



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**GENERACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE
MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Carlos Alejandro Bello Rodríguez como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

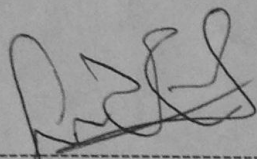
Tutor: Dr. José Cardier

Asesora académica: Dra. María Carolina Pérez Gordones

**CARACAS, VENEZUELA
MARZO-2018**

Acta

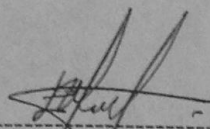
Quienes suscribimos, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela de Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado presentado por el Bachiller **Carlos Alejandro Bello Rodríguez**, C.I. 20.220.532, titulado **"Generación de un modelo experimental de microambiente hematopoyético"**, nos hemos reunido hoy, 21 de marzo de 2018, en la sala Werner Jaffe del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la ilustre Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, bajo la tutoría del Dr. José Cardier, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de veinte (20) puntos. Certificamos que este trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar por el título de Licenciado en Biología.



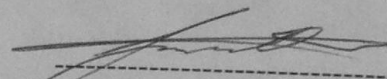
Dr. José Cardier
Tutor



Dra. María Carolina Pérez Gordones
Asesor Académico



Dra. Elizabeth Merentes
Jurado



Dr. Juan de Sanctis
Jurado

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron de formas muy distintas en mi formación y en la realización de este proyecto:

A mis padres, mi hermano y Titi. Por ustedes estoy donde estoy, son mi gran soporte y mi razón de ser. Gracias por tanto, los amo y adoro. Padre, gracias por ser mi fortaleza durante todo este tiempo, sin ti no sé qué haría, gracias por tus valores y cuidados, gracias por ser mi héroe. Madre, gracias por todo lo que me enseñaste en vida, nunca lo olvidaré y siempre seguiré tus enseñanzas, aunque no sigas físicamente conmigo. Hermano, gracias por todo tu amor y cariño en vida, sé que te volveré a ver a ti y a mi madre cuándo así el tiempo lo decida. Titi, gracias por demostrarme que familia no es sangre, gracias por tu dedicación y cuidados en todos estos años.

A mi tía Izaskun, por todo su cariño y apoyo en mi vida. Agradezco a la vida por tenerla aunque esté lejos, no existe un mar que pueda separarnos.

A mi tutor, el Dr José Cardier, por todo su apoyo en el desarrollo de la tesis, por sus enseñanzas, por mostrar su amor por la ciencia y que nos contagia a todos los que estamos con él, por siempre darle la vuelta a lo que parece no tener solución, por luchar por sueños que parecen imposibles.

A las Dras. Olga y Dylana, por su amabilidad y estar siempre dispuestas a aclarar mis dudas, cuyo apoyo fue fundamental en la tesis.

A mis amigos de la UTC Eloisa, José, Carla, María Andreína, Giselle, Naybeth, Christofer y Teemly, por brindarme su amistad, por los buenos momentos que pasamos juntos, por siempre compartir conmigo y estar dispuestos a ayudarme.

A la Dra. María Carolina, por su buena disposición en todo momento y sugerencias en el desarrollo de la tesis.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por brindarme la oportunidad de realizar una investigación de calidad.

A los profesores de la Universidad Central de Venezuela que me brindaron diversas enseñanzas durante mi estancia en la carrera.

Resumen

Las células madre (CM) son células con capacidad de autorenovación, proliferación y diferenciación a células de diferentes linajes. Las CM hematopoyéticas (CMH) constituyen un tipo de CM con capacidad de diferenciarse a todos los linajes celulares de la sangre; proceso conocido como hematopoyesis y mediante el cual se mantiene la homeostasis celular en la sangre. En el adulto, el proceso de hematopoyesis ocurre principalmente en la médula ósea (MO), en un microambiente hematopoyético (MH) o nicho. Sin embargo, en ciertas condiciones patológicas o experimentales, la hematopoyesis puede generarse en tejidos y órganos diferentes a la MO, en un proceso conocido como hematopoyesis extramedular (HE). El hígado es uno de los órganos en donde puede ocurrir HE. Para que se produzca la HE es necesario que existan microambientes que favorezcan la promoción de supervivencia, proliferación y diferenciación de CMH. Estos microambientes son conocidos como microambientes hematopoyéticos (MH) y están constituidos por células y proteínas del estroma de la MO. Con relación al componente celular de los MH, es bien conocido que las células estromales mesenquimales juegan un papel fundamental para promover la hematopoyesis a partir de las CMH. Así mismo, es bien conocido que el colágeno es un componente fundamental de los MH. Los MH pueden ser simulados *in vitro* e *in vivo* mediante la combinación de elementos celulares con matrices o soportes biológicos. En el presente trabajo, se emplearon los conocimientos de hematopoyesis, HE y de modelos tridimensionales para desarrollar un modelo tridimensional (3D) constituido por CMH de ratón, células estromales mesenquimales (CEM) humanas y microperlas de colágeno (MC), todo lo cual fue incluido en un coágulo de plasma rico en plaquetas (PRP). Se realizaron estudios de viabilidad y funcionalidad de las CMH en cultivos *in vitro* del complejo 3D, PRP/CMH/CEM/MC. Así mismo, coágulos del complejo

PRP/CMH/CEM/MC fueron implantados a nivel subcutáneo en ratones y posteriormente se evaluó la generación de células sanguíneas en dicho implante. Los estudios funcionales de hematopoyesis, tanto *in vitro* como *in vivo*, fueron investigados mediante ensayos clonogénicos en medio semisólido (metilcelulosa) suplementado con citoquinas hematopoyéticas, estudios morfológicos y análisis fenotípicos mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que el modelo 3D de PRP/CMH/CEM/MC es un sistema en el cual se genera hematopoyesis tanto *in vitro* como *in vivo*.

Palabras clave: nicho, células madre hematopoyéticas, hematopoyesis, hematopoyesis extramedular, células estromales mesenquimales.

Índice

1) Introducción.....	1
2) Antecedentes.....	5
2.1) Detección de CMH.....	5
2.2) Microambientes hematopoyéticos.....	6
2.3) Estudio de hematopoyesis extramedular.....	7
3) Objetivos.....	8
3.1) Objetivo general.....	8
3.2) Objetivos específicos.....	8
4) Hipótesis.....	8
5) Materiales y métodos.....	9
5.1) Obtención de CMH de MO de ratón.....	9
5.2) Descongelamiento y cultivo de CEM humanas.....	12
5.3) Formación de modelo 3D hematopoyético (CMH/CEM/MC/PRP).....	13
5.4) Implante de CMH/CEM/MC/PRP en ratones.....	14
5.5) Sacrificio de ratones y ensayos hematopoyéticos.....	15
5.5.1) Ensayo de metilcelusa.....	16
5.5.2) Análisis de citometría de flujo.....	16
5.5.3) Evaluación morfológica de células obtenidas del implante.....	18
5.6) Tinción de células hematopoyéticas de ratón y CEM humanas mediante PKH	20

5.7) Evaluación de células marcadas con PKH mediante citometría de flujo y microscopia confocal.....	22
5.8) Extracción y estudios funcionales del implante de CMH/CEM/MC/PRP en ratones	24
6) Resultados.....	26
6.1) Caracterización de CMH de MO de ratón mediante citometría de flujo.....	26
6.2) CMH/CEM/MC/PRP después de 15 días y 3 meses de implante.....	27
6.3) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días.....	28
6.4) Caracterización mediante citometría de flujo de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días.....	30
6.5) Evaluación funcional, fenotípica y morfológica de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días.....	33
6.6) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses.....	35
6.7) Caracterización mediante citometría de flujo de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses.....	37
6.8) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses.....	40
6.9) Análisis de modelo 3D hematopoyético mediante citometría de flujo y microscopia confocal	42
6.10) Modelo 3D hematopoyético (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) después de 7, 15 y 30 días de implante.....	47

6.11) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 7 días.....	49
6.12) Evaluación de CMH-PKH ^R y CEM-PKH ^G provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 7 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.....	50
6.13) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 7 días.....	52
6.14) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 15 días.....	54
6.15) Evaluación de CMH-PKH ^R y CEM-PKH ^G provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 15 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.....	56
6.16) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 15 días.....	58
6.17) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 30 días.....	59
6.18) Evaluación de CMH-PKH ^R y CEM-PKH ^G provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 30 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.....	61
6.19) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 30 días.....	63
7) Discusión de resultados.....	65
8) Conclusiones.....	69
9) Referencias.....	70

Índice de figuras

Figura 1 Aislamiento de CMH de MO de ratón.....	11
Figura 2 Cultivo de CEM.....	13
Figura 3 Generación de modelos 3D hematopóyéticos (CMH/CEM/MC/PRP).....	14
Figura 4 Implante subcutáneo de CMH/CEM/MC en ratones.....	15
Figura 5 Diseño experimental de evaluación de hematopoyesis.....	19
Figura 6. Evaluación de células marcadas con PKH mediante citometría de flujo y microscopia confocal	23
Figura 7 Diseño experimental de evaluación de hematopoyesis con células teñidas.....	25
Figura 8. Caracterización de CMH de MO de ratón mediante citometría de flujo.	26
Figura 9. Extracción del implante (CMH/CEM/MC/PRP) después de 15 días y 3 meses.....	28
Figura 10. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días.....	29.
Figura 11 Caracterización de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días mediante citometría de flujo (región R2).....	31
Figura 12 Caracterización de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días mediante citometría de flujo (región R3).....	32

Figura 13. Evaluación funcional, fenotípica y morfológica de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días.....	34
Figura 14. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses.....	36
Figura 15. Caracterización de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses mediante citometría de flujo.....	38
Figura 16 Caracterización de células adherentes provenientes de explantes mediante citometría de flujo.....	39
Figura 17. Caracterización de células adherentes provenientes del primer pase celular del explantes mediante citometría de flujo.....	40
Figura 18. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses.....	41
Figura 19. Cultivo, caracterización de CMH de MO de ratón y CEM humanas mediante citometría de flujo.....	44
Figura 20. Análisis de modelo 3D hematopoyético (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) mediante citometría de flujo y microscopía confocal.....	46
Figura 21. Extracción de los implantes (CMH-PKH ^R /MC/CME-PKH ^G /PRP) de 7, 15 y 30 días.....	48
Figura 22. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 7 días.....	49

Figura 23. Análisis de CMH-PKH ^R y CEM-PKH ^G provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 7 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.....	51
Figura 24. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 7 días.....	53
Figura 25. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 15 días.....	55
Figura 26 Análisis de CMH-PKH ^R y CEM-PKH ^G de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 15 días, mediante citometría de flujo.....	57
Figura 27. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 15 días.....	59
Figura 28. Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 30 días.....	60
Figura 29. Análisis de CMH-PKH ^R y CEM-PKH ^G provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 30 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.....	62
Figura 30. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH ^R /CEM-PKH ^G /MC/PRP) de 30 días.....	64

Listado de abreviaturas

CEM: Célula estromal mesenquimal

CM: Célula madre

CMH: Célula madre hematopoyética

CMH-LT: Célula madre hematopoyética Long-Term

CMH-ST: Célula madre hematopoyética Short-Term

CMO: células de médula ósea

EKLF: Erythroid Kruppel-like factor (factor tipo Eritroide-Kruppel)

Fli-1: Friend leukemia integration 1

HE: Hematopoyesis extramedular

LSEC: Liver Sinusoidal endothelial cells (células endoteliales del sinusoide hepático)

MC: Microperla de colágeno

MH: Microambiente hematopoyético

MO: Médula ósea

PLC: Progenitor linfoide común

PMC: Progenitor mieloide común

PMM: Progenitor multipotente

PRP: Plasma rico en plaquetas

1) **Introducción**

Las células madre (CM) son definidas como células capaces de autorenovarse, proliferar indefinidamente y generar múltiples linajes celulares. Las CM pueden ser clasificadas con base a su localización en: embrionarias (células pluripotentes que dan origen a todas las células somáticas del embrión, con capacidad de autorenovación indefinida y gran plasticidad) y adultas (células multipotentes capaces de generar diversos linajes celulares) (Vazin y Freed, 2010; Clever y Snippert, 2011)

Otra clasificación de las CM está basada en su capacidad de diferenciación: 1) células totipotentes (huevo o cigote), las cuales pueden generar un organismo completo, 2) células madre pluripotentes (células madre embrionarias) originadas a partir de las totipotentes y que son capaces de originar células de las tres capas embrionarias, y 3) células madre multipotentes y unipotentes, donde la primera puede formar un número limitado de tipos celulares (células de una sola capa embrionaria), y la segunda solo células de su mismo linaje (Osbourne, Golbsy y Kindt, 2007).

Las CM localizadas en la médula ósea (MO) y que tienen la capacidad de generar células de la sangre son denominadas células madre hematopoyéticas (CMH). A este proceso se le denomina hematopoyesis. La función de estas CMH es de suma importancia en el sistema sanguíneo, ya que son las responsables de generar todas las líneas celulares sanguíneas durante la vida del organismo, garantizando la homeostasis celular en la sangre. Las CMH son divididas en 2 clases según su capacidad para reconstituir MO en animales irradiados:

- CMH "Long-Term"(LT): reconstituyen la MO por largos períodos después de la ablación medular.
- CMH de "Short-Term"(ST): reconstituyen la MO por cortos períodos después de la ablación medular. (Weissman, 2000)

A partir de la célula CMH-LT, se generan las CMH-ST y de estas últimas se generan: 1) el progenitor mieloide común (PMC), que dará origen a glóbulos rojos, glóbulos blancos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células dendríticas) y megacariocitos (generadores de plaquetas), y 2) el progenitor linfoide común (PLC), del cual se generarán linfocitos B, T y células naturales asesinas (Natural Killer, NK) (Lo, MacLean y Stumpf, 2016; Weissman, 2000). Tanto las CMH como sus progenitores pueden ser detectados mediante análisis de expresión de antígenos específicos en la superficie de la membrana de cada una de estas células. En el caso del ratón, la presencia de los antígenos Sca-1 y c-Kit permite detectar la presencia de CMH (Terry y col, 2003)

La hematopoyesis se inicia a nivel embrionario en el saco vitelino (7 días después de la fecundación) donde se dará generación de glóbulos rojos para el aporte de oxígeno de los tejidos. Luego, el proceso pasará a una región de la aorta dorsal denominada "Aorta-gonada-Mesonefro", para seguir en el hígado fetal, timo, bazo y finalmente a ser desarrollada principalmente en la MO (Orkin y Zon 2008). El proceso de diferenciación hematopoyético está relacionado con la expresión de ciertos factores de transcripción, tal como es el caso de *GATA-1* y *PU.1*, que promueven la diferenciación eritrocitos/megacariocitos/eosinófilos y eosinófilos/neutrófilos/basófilos/macrófagos/ respectivamente. Otros ejemplos de factores de transcripción son C/EBP para un destino

celular de eosinófilos, GATA3 y T-bet para células colaboradoras (TH1 y TH2), el factor *Eritroide-Kruppel-like* (EKLF) y *Friend leukemia integration 1* (Fli-1) para linajes eritroides y megacariocitos. Pax5 para el desarrollo de células B, sin éste las células se diferencian a precursores de células T, NK, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, o eritocitos (Orkin y Zon 2008).

Algunas patologías o experimentalmente pueden influir en la hematopoyesis, ocasionando que este proceso ocurra en sitios distintos a la MO. Este proceso se llama hematopoyesis extramedular (HE) y puede darse en el bazo, hígado y nódulos linfáticos (Cardier y col, 1997).

