., de Vries, P., Namen, A. E., Widmer, M. B., & Lyman, S. D. (1992). The Steel factor. *Developmental Biology*, 151(2), 368–376. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90176-](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90176-)

[H](#)

Zimran, E., Papa, L., & Hoffman, R. (2021). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: Finally transitioning from the lab to the clinic. *Blood Reviews*, 50, 100853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100853>