Las CMH, al igual que las CM, requieren de microambientes que les proporcione los factores necesarios para su supervivencia, proliferación y diferenciación. Esta región es denominada “nicho”, y se define como un microambiente de un tejido local, que mantiene todos los procesos biológicos de las CM y sus progenitores. En la etapa adulta, tanto a nivel humano como en ratón, las CMH se encuentran en la región del endostio de los huesos largos que rodean la MO. A este nivel, las CMH más primitivas se encuentran en íntimo contacto con los osteoblastos, todo lo cual constituye el nicho osteoblástico. Por otro lado, los progenitores hematopoyéticos se encuentran a nivel de la microvasculatura en íntimo contacto con las células sinusoidales de la MO, constituyendo lo que se conoce como el nicho perivascular. (Scadden y Morrison, 2014).

Con relación al nicho osteoblástico, en modelos múridos, no está muy claro cómo es la relación que existe entre las células osteoblásticas y las CMH, ya que ratones en los cuales no hay células osteoblásticas (por delección del gen *Bgn*), no se observan cambios significativos en la hematopoyesis (Scadden y Morrison, 2014). En contraste con estos resultados, se ha reportado que ratones que no expresan factores de transcripción tales como SP7 en las células osteoblásticas, presentan un aumento de células estromales mesenquimales (CEM) en la médula ósea y una reducción drástica en la hematopoyesis, lo cual indica que las células del linaje osteoblástico sí son esenciales para la hematopoyesis (Scadden y Morrison, 2014). También se ha estudiado la participación de otras moléculas, tales como las cadherinas (glicoproteínas transmembranas), las cuales han sido involucradas en la unión de CMH-Osteoblastos por medio de adhesiones homofílicas entre las N-cadherinas expresadas en ambas células. Sin embargo, en los modelos experimentales donde no se expresaban estas moléculas, se observó que la hematopoyesis se desarrollaba de manera normal (Xi, 2009). Un último aspecto referente al nicho osteoblástico, es el caso del trasplante CMH a ratones irradiados, donde se ha observado que las CMH se ubican en la cercanía de la superficie del endostio, lo cual puede deberse a efectos indirectos de las células osteoblásticas (Scadden y Morrison, 2014).

En el caso del nicho perivascular, existen reportes que indican que este microambiente está regulado por señales del sistema nervioso periférico y de la molécula Cxcl12 que regula la retención de las CMH en la MO (Scadden y Morrison, 2014).

Basado en los conocimientos que se tienen de los elementos que constituyen el microambiente hematopoyético (MH), se han desarrollado algunos modelos 3D que simulan el MH de la MO. Esto con el fin de poder producir células sanguíneas en el laboratorio y su potencial uso en pacientes. En los últimos años, algunos trabajos han reportado el desarrollo de modelos 3D de MH, usando diferentes soportes y células. Es de hacer notar que los modelos clásicos de hematopoyesis usan sistemas de cultivo celulares bidimensionales (2D), en los cuales las CMH se cultivan sobre monocapas de células estromales en frascos de cultivos (Choi y col., 2015). En contraste, en los modelos 3D las células son cultivadas en estructuras o soportes que asemejan las condiciones *in vivo* del MH (Ma y col, 2001).

Con base a los conocimientos de la composición celular y de proteínas que constituyen el MH es posible desarrollar modelos 3D que simulen el sistema hematopoyético. La aplicación de estos modelos en un futuro podría ser de gran utilidad no solo para entender la hematopoyesis, sino también para la producción de células de la sangre y su uso en pacientes con defectos en la producción de células sanguíneas

2) Antecedentes

2.1) Detección de CMH

Los estudios pioneros en la detección de CMH se originaron en experimentos de ratones irradiados con cobalto-60, a los cuales se les inyectó por vía intravenosa células de MO, observándose la formación de colonias con aspecto de nódulos en el bazo. Dichas

células fueron extraídas, demostrándose que los nódulos estaban constituidos por células de tipo hematopoyético (McCulloch y Till, 1961).

En 1988, Irving L. Weissman logró aislar por primera vez las CMH más primitivas hasta el momento. Estas células se caracterizaban porque no expresaban los marcadores de células maduras o diferenciadas, tales como Gr-1, B220, CD4 y CD8, pero sí expresaban el antígeno Sca-1. Es importante resaltar que al inyectar estas células en ratones irradiados letalmente, se pudo salvar a un 50% de estos ratones (Weissman y col, 1988). Posteriormente, Weissman reportó que las CMH expresaban el receptor c-kit (Ikuta y Weismann, 1992).

2) Microambientes Hematopoyéticos

A partir de los trabajos de McCulloch (1961), se desarrolló un concepto nuevo, el nicho de las CM, el cual fue propuesto por primera vez en 1978 por Scofield (Scadden, 2006). Este nicho debe tener las características de ser un sitio anatómico definido, donde las CM proliferan, se desarrollan y además la diferenciación celular es inhibida. Scofield consideraba que las unidades formadoras de colonias observadas por McCulloch no correspondían a CM con su máxima capacidad de autorenovación, sino que se trataban de células más diferenciadas (Papyannopoulou y Scadden, 2016). Posteriormente, se desarrollaron estudios para comprender los elementos que constituían dicho nicho en la MO. Se ha reportado la presencia de moléculas tales como las cadherinas, y la osteoponina. En el caso de las cadherinas, estas son glicoproteínas transmembrana que son responsables de mantener en íntimo contacto a las células en los tejidos animales (Aria y col, 2012). En el caso de la osteoponina (glicoproteína sintetizada por

osteoblastos), esta es una proteína que se expresa en la MO, específicamente a nivel endostial (Nilsson y col., 2005). Con relación a los elementos celulares que componen el MH, además de las CMH, es bien conocido que osteoblastos, células endoteliales y CEM juegan un papel fundamental en promover la supervivencia, proliferación y diferenciación de las CMH (Cao y col., 2013).

2.3) Estudio de Hematopoyesis Extramedular

A partir de los estudios del MH en MO, se desarrollaron investigaciones para conocer como estaban constituidos los MH en otros órganos, de manera de profundizar acerca de los elementos que constituyen estos nichos. Dentro de los estudios biológicos de las CMH, podemos mencionar los relacionados con la HE en hígado. En este órgano, se ha demostrado, la HE ocurre en microambientes específicos representados por las células endoteliales sinusoidales del hígado (LSEC, por sus siglas en inglés). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las LSEC representan los MH a nivel hepático. (Cardier y Barbera, 1997, Wittig, y col, 2010). Recientemente, ha sido reportado por este mismo grupo que las CEM de la mucosa olfatoria proporcionan un MH “*in vitro*” (Diaz-Solano y col., 2012).

Basado en los trabajos anteriores que demuestran las características de los microambientes hematopoyéticos, es posible generar un modelo 3D que se asemeje a la MO y a partir del cual se pueda desarrollar hematopoyesis, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el presente trabajo se propone un modelo 3D de MH conformado por CMH de ratón,

microperlas de colágeno (MC) que simulen la matriz extracelular de la MO, CEM humanas incluidas en un coágulo de plasma rico en plaquetas (PRP), todo lo cual conformaría un MH 3D constituido por CMH/CEM/MC/PRP.

3) Objetivos

3.1) Objetivo General

Desarrollar un modelo 3D que simule la hematopoyesis que ocurre en médula ósea (MO).

3.2) Objetivos Específicos:

- Aislar CMH de MO de ratón.
- Cultivar CEM humanas.
- Generar un modelo de cultivo 3D de MO constituido por CMH de ratón, CEM, microperlas de colágeno (MC), CEM humanas incluidas en un coágulo de plasma rico en plaquetas (PRP), formando un microambiente de CMH/CEM/MC/PRP.
- Evaluar la sobrevivencia y funcionalidad de CMH contenidas en un coágulo implantado subcutáneamente en un ratón.

4) Hipótesis

Basados en estos conocimientos de la relación del estroma, CMH y matriz, los cuales juegan un papel fundamental en la hematopoyesis, es posible que un sistema constituido

por CMH, células estromales mesenquimales (CEM) y microperlas de colágeno (MC) pueda constituir una matriz tridimensional capaz de generar hematopoyesis.

5) Materiales y Métodos

5.1) Obtención de CMH de MO de ratón

- Se utilizaron ratones machos de la cepa C57/BL6 de 6-8 semanas de edad (figura 1A), con peso entre 20 a 25 gramos, provenientes del bioterio central del IVIC. Los ratones fueron alimentados y mantenidos en condiciones apropiadas de temperatura y luz.

- Bajo una campana de flujo horizontal se procedió a sacrificar ratones, por medio de dislocación cervical. De estos se extrajo el fémur de cada extremidad (figura 1B).

- Se procedió a limpiar cada fémur con una gasa estéril, para así eliminar todos los tejidos musculares que rodean al hueso (figura 1C).

-Finalizada la limpieza de cada fémur, se procedió a la extracción de las células de la MO (CMO), para lo cual se realizó un pequeño corte en las epífisis de cada fémur. Luego, empleando una inyectadora de insulina, se perfundió el hueso con 0.5 cc de PBS, tal como se muestra en las figuras 1D y 1E.

- La obtención de la fracción de células mononucleares, se realizó mediante la centrifugación de las CMO sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque siguiendo el método descrito por Boyum (Boyum, 1968). Para ello la suspensión celular obtenida (figura 1F), fue dispensada sobre un gradiente de Ficoll/Hypaque (GE Healthcare), (figura 1G) en tubos cónicos de 15 mL en una proporción 2:1 (suspensión celular y Ficoll

respectivamente). Luego, esta suspensión fue centrifugada a centrifugación a 1800 r.p.m. durante 40 minutos.

- Del centrifugado anterior, se extrajo la interfase (figura 1H), donde se encuentran las células mononucleares y las CMH (figura 1I). La interfase se centrifugó a 1400 r.p.m durante 7 minutos, obteniéndose un botón de células, el cual se resuspendió en un frasco de cultivo T75 con 1mL de medio de cultivo α MEM CHANG (Gibco), suplementado con 18% de Chang B (Gibco), 2% de Chang C (Gibco), 1% de L-Glutamina (Gibco), 20 % de suero fetal bovino (Gibco) y 1% de Antibiótico-Antimicótico (Gibco).-(figura 1J).
- El cultivo celular se mantuvo en una incubadora de CO₂ (5%), en condiciones controladas de temperatura (37°C) y humedad (95%) (figura 1K).

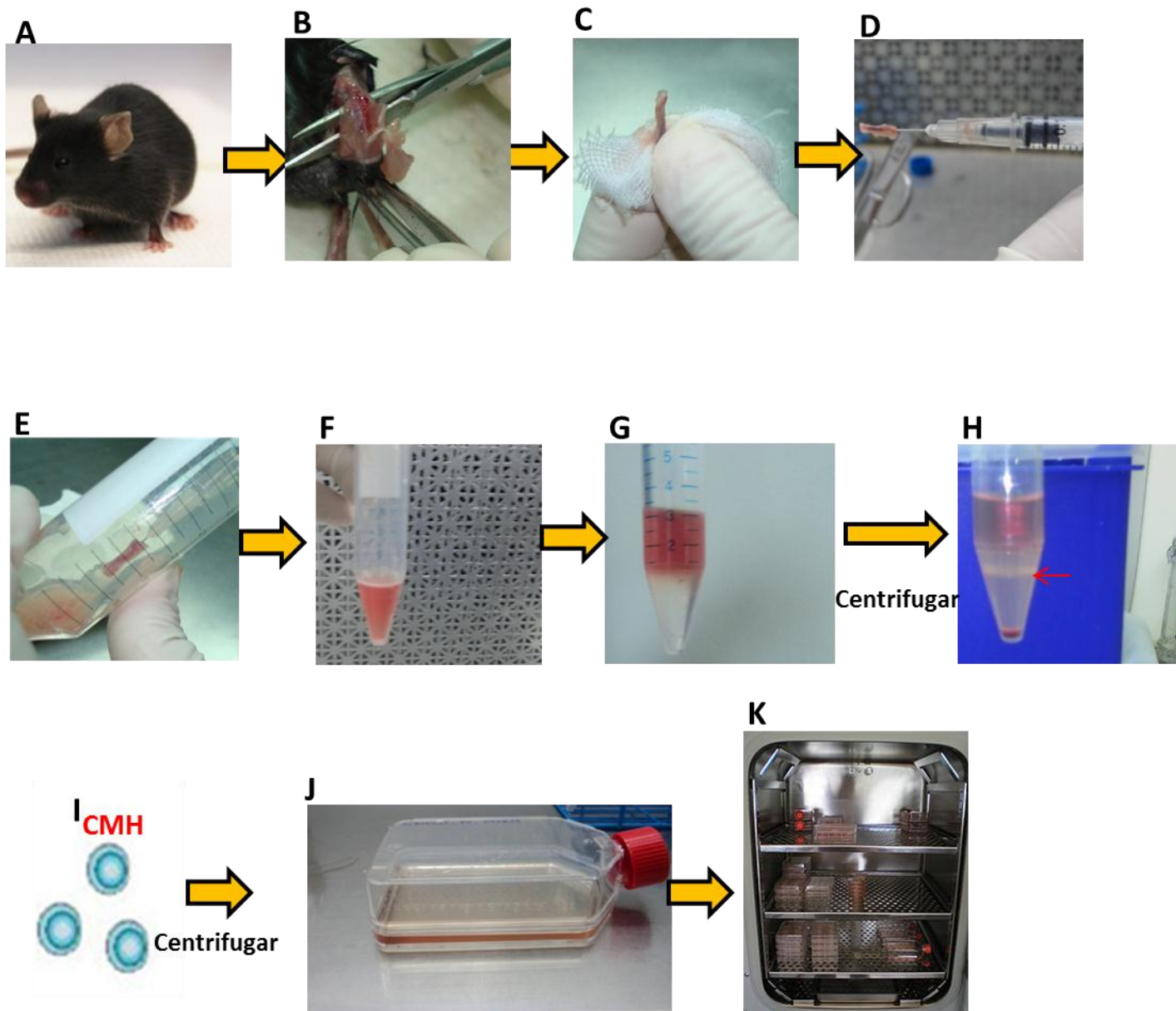


Figura 1. Aislamiento de CMH de MO de ratón. (A) Se sacrificaron 3 ratones de la cepa C57/BL6, a los que se les extrajo cada (B) fémur de cada extremidad. (C) Se realizó la limpieza de cada fémur por medio de gasas estériles para eliminar los tejidos musculares que rodean al hueso, además de garantizar condiciones de esterilidad. (D-E) A cada fémur se le realizó pequeños cortes en la epífisis y luego empleando una inyectora de insulina se perfundieron con 0,5cc de PBS. (F) La suspensión celular obtenida (1mL) del fémur de ratón se añadió a (G) 1 mL de Ficoll/Hypaque. Las células en Ficoll/Hypaque se centrifugaron a 1800 rpm durante 40 minutos, obteniéndose una (H) interfase de células mononucleares (flecha roja) y de (I) CMH de ratón. La interfase se extrajo y se centrifugó a 1400 rpm durante 7 minutos, obteniéndose un botón celular que se resuspendió en un (J) frasco de cultivo T75 con medio de cultivo α MEM CHANG (1mL). (K) El cultivo celular se mantuvo en una incubadora de CO₂ (5%), en condiciones controladas de temperatura (37°C) y humedad (95%).

5.2) Descongelamiento y cultivo de CEM humanas

- En este trabajo se emplearon CEM humanas provenientes de la cresta ilíaca, las cuales estaban almacenadas a -70°C en la Unidad de Terapia Celular. Estas células provienen de pacientes que recibieron tratamiento de regeneración ósea con CEM para regeneración de fracturas en pseudoartrosis. Los pacientes dieron su consentimiento para su uso.

- Las CEM humanas fueron descongeladas, bajo campana de flujo, colocando cada vial en un baño de maría a 37°C.

- La suspensión celular de cada vial fue colocada en un frasco de cultivo T75 (Falcon, Becton & Dickinson) (figura 2A-B), que contenía medio de cultivo α MEM CHANG (figura 2B).

- Las CEM humanas cultivadas en el frasco de cultivo T75 se mantuvieron en una incubadora de CO₂ (5%), en condiciones controladas de temperatura (37°C) y humedad (95%) (figura 2C).

De manera interdiaria fueron visualizadas en un microscopio invertido y se realizó cambio de medio de cultivo dos veces a la semana.

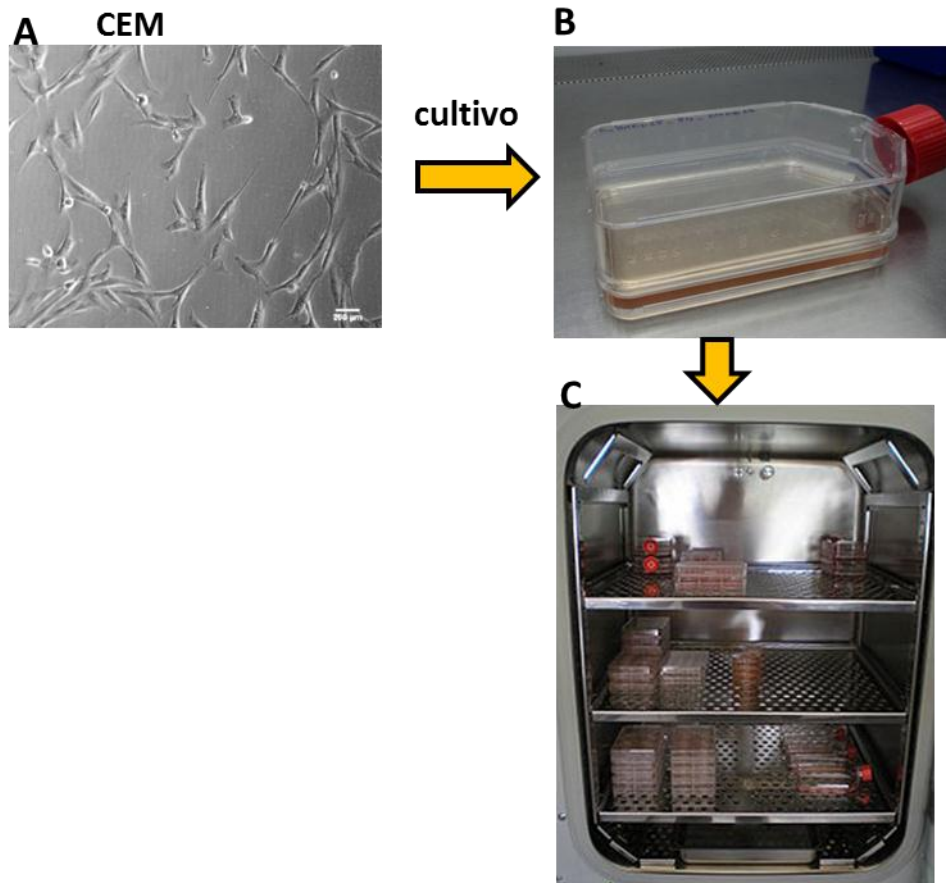


Figura 2. Cultivo de CEM. (A) CEM humanas almacenadas a -70°C en la Unidad de Terapia Celular, obtenidas de la cresta ilíaca de pacientes que recibieron tratamiento de regeneración ósea con CEM para regeneración de fracturas en pseudoartrosis, los cuales dieron su consentimiento para su uso. (aumento 10X). (B) La suspensión celular fue colocada en frascos T75 que contenían medio de cultivo αMEM CHANG. (C) La suspensión celular se mantuvo en incubadora de CO_2 (5%), en condiciones controladas de temperatura (37°C) y humedad (95%).

5.3) Formación de modelo 3D hematopoyético (CMH/CEM/MC/PRP)

Para el desarrollo del modelo 3D de hematopoyesis se usó MC (Atello Cell ® KOKEN, Bovine dermis 100~ 400 μm), PRP de individuos sanos, CMH de ratón y CEM humanas. Se siguió el protocolo previamente descrito por Wittig y colaboradores (Wittig y col., 2016). En nuestro modelo se cultivaron 150.000 CEM humanas (figura 3A) sobre MC (lavadas previamente con PBS) durante 24 horas (figura 3B-C). Transcurridas las 24 horas de cultivo de las CEM-MC, se añadieron las CMH (1×10^6 - 2×10^6 células) de la MO de ratón (figura 3D) a las CEM-MC. Al complejo CMH/CEM/MC, se le adicionó PRP. Posteriormente, se agregó una mezcla de cloruro

de calcio al 5% -Trombina (relación 1:1), generándose un coágulo que constituye una estructura 3D constituida por PRP/CMH/CEM/MC (figura 3E). El complejo 3D CMH/CEM/MC/PRP fue implantado a nivel subcutáneo en ratones (n=4).

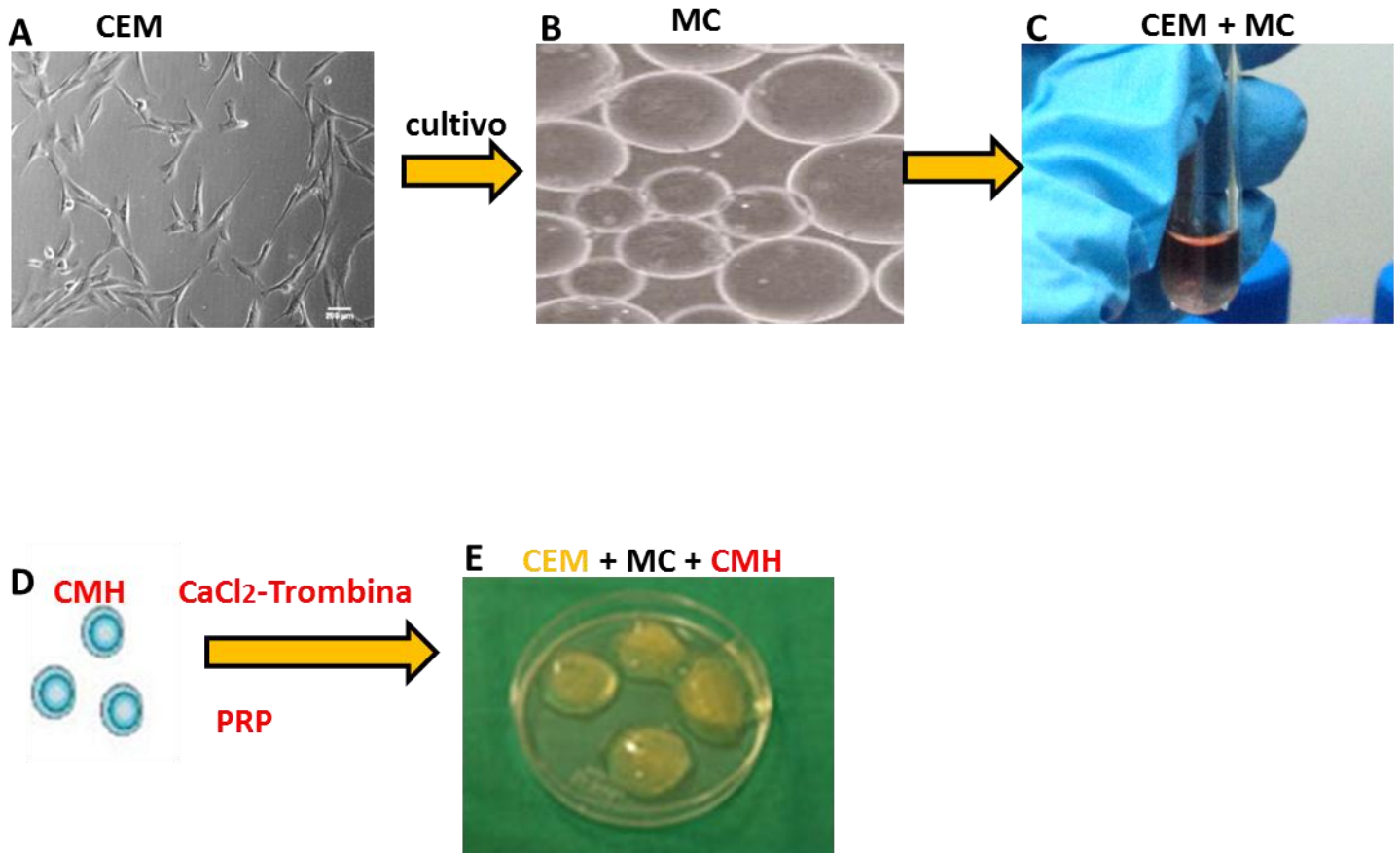


Figura 3 Generación de modelos 3D hematopoyéticos (CMH/CEM/MC/PRP). (A) CEM humanas almacenadas en la Unidad de Terapia Celular (aumento 10X) junto a (B) MC (aumento 10X) (C) fueron cultivadas durante 24 horas, para luego añadirles (D) CMH aisladas de MO de ratón y una mezcla de cloruro de calcio al 5% -Trombina (relación 1:1) y PRP, con lo que se pudo generar el (E) complejo 3D constituido por CMH/CEM/MC/PRP.

5.4) Implante de CMH/CEM/MC/PRP en ratones:

- El procedimiento que se describe a continuación fue realizado bajo una campana de flujo horizontal para mantener las condiciones de esterilidad.

- Ratones C57/Bl6 fueron anestesiados con ketamina (ketamax ®, 100 mg/kg) y xilacina (sedanxil®, 7,5 mg/kg) para luego ser rasurados en la zona dorsal (figura 4A).
- Posteriormente, se procedió a realizar una incisión de 0.5 mm en el dorso del animal a través de la cual se realizó implante subcutáneo de las CMH/CEM/MC/PRP (figura 4B).

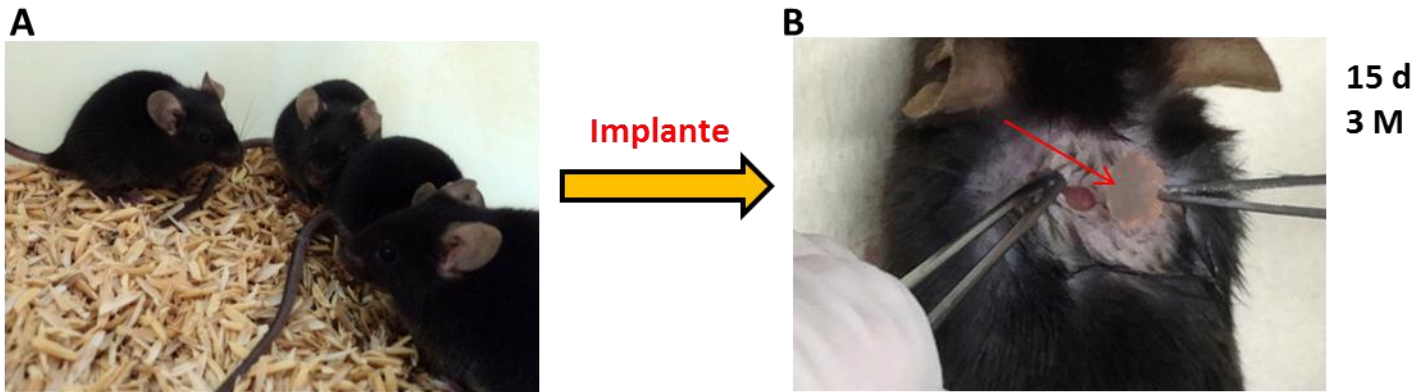


Figura 4 Implante subcutáneo de CMH/CEM/MC en ratones. (A) Ratones machos fueron anestesiados con una dosis de ketamina 100 mg/kg y xilacina 7,5. (B) Los ratones fueron afeitados y se les realizó una incisión de 0.5 mm en el dorso, a través de la cual se realizó implante subcutáneo de las CMH/CEM/MC/PRP. Los implantes se dejaron en los ratones por 15 días (15d) y 3 meses (3M).

5.5) Sacrificio de ratones y ensayos hematopoyéticos

- Transcurridos 15 días y 3 meses, se procedió a extraer los implantes de los ratones. Para ello, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y rasurados en la región dorsal donde se extrajeron los implantes en condiciones de esterilidad (figura 5A-C).
- Los implantes se colocaron en placas de Petri.
- Se realizó observación microscópica de los implantes en la lupa y posteriormente se tomó registro fotográfico.
- Los implantes fueron divididos en 3 segmentos (figura 5D) para realizar los siguientes estudios:

- Una muestra fue sembrada como explante en un pozo de una placa de 24 pozos a fin de evaluar la migración y proliferación de las células (figura 5 E).
- Una muestra fue colocada en paraformaldehído al 4% (Sigma), para estudios histológicos (figura 5F).
- Una muestra fue digerida con la enzima colagenasa (1,392 mg/mL) (Sigma), cuyas células fueron contadas en una cámara de Neubauer y teñidas con azul de tripano. Las células obtenidas se emplearon para: estudios clonogénicos en medio semisólido de metilcelulosa (methocult[®]) suplementado con citoquinas hematopoyéticas (SCF; IL-3,IL-6,EPO), de citometría de flujo y morfológicos mediante tinción May-Grünwald/Giemsa (Sigma) (figura 5G-I). Las metodologías empleadas en estos estudios son las siguientes:

5.5.1) Ensayo de metilcelulosa

- Se resuspendió la muestra de la suspensión celular (50×10^3 células) proveniente de la digestión en colagenasa y se agregó a la metilcelulosa.
- Se adicionó la suspensión celular y de metilcelulosa en un pozo de una placa de 24 pozos.

5.5.2) Análisis de citometría de flujo

- Se centrifugó la suspensión celular a 1400 r.p.m. durante 10 minutos.
- El sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió en 300 μ L de PBS
- Se prepararon viales para estudios de citometría, con una cantidad aproximada de $5-10 \times 10^3$ células por vial. Se adicionaron anticuerpos primarios conjugados

a FITC, PE o PECy5. Se incubó durante 30 minutos. Los anticuerpos monoclonales de ratón empleados para los estudios de citometría fueron los siguientes:

- Anti-Ly-GA/E (Sca-1), que permite detectar células progenitoras hematopoyéticas.
 - Anti-CD117 (C-Kit) que permite detectar células progenitoras hematopoyéticas
 - Anti-CD11b que permite detectar monocitos
 - Anti-Gr-1 que permite detectar granulocitos
 - Anti-CD90 humano que permite detectar CEM humanas
 - Anti-CD3 para el reconocimiento de linfocitos T de ratón
 - Anti-CD19 para el reconocimiento de linfocitos B de ratón
 - Anti-B220 para el reconocimiento de linfocitos B de ratón
 - Anti-CD73 para el reconocimiento de CEM humanas
 - Anti-CD105 para el reconocimiento de CEM humanas
- Posterior a la incubación, se realizaron dos lavados con PBS y se centrifugó durante 5 minutos a 1200 r.p.m.
- Se extrajo sobrenadante y se resuspendió el pellet en PBS BSA 0,1% (BSA, Sigma).

- Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson). Cinco mil células fueron adquiridas y analizadas mediante el programa CellQuest (Becton Dickinson). Como controles se usaron viales que no contenían anticuerpo (autofluorescencia) o con el respectivo isotipo
- Establecidos los controles, se procedió a hacer el análisis de citometría para detectar las células positivas para el marcador que se buscaba.

5.5.3) Evaluación morfológica de células obtenidas del implante

- Las células obtenidas del implante fueron colocadas en un sistema para centrifugación en láminas portaobjetos y se centrifugaron en una citocentrífuga (cytospin) a 600 r.p.m. durante 5 minutos.
- Las muestras fueron teñidas con May-Grünwald y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Se adicionó buffer fosfato sobre la muestra, mezclando el buffer fosfato con el colorante May-Grünwald.
- Se descartó la mezcla que cubre la muestra y se adicionó el colorante Giemsa. Se incubó durante 15 minutos.
- Se descartó el colorante y se lavó la lámina con agua.
- La lámina se dejó secar en estufa en posición vertical.
- Se colocaron los cubreobjetos sobre las muestras y se fijaron con medio de montaje.
- Las muestras fueron examinadas bajo un microscopio de luz.

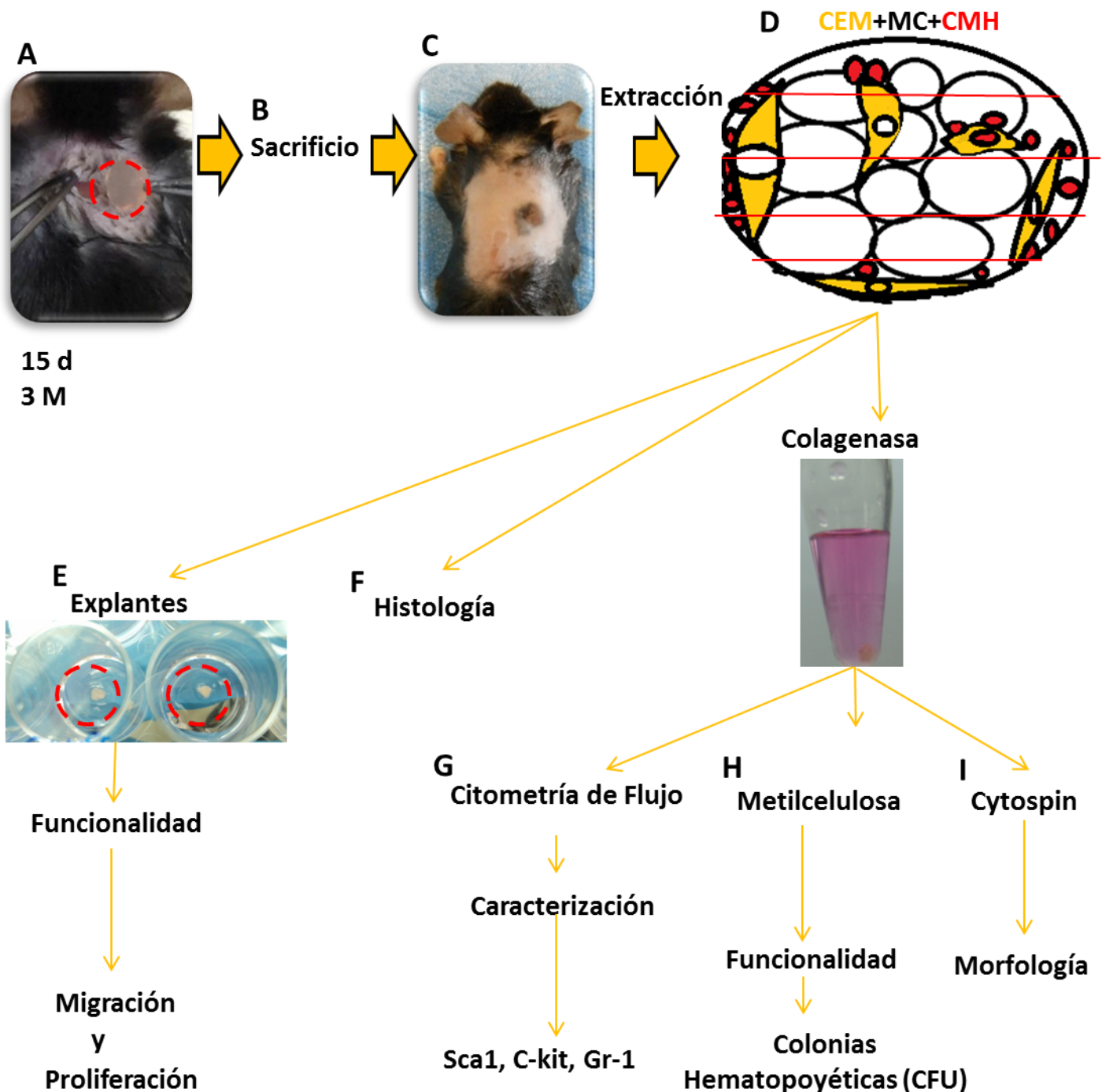


Figura 5 Diseño experimental de evaluación de hematopoyesis (A) Transcurrido 15 días y 3 meses se procedió a (B) sacrificar a los ratones por dislocación cervical y (C) una vez rasurados en la zona dorsal, se (D) extrajeron los implantes (representación gráfica del implante cortado en varios segmentos, donde las células alargadas representan a las CEM, las redondas pequeñas a las CMH y los círculos a las MC). Se tomaron muestras de los implantes para realizar estudios de (E) migración y proliferación colocando una muestra como un explante (círculos rojos) en un pozo de una placa de 24 pozos y (F) estudios histológicos. Además se tomaron muestras de implantes digeridos con colagenasa para realizar estudios de (G) caracterización por citometría de flujo, (H) funcionalidad por formación de colonias hematopoyéticas (CFU) en un medio semisólido (metilcelulosa) y (I) morfológicos de las células contenidas en el implante por medio de cytopsin y tinción May-Grünwald/Giemsa.

5.6) Tinción de células hematopoyéticas de ratón y CEM humanas mediante PKH

Se aislaron CMH de MO de ratón y se descongelaron CEM humanas de la misma forma como se detalló anteriormente en la metodología (figuras 1 y 2). Ambas poblaciones celulares fueron teñidas, con PKH red (Sigma) y green (Sigma) respectivamente, de la siguiente manera:

Tinción de CMH y CEM con PKH

- Se ajustó el número de células a 3×10^6
- Se eliminó el medio con suero de las células, para ello se centrifugó a 1400 r.p.m. por 5 minutos para obtener un botón de células.

1er Lavado:

- Se tomó alícuota de suspensión celular, de tal forma que se obtuviese un número de 3×10^6 células.
- Se adicionó a la alícuota de células el medio libre de suero (550 μ L).
- Se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 minutos. Finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante.

2do lavado:

- Se adicionaron 550 μ L de medio libre de suero en el botón celular.
- Se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 minutos.

Preparación para teñir: Se ajustó volumen de células de la siguiente manera:

- Se empleó un volumen celular de 25 μ L.

- Al volumen celular anterior se le adicionaron 125 μ L de Diluyente C, obteniéndose un volumen final de 150 μ L.

Preparación de colorante: en un tubo de microcentrífuga a parte se realizó el siguiente procedimiento:

- Se adicionaron 150 μ L de Diluyente C y 4 μ L de PKH (red o green).
- Se agitó suavemente con la mano

Marcaje celular

- Se agregaron los 150 μ L de suspensión celular al tubo de microcentrífuga anterior.
- Se incubaron por 5 minutos y luego se agitó suavemente.
- Se agregó 300 μ L de suero, e incubó por 1 minuto.
- Se agregó 300 μ L de medio completo.
- Se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 minutos.
- Finalizada la centrifugación se procedió a realizar los siguientes lavados:

1er lavado:

- Se descartó el sobrenadante y se agregó 1mL de PBS.
- Se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 minutos.

2do lavado:

- Se descartó el sobrenadante y se agregó 1mL de PBS.

- Se centrifugó a 1200 r.p.m. por 5 minutos.

Finalizada la centrifugación, se resuspendió el botón celular (CMH o CEM) en 500 μ L de PBS. Ambos tipos celulares teñidos fueron empleados para estudios de citometría de flujo y microscopía confocal de la siguiente manera:

5.7) Evaluación de células marcadas con PKH mediante citometría de flujo y microscopia confocal

- Las CEM humanas teñidas con PKH green (figura 6A) y las CMH extraídas de MO de ratón teñidas con PKH red (figura 6B), fueron cultivadas (figura 6C) para luego ser caracterizadas por citometría de flujo (figura 6D) (tanto ambas en cultivo como individuales) el mismo día, a 1 día y 7 días después de teñirse, con la finalidad de comprobar la correcta tinción sobre las mismas.

- Simultáneamente 150×10^3 CEM teñidas con PKH green (figura 6E) fueron cultivadas en MC (figura 6F-G), junto con 500×10^3 CMH teñidas con PKH red (figura 6H). Al cultivo de CMH/CEM/MC (figura 6I) se les agregó PRP y una mezcla de cloruro de calcio al 5% -Trombina (relación 1:1) generándose el modelo 3D hematopoyético con las células teñidas (figura 6J). Una porción del modelo 3D fue cortado y colocado en un portaobjetos, al cual se le fijó un cubreobjetos empleando un fijador de uñas. Fijado el cubreobjetos, se procedió visualizar el coágulo por microscopía confocal. Los modelos 3D hematopoyéticos fueron analizados por microscopía confocal el mismo día, 1 día y 7 días después de la tinción (figura 6K).

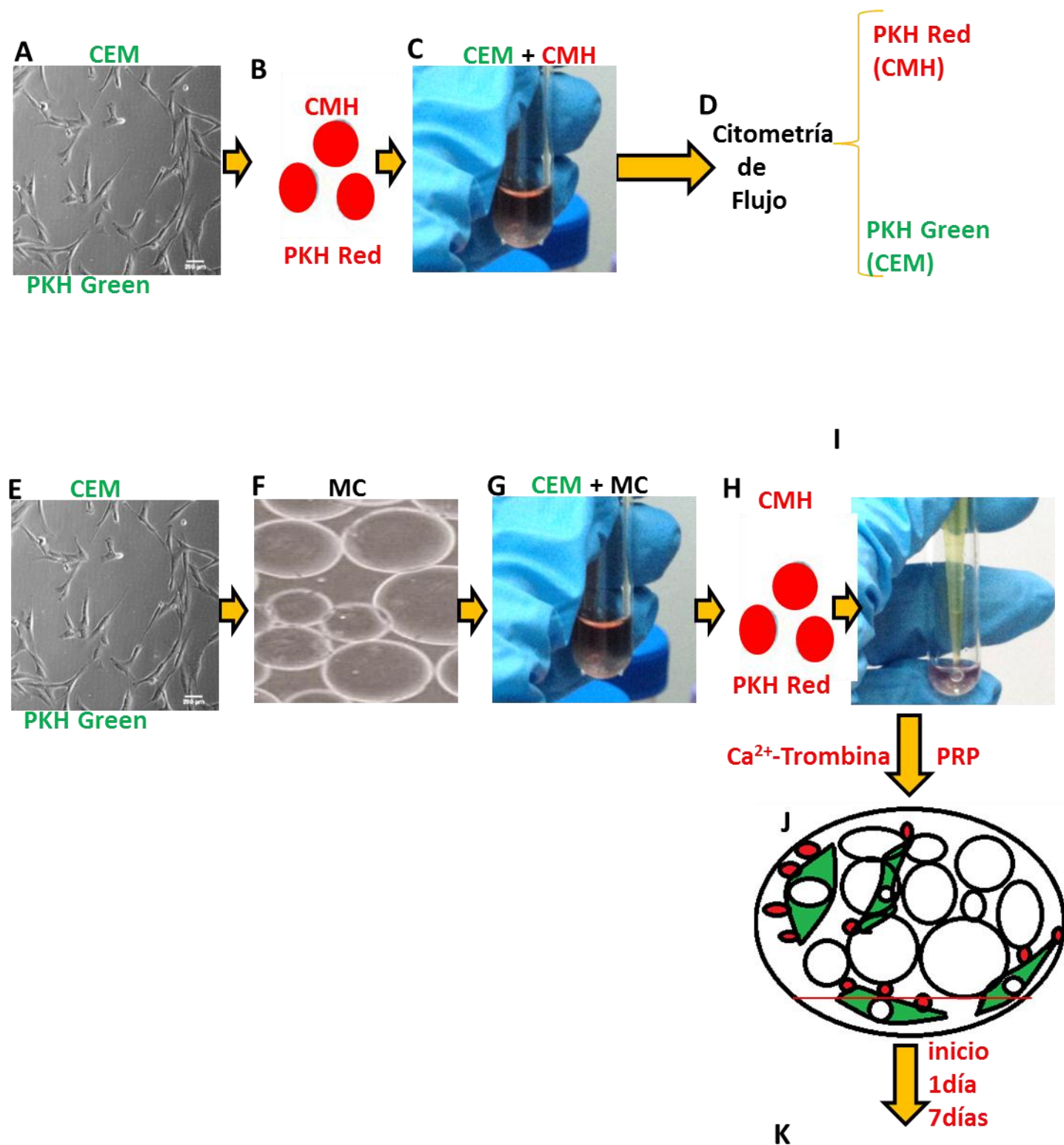


Figura 6. Evaluación de células marcadas con PKH mediante citometría de flujo y microscopía confocal (A) CEM humanas teñidas con PKH green junto a (B-C) CMH de MO de ratón teñidas con PKH red fueron (D) caracterizadas por citometría de flujo para evaluar la tinción sobre ambos tipos celulares. (E) CEM humanas teñidas con PKH green, (F) MC y (G) CMH de MO de ratón teñidas con PKH red fueron (I) cultivadas para luego añadirles una mezcla de cloruro de calcio al 5% -Trombina (relación 1:1) y PRP con el que se generó un (J) modelo 3D hematopoyético (CMH/CEM/MC/PRP) (representación gráfica del modelo 3D cortado en un segmento, donde las células alargadas representan a las CEM, las redondas pequeñas a las CMH y los círculos a las MC). (K) El modelo 3D hematopoyético (CMH/CEM/MC/PRP) fue analizado por microscopía confocal a diferentes tiempos (inicio del cultivo, 1 día y 7 días después de la tinción)

5.8) Extracción y estudios funcionales del implante de CMH/CEM/MC/PRP en ratones

-Otros estudios que se llevaron a cabo fueron realizados a partir de CMH/CEM/MC/PRP constituidos por CMH de MO de ratón teñidas con PKH red y CEM humanas teñidas con PKH green, empleando la misma metodología mencionada anteriormente. Las CMH/CEM/MC/PRP fueron implantadas subcutáneamente en ratones durante 7, 15 y 30 días. Transcurridos esos tiempos, se extrajeron los implantes y se dividieron en 4 segmentos para estudios de migración, proliferación, histológicos, funcionales, fenotípicos, morfológicos y de microscopía confocal, siguiendo la metodología descrita anteriormente (figura 7A-J), exceptuando el análisis citométrico, ya que no se realizó ningún tipo de marcaje con anticuerpos, debido a que la tinción (PKH red o green) interrumpirían la señal emitida por el fluorocromo unido al anticuerpo. En estos casos, se procedió a resuspender las células en PBS BSA 0,1% y se analizó inmediatamente en el citómetro de flujo.

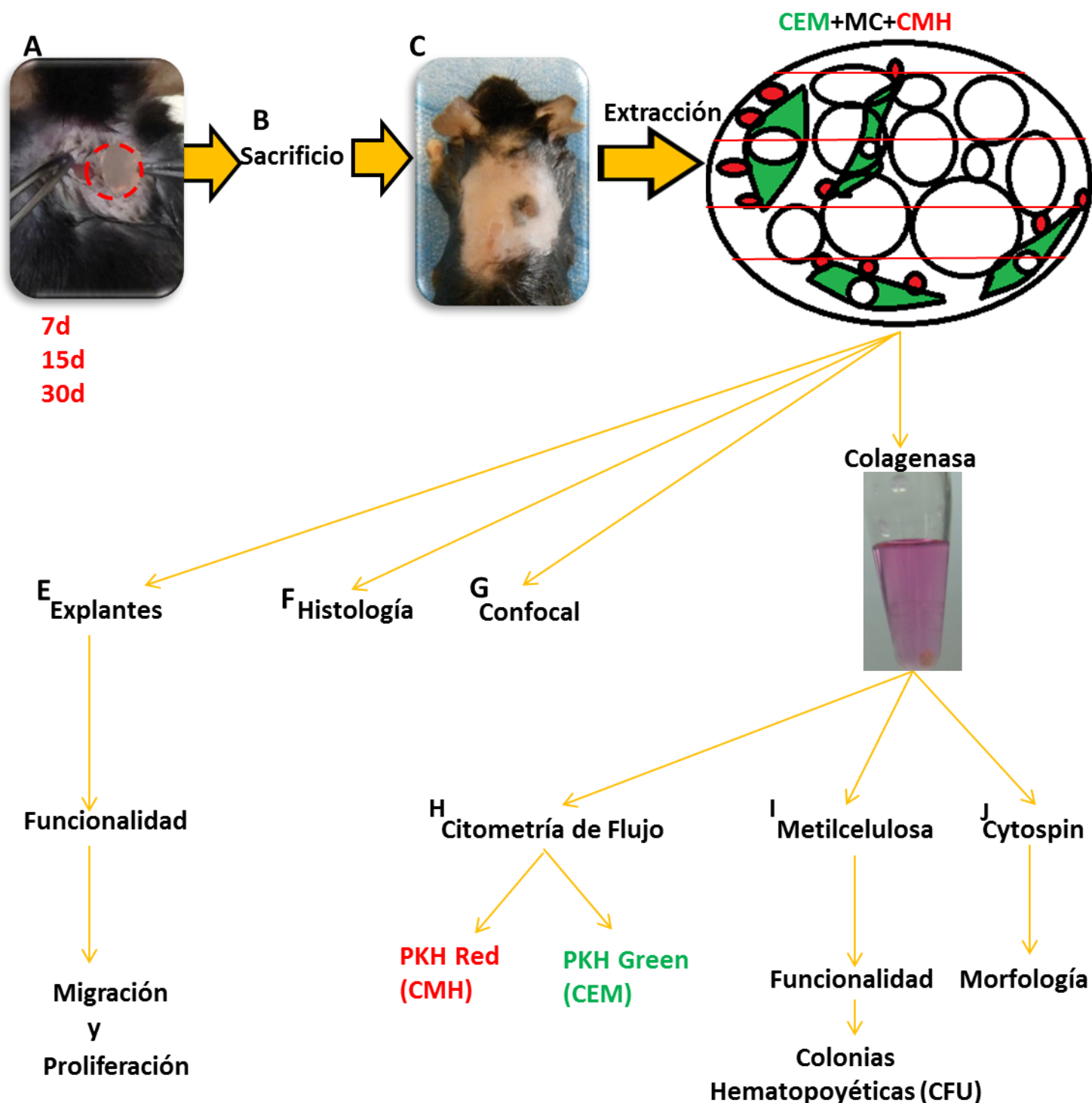


Figura 7. Diseño experimental de evaluación de hematopoyesis con células teñidas. (A) Las CMH/CEM/MC/PRP fueron implantadas en ratones durante 7, 15 y 30 días. Transcurridos estos tiempos se procedió a (B) sacrificar a los ratones por dislocación cervical y (C) una vez rasurados en la zona dorsal, se (D) extrajeron los implantes (representación gráfica del implante, en el que las líneas rojas representan los cortes que se realizaron). Se tomaron muestras de los implantes para realizar estudios de (E) migración y proliferación se colocó una muestra como un explantes y (F) estudios histológicos. (G) La tinción sobre las CMH y CEM se evaluó mediante microscopía confocal. Además, se tomaron muestras del implante digerido con colagenasa para estudios de (H) caracterización por citometría de flujo de las CMH teñidas con PKH red y las CEM humanas teñidas con PKH green, (I) funcionalidad por formación de colonias hematopoyéticas (CFU) y (J) morfológicos de las células contenidas en el implante, mediante cytopspin (frotis en portaobjeto) y tinción May-Grünwald/Giemsa.

6) Resultados

6.1) Caracterización de CMH de MO de ratón mediante citometría de flujo

Las CMO de ratón fueron examinadas por citometría de flujo (ver materiales y métodos), para determinar la presencia de CMH y así emplearlas en la generación del modelo 3D de CMH/CEM/MC/PRP. En la figura 8A, se muestran CMO de ratón distribuidas en un gráfico de dot plot, basado en sus características de tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Se estableció una región R1, en la que se localizan las CMH. La zona de mayor tamaño y granularidad ubicada por encima de R1 corresponde a células maduras sanguíneas. El análisis citométrico de las CMH de MO muestra la detección de células que expresan el marcador Sca-1 en la región R1 (figura 8 B).

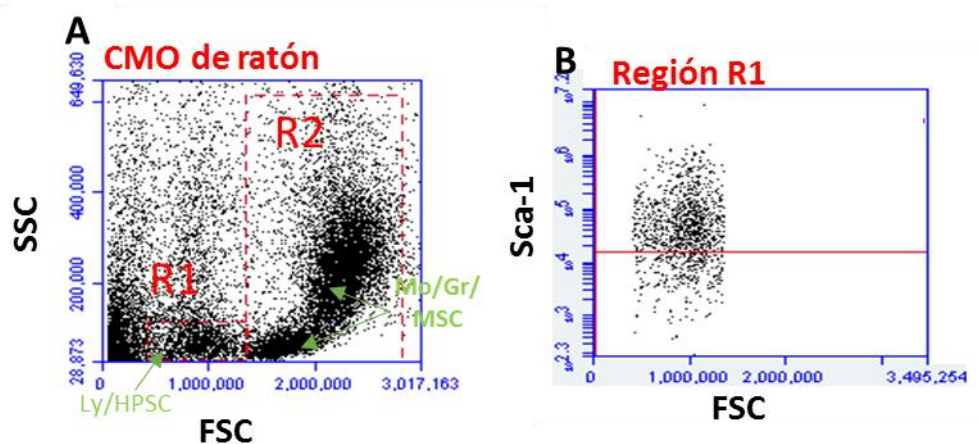


Figura 8. Caracterización de CMH de MO de ratón mediante citometría de flujo. (A) CMO de ratón se analizaron por citometría de flujo, cuyo gráfico dot plot muestra a las poblaciones celulares distribuidas con base en su tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Se estableció una región R1 que comprende la población de CMH de ratón. (B) Se detectaron células que expresan el marcador Ly-6A/E (Sca-1) en la región R1.

6.2) CMH/CEM/MC/PRP después de 15 días y 3 meses de implante.

El complejo 3D de CMH/CEM/MC/PRP fue implantado en ratones durante 15 días y 3 meses (ver materiales y métodos). Transcurridos estos tiempos, se sacrificaron los ratones y se les extrajeron los implantes (ver materiales y métodos) En el caso del ratón de 15 días, se observó el implante integrado al tejido del ratón y la presencia de angiogénesis, tal y como se muestran en la figuras 9A y 9B, además mediante microscopia se evidenció la angiogénesis alrededor del implante (figura 9C). En el ratón de 3 meses también se observó el implante integrado al tejido del ratón (figura 9D). También se pudo evidenciar, mediante observación en microscopio de luz, las MC empleadas en el modelo 3D (figura 9E-F).

Se tomaron muestras de los implantes extraídos para realizar estudios de migración, proliferación e histológicos. Simultáneamente, se tomaron muestras de los implantes que fueron digeridas con la enzima colagenasa para hacer estudios funcionales, fenotípicos y morfológicos (ver materiales y métodos) de las células contenidas en éstos, obteniéndose los siguientes resultados en el ratón de 15 días:

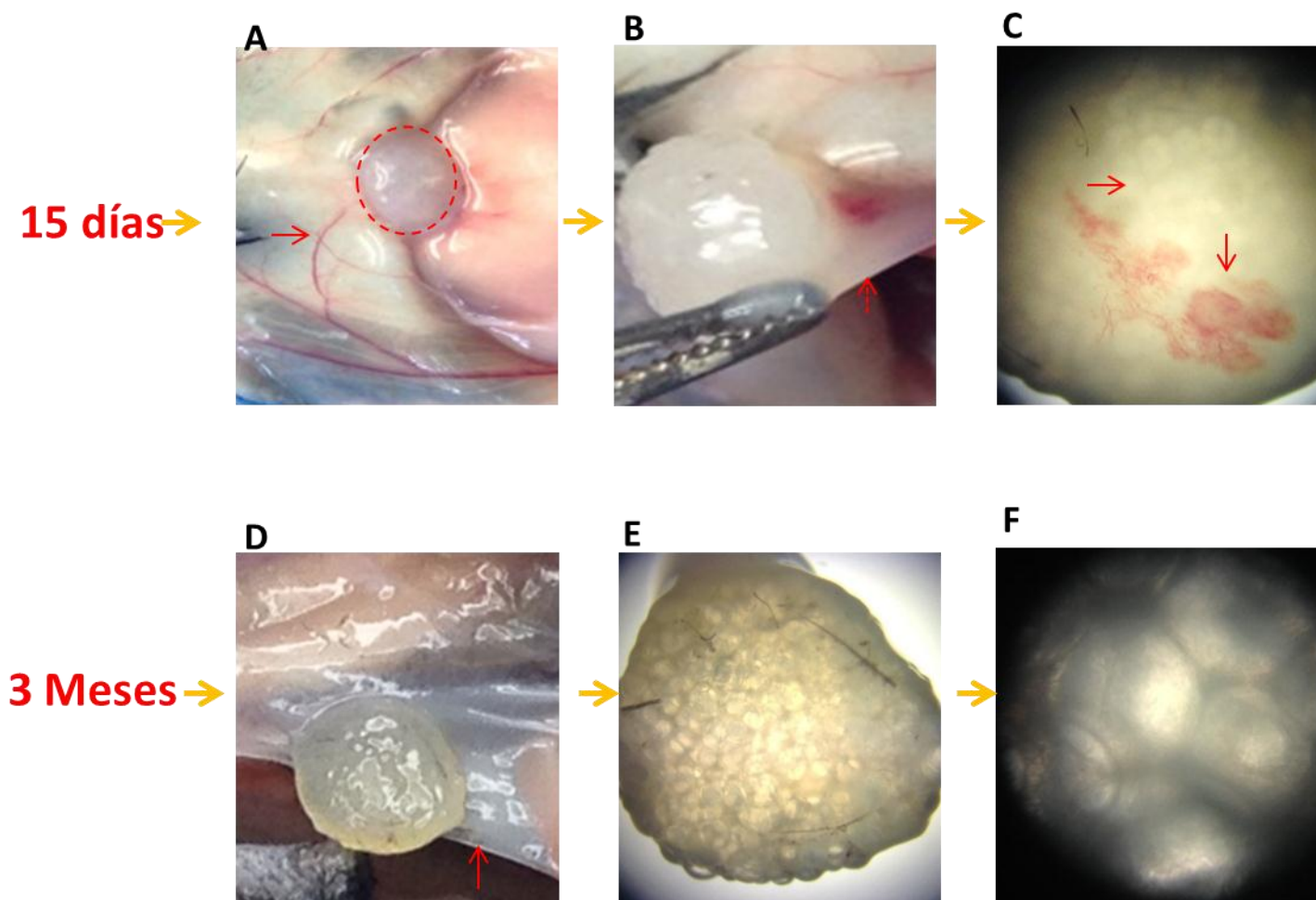


Figura 9. Extracción del implante (CMH/CEM/MC/PRP) después de 15 días y 3 meses. (A) En el implante de 15 días (círculo) se observaron vasos sanguíneos a su alrededor (flecha roja), (B) su integración al tejido (flecha roja) y (C) mediante microscopia se evidenció la presencia de angiogénesis alrededor del mismo (flechas rojas). (D) El implante de 3 meses se detalló igualmente integrado al tejido del ratón (flecha roja) y (E) al observarse en microscopio de luz, se pudo apreciar las (F) MC que lo constituyen

6.3) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días

Para evaluar la funcionalidad de las células contenidas en los implantes de 15 días, se tomaron muestras que fueron colocadas y cultivadas como explantes en una placa de

cultivo. Observaciones microscópicas evidenciaron la presencia de células redondas y otras de tipo fibroblastoide provenientes del explante a partir de las 24 horas de cultivo (figura 10A). Una mayor migración y proliferación de células se observó a partir de los 5 días de cultivo (figura 10B).

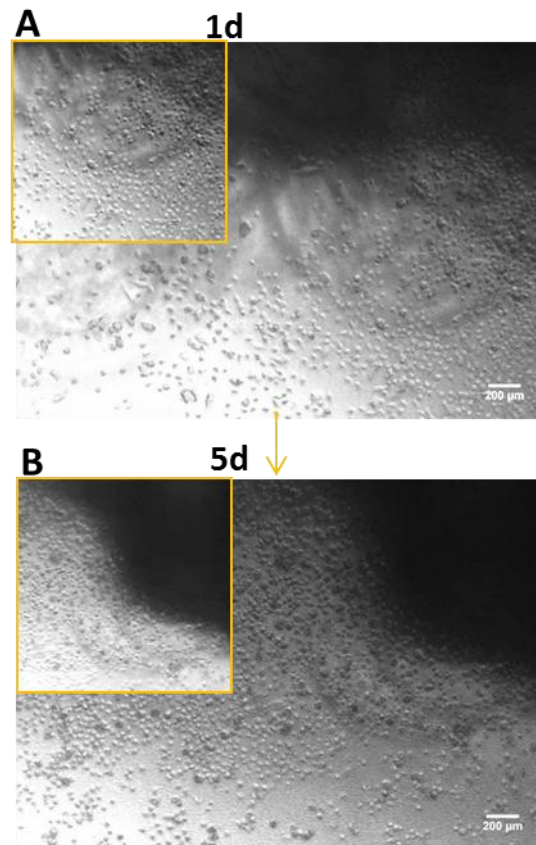


Figura 10. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días. (A) Transcurridas 24 horas de cultivo, se observaron células redondas migrando (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X) y (B) a los 5 días de cultivo, una mayor proliferación y migración de células redondas (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X).

6.4) Caracterización mediante citometría de flujo de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días

Para evaluar los tipos celulares en los implantes de 15 días, se tomaron muestras de éstos digeridos con colagenasa (figura 11A) y se analizaron mediante citometría de flujo (ver materiales y métodos) cuyo gráfico dot plot muestra las poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC). En el mismo se establecieron 3 regiones (R1, R2 y R3) según los tipos celulares que se esperan encontrar (figura 11B). En la figura 11C y 11D se observa la presencia de células Sca-1⁺ y C-kit⁺ respectivamente, además de células co-expresando ambos marcadores en la región R2 (figura 11E), por lo que podría tratarse de CMH de ratón. También, se detectaron células que expresaban los marcadores de linfocitos T (CD3) (figura 11F) y de linfocitos B (B220 y CD19) (figura 11G-H) en la región R2.

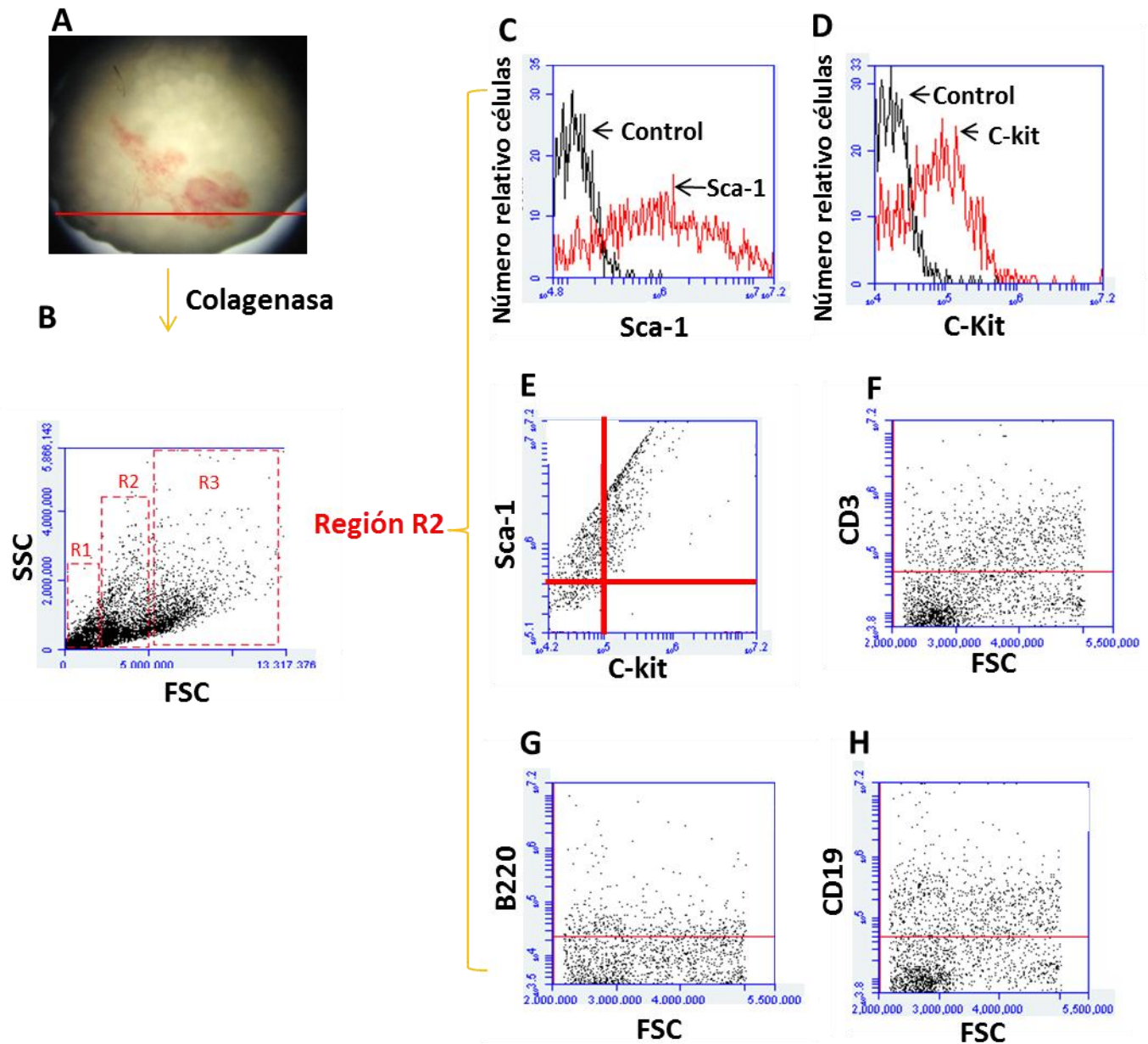


Figura 11 Caracterización de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días mediante citometría de flujo (región R2). (A) Una muestra de implante (la línea roja representa el corte que se realiza al implante) fue digerida con colagenasa, para luego cultivar las células provenientes de la muestra con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de interés (ver materiales y métodos). (B) Se analizaron las células provenientes del implante por medio de una citometría de flujo, en cuyo gráfico dot plot se muestra las poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC). En el mismo, se establecieron 3 regiones (R1, R2, R3), según los tipos celulares que se esperaba encontrar en estas regiones. La presencia de CMH y linfocitos se analizó en la región R2. (C) En el histograma de color rojo se observa la presencia de células Sca-1⁺ en la región R2. El histograma de color negro pertenece al control correspondiente. (D) Además, se detectaron células C-kit⁺ en la región R2 y (E) 25% de células co-expresando ambos marcadores, por lo que, indica la presencia de CMH ratón. (F) También, se pudo apreciar la presencia de linfocitos T (CD3) y (G-H) linfocitos B (células CD B220⁺ y CD19⁺) en la región R2

Al analizar la región R1, se obtuvieron resultados similares a los de la región R2. En cuanto a las células provenientes del implante de 15 días (figura 12A) analizadas en la región R3 (figura 12B), se observó la presencia de CEM humanas (células CD90⁺), y granulocitos de ratón (células Gr-1⁺), tal como se muestra en las figuras 12C y 12D respectivamente.

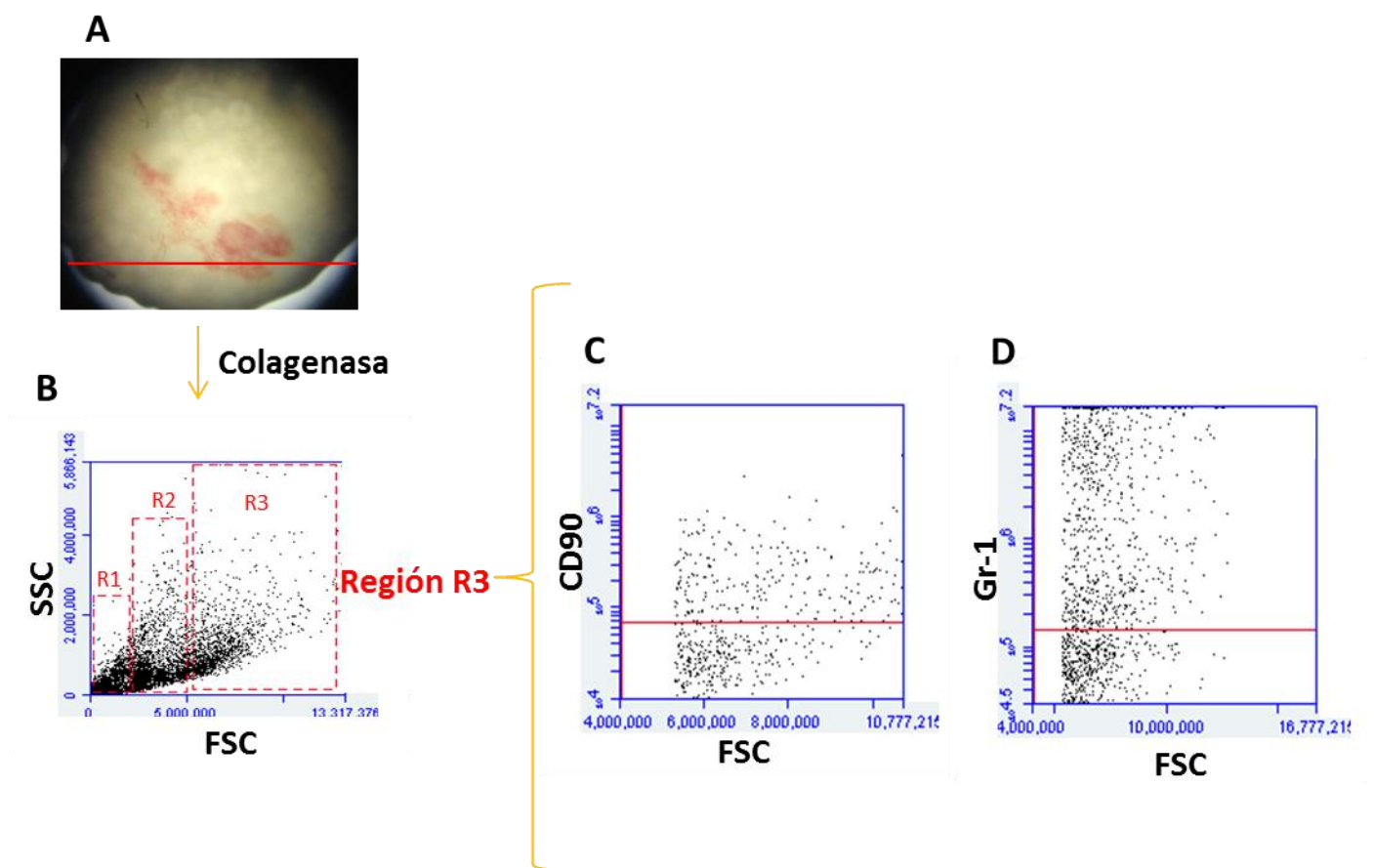


Figura 12 Caracterización de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días mediante citometría de flujo (región R3). (A) Una muestra de implante (la línea roja representa el corte que se realiza al implante) fue digerida con colagenasa, para luego cultivar las células provenientes de la muestra con anticuerpos dirigidos contra los marcadores de interés (ver materiales y métodos). (B) Se analizaron las células provenientes del implante por medio de una citometría de flujo, en cuyo gráfico dot plot se muestra las poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC). En el mismo se establecieron 3 regiones (R1, R2, R3), según los tipos celulares que se espera encontrar en estas regiones. La presencia de CEM humanas y células maduras se analizó en la región R3. (C) Se observó la presencia de CEM humanas (células CD90⁺) y (D) granulocitos (células Gr-1⁺) en la región R3.

6.5) Evaluación funcional, fenotípica y morfológica de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días

Con la finalidad de confirmar la presencia de CMH y observar las características morfológicas de las células provenientes de los implantes digeridos con colagenasa (figura 13A), se realizó cytopspin (frotis en portaobjeto) y tinción May-grünwald/Giemsa de estas células (ver materiales y métodos). Análisis microscópico de las células evidenciaron la presencia de células con características de polimorfonucleares (neutrófilos) y monocitos de ratón, tal como se muestra en la figura 13B. La capacidad de formación de colonias hematopoyéticas de las células provenientes del implante de 15 días, fue evaluada en un medio semisólido (metilcelulosa) suplementado con citoquinas hematopoyéticas. A los 5 días de cultivo, se evidenció la presencia de colonias de tipo hematopoyético (figura 13C). Las colonias fueron colectadas, disgregadas y las células obtenidas fueron caracterizadas por citometría de flujo (figura 13D) (ver materiales y métodos). Se observó la presencia de células que expresaban el marcador de células de origen mielopoyético (CD11b) (figura 13E) No se evidenció la presencia de células que expresaran los marcadores CD73 ni CD90 de CEM humanas (figura 13 F-G). La morfología de las células provenientes de las colonias fue evaluada mediante tinción May-Grünwald/Giemsa, observándose células de núcleo arriñonado y cluster de células, tal como se muestra en las figuras 13H y 13I respectivamente.

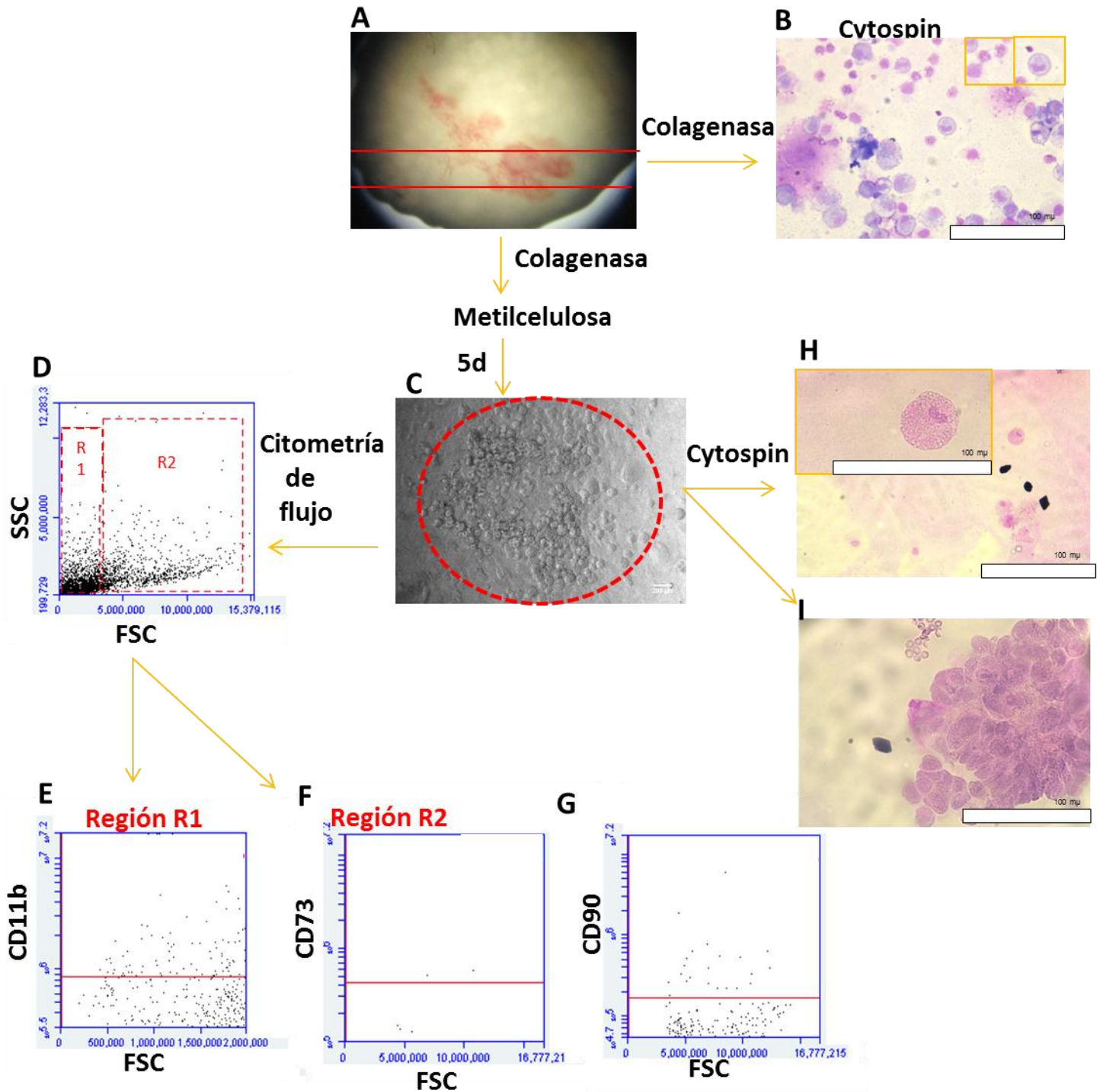


Figura 13. Evaluación funcional, fenotípica y morfológica de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 15 días. (A) Muestra de implante (la línea roja representa el corte que se realiza al implante) que fue digerida con la enzima colagenasa para realizarle estudios funcionales y morfológicos de metilcelulosa y cytopsin (frotis en portaobjetos) con tinción May-grünwald/Giemsa respectivamente (ver materiales y métodos). (B) En la tinción May-grünwald/Giemsa del cytopsin de las células provenientes del implante, se observaron células con características polimorfonucleares (neutrófilos) (imagen aumentada en recuadro derecho), monocitos de ratón (imagen aumentada en recuadro izquierdo) (aumento 20X). (C) Además, se pudo apreciar la formación de una colonia después de 5 días de cultivo en el medio semisólido (círculo) (aumento 10X). (D) Se realizó un análisis de citometría de las células provenientes de las colonias formadas en la metilcelulosa, cuyo gráfico dot plot muestra a las células distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Se establecieron 2 regiones (R1, R2) según los tipos celulares que se esperan encontrar en estas regiones. (E) Se observó la presencia de células CD11b⁺ (marcador de monocitos de ratón). (F-G) En el caso de los marcadores CD73 y CD90 (marcadores de CEM humanas), no se obtuvo expresión en las células. (H) En la tinción May-grünwald/Giemsa del cytopsin de las colonias

formadas en metilcelulosa, se pudo detallar una célula con núcleo arriñonado (el recuadro es un aumento de 40X de la misma imagen) y (I) un clusters de células (aumento 40X).

En el ratón de 3 meses se realizaron los mismos estudios de migración, proliferación, histológicos, funcionales, fenotípicos y morfológicos (ver materiales y métodos), se obtuvieron los siguientes resultados:

6.6) Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses

Para evaluar la funcionalidad de las células contenidas en los implantes de 3 meses, se tomaron muestras que fueron colocadas y cultivadas como explantes en una placa de cultivo, siguiendo los pasos de materiales y métodos. Observaciones microscópicas evidenciaron la presencia de células de tipo fibroblastoide alrededor de las MC a partir de las 48 horas de cultivo (Figura 14A). Se observó que se mantuvo la proliferación de células a los 15 días de cultivo (Figura 14B), además se realizaron dos pases de células con los que se evidenció que la proliferación celular se mantenía a 5 y 7 días (figura 14C-D).

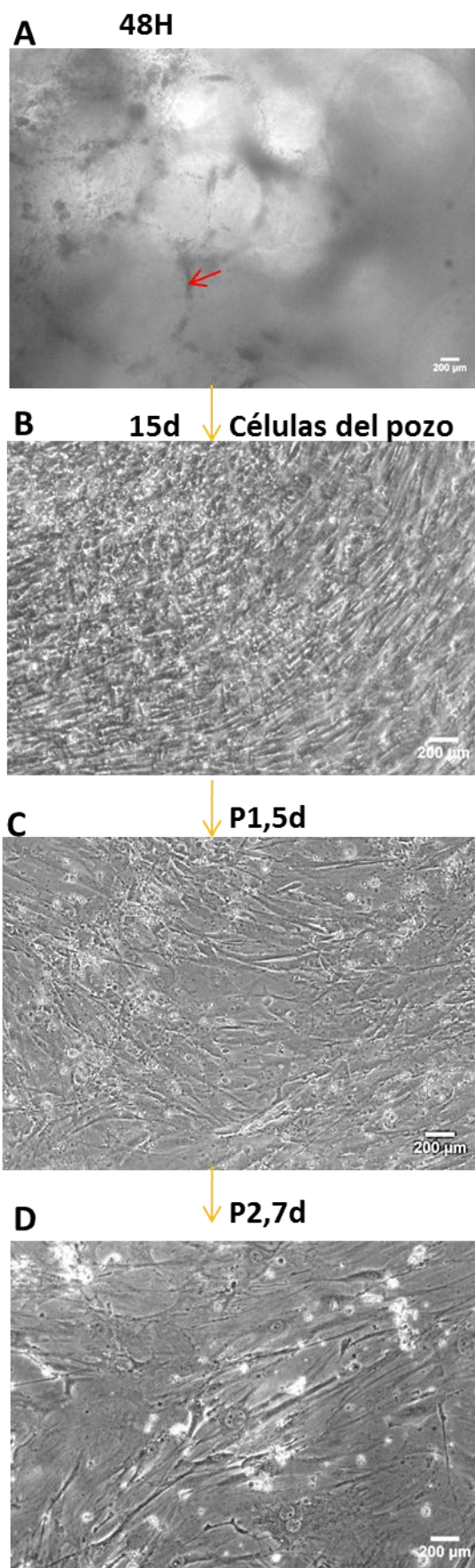


Figura 14. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses. (A) Transcurridas 48 Horas de cultivo se observaron células tipo fibroblastoide (flecha roja) alrededor de las MC (aumento 10X) y (B) a los 15 días de cultivo, se pudo apreciar células tipo fibroblastoide confluentes (aumento 10X). (C) Se realizó un primer pase celular, en el que a los 5 días de cultivo se detallaron células tipo fibroblastoide confluentes (aumento 10X). (D) Al realizar un segundo pase celular, se pudo observar que transcurridos 7 días de cultivo las células tipo fibroblastoide se mantenían confluentes (aumento 10X).

6.7) Caracterización mediante citometría de flujo de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses

Para evaluar los tipos celulares en los implantes, se tomaron muestras de estos digeridos con colagenasa (figura 15A) y se analizaron por citometría de flujo (figura 15B) (ver materiales y métodos). En las figuras 15C y 15D, se muestra la presencia de células Sca-1⁺ y C-kit⁺, además de células co-expresando ambos marcadores (figura 15E), por lo que podría tratarse de CMH contenidas en el implante después de 3 meses de implante. También, se determinó la presencia de granulocitos (células Gr-1⁺) y CEM humanas (células CD90⁺) en la muestra analizada (figura 15F-G).

Las células adherentes provenientes del explante (figura 16A) fueron caracterizadas por citometría de flujo. En el gráfico dot plot se establecieron 2 regiones (R2, R3) según los tipos celulares que se esperan encontrar (figura 16B). En la figura 16C, se muestra la presencia de CEM de ratón (células Sca-1⁺) y CEM humanas (células CD105⁺, CD73⁺ y CD90⁺) (figura 16D-F) en la región R2, resultados similares se obtuvieron al analizar la región R3.

Por último, se analizaron las células adherentes que procedían del primer pase celular del explante (figura 17A) mediante citometría de flujo (figura 17B). Se observó nuevamente la presencia de CEM de ratón (células Sca-1⁺) (figura 17C) y CEM humanas (células CD105⁺ y CD90⁺) (figura 17D-E).

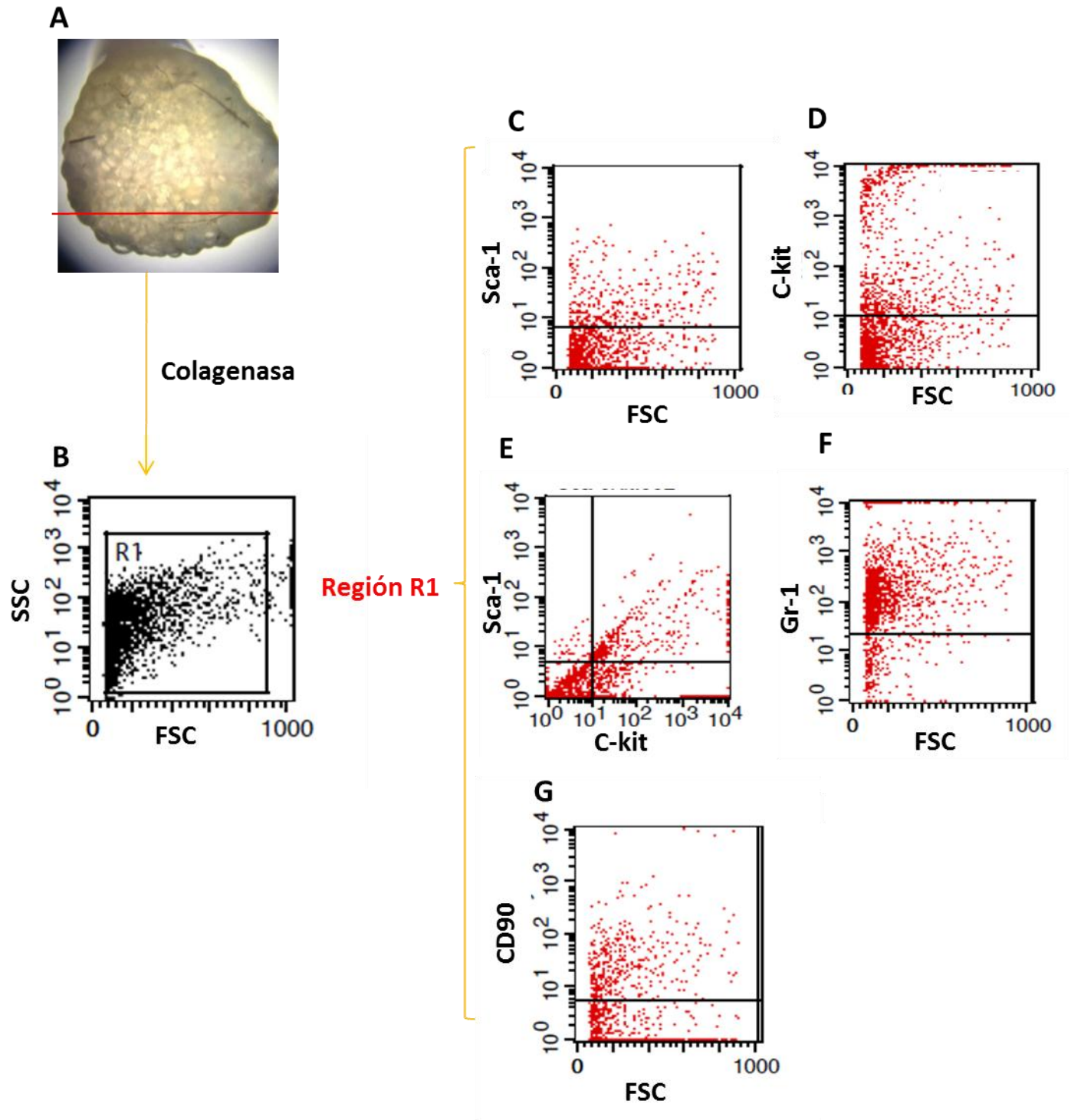


Figura 15. Caracterización de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses mediante citometría de flujo. (A) Muestra de implante digerida con collagenasa (la línea roja representa el corte que se realiza al implante), que fue analizada por citometría de flujo y cuyo (B) gráfico dot plot muestra a las poblaciones celulares provenientes del implante, distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC). (C) Se observó la presencia de células Sca-1⁺ y (D) C-kit⁺ en la región R1. (E) Además, se pudo apreciar la co-expresión de ambos marcadores Sca-1 y C-kit en las células analizadas. (F) Se observó la presencia de granulocitos (células Gr-1⁺) y (G) CEM humanas (células CD90⁺) en la región R1

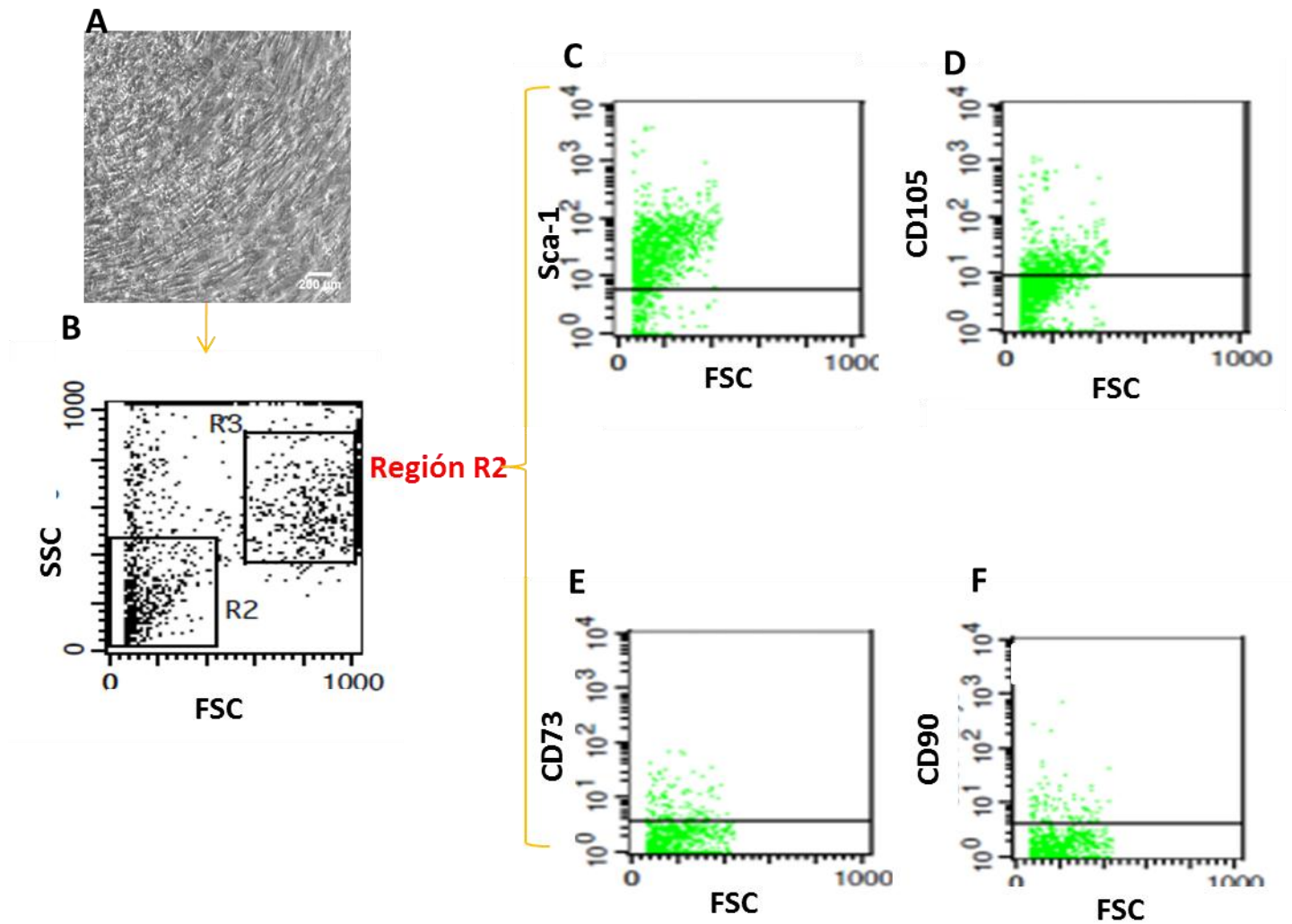


Figura 16 Caracterización de células adherentes provenientes de explantes mediante citometría de flujo. (A) Células adherentes del explante fueron analizadas por citometría de flujo y cuyo (B) gráfico dot plot muestra a las poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC), en el mismo se establecieron 2 regiones (R2, R3) según los tipos celulares que se esperan encontrar en estas regiones. (C) Se observó la presencia de CEM de ratón (células Sca-1⁺) y (D-F) CEM humanas (células CD105⁺, CD73⁺ y CD90⁺) en la región R2.

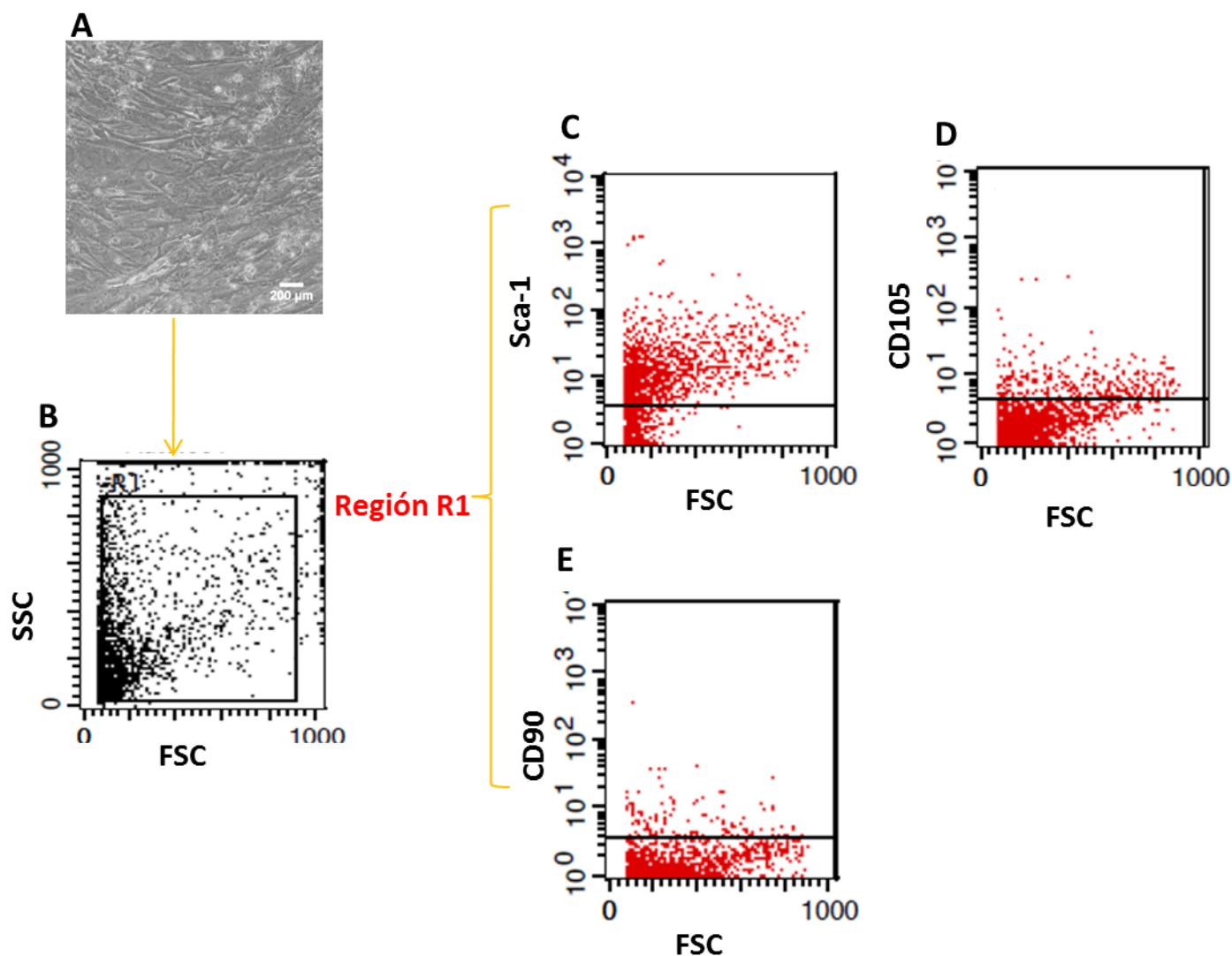


Figura 17. Caracterización de células adherentes provenientes del primer pase celular de explantes mediante citometría de flujo. (A) Células adherentes del primer pase celular del explante fueron analizadas por citometría de flujo y cuyo (B) gráfico dot plot muestra a las poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Se estableció una región R1 para analizar a las células de interés. (C) Se observó la presencia de células Sca-1⁺ y (D-E) CEM humanas (células CD105⁺ y CD90⁺) en la región R1.

6.8) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes

(CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses

Con la finalidad de confirmar la presencia de CMH y observar las características morfológicas de las células provenientes de los implantes de 3 meses (figura 18A), se realizó cytopspin (frotis en portaobjeto) y tinción May-grünwald/Giemsa en estas células (ver materiales y métodos). Análisis microscópicos evidenciaron la presencia de células

de núcleo circular, como se aprecia en la figura 18B. La capacidad de formación de colonias hematopoyéticas de las células provenientes de los implantes de 3 meses fue evaluada en un medio semisólido (metilcelulosa) suplementado con citoquinas hematopoyéticas. A los 8 días de cultivo se observó la formación de colonias (figura 18C). La morfología de las células provenientes de las colonias fue evaluada mediante tinción May-Grünwald/Giemsa, observándose clusters de células, tal como muestra la figura 18D.

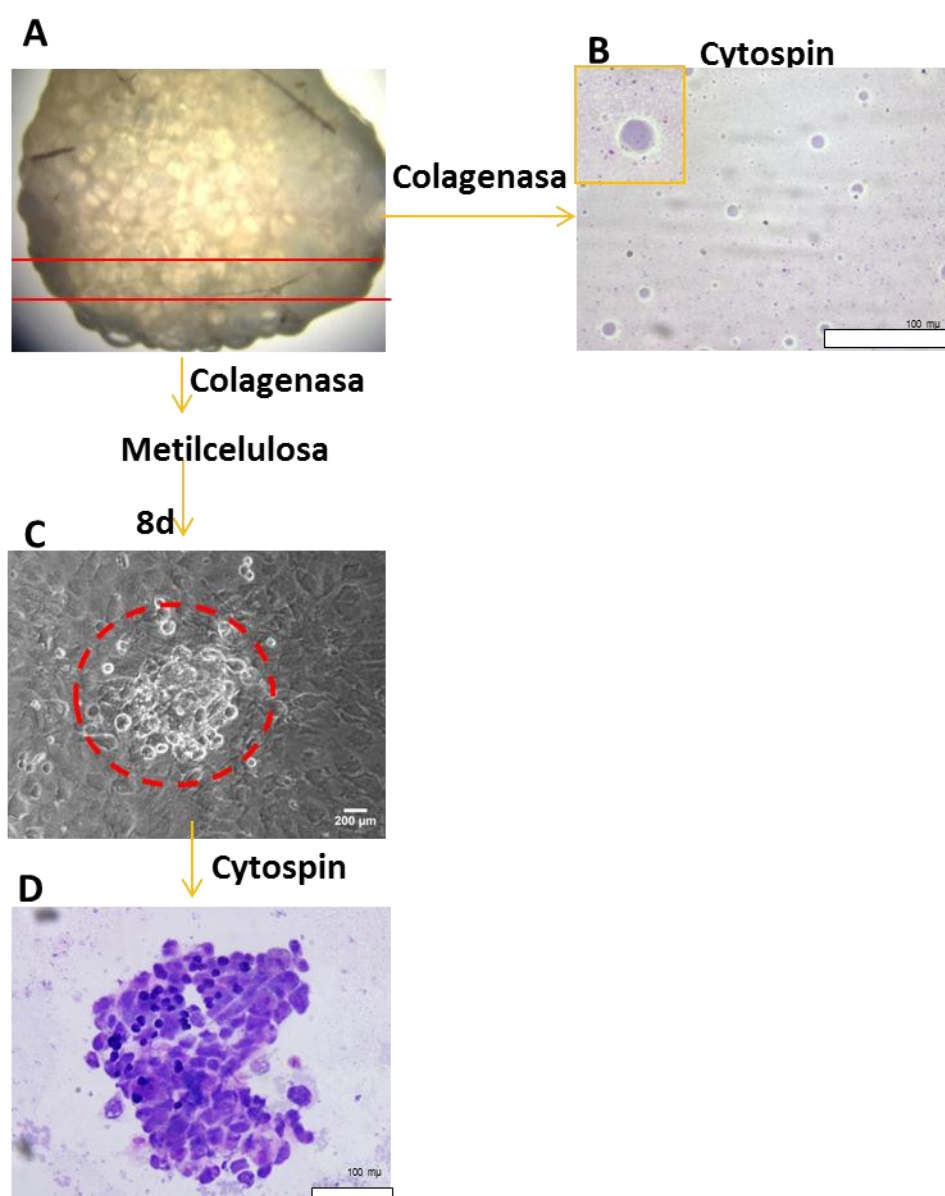


Figura 18. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH/CEM/MC/PRP) de 3 meses. (A) Muestra de implante que fue digerida con la enzima colagenasa (la línea roja representa el corte que se realiza al implante) para los estudios funcionales y morfológicos en metilcelulosa y cytopsin (frotis en portaobjetos) con tinción May-grünwald/Giemsa respectivamente. (B) Las células provenientes del implante presentaron una morfología de núcleo circular (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 40X) y (C) fueron capaces de formar colonias después de 8 días de cultivo en metilcelulosa (aumento 10X). (D) Además, se realizó un cytopsin y tinción May-grünwald/Giemsa de las colonias formadas en metilcelulosa, donde se observó un clusters de células (aumento 20X).

6.9) Análisis de modelo 3D hematopoyético mediante citometría de flujo y microscopía confocal

Se realizó tinción de las CMH de la MO de ratón (figura 19A) con PKH Red, siguiendo los pasos descritos en materiales y métodos. Para evaluar la tinción sobre las CMH, se analizaron las muestras mediante citometría de flujo (figura 19B). Simultáneamente, se preparó el modelo 3D (descrito previamente) usando cada una de estas poblaciones celulares teñidas con PKH. De tal manera que el complejo 3D quedó constituido como un coágulo que contenía CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP (ver materiales y métodos). La fluorescencia de CMH y CEM en el complejo CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP fue evaluada mediante microscopia confocal. Para el análisis citométrico se estableció una región R2, donde se localizan las CMH, de manera de detectar las células marcadas con PKH (CMH-PKH^R). Es importante resaltar que en esta región están contenidas tanto las CMH como los linfocitos. En el análisis citométrico de la figura 19C, se puede observar que las células son coloreadas con PKH red. Por otro lado, las CEM humanas fueron teñidas con PKH green (CEM-PKH^G) (figura 19D) (ver materiales y métodos). Mediante los estudios de citometría (figura 19E) se determinó que las CEM eran coloreadas por PKH green (figura 19F).

Muestras de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G fueron combinadas (figura 19G) para evaluar la detección de las dos poblaciones en suspensiones celulares que contenían los dos tipos de células. Mediante estudios de citometría (figura 19H), se observó la presencia de CMH y MSC, cada una con su coloración respectiva (CMH-PKH^R y CEM-PKH^G) (figura 19I-J)

Las muestras de CMH-PKH^R, CEM-PKH^G, MC (figura 20A). Mediante estudios de microscopía confocal del coágulo que contenía CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP se confirmó la detección de cada población celular mediante la correspondiente fluorescencia. Así, se aprecia células redondas teñidas de rojo y MC demarcadas por células alargadas de coloración verde adheridas a las MC (figura 20 B). Similares resultados se observaron en coágulos de CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP mantenidos durante 1 día y 7 días de cultivo (figura 20C-D).

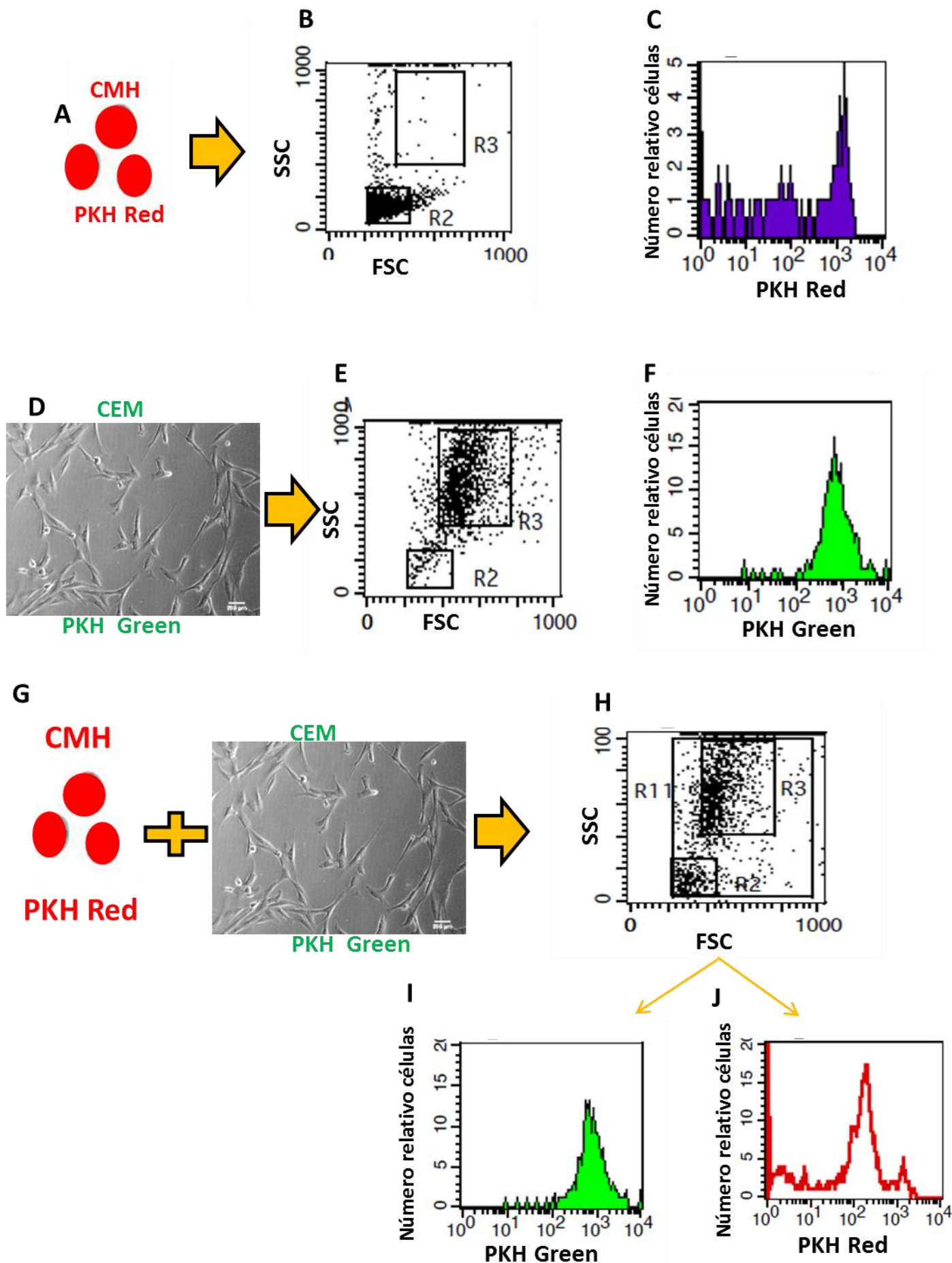


Figura 19. Cultivo, caracterización de CMH de MO de ratón y CEM humanas mediante citometría de flujo.

(A) Las CMH aisladas de la MO de ratón y teñidas con PKH Red fueron analizadas por citometría de flujo, (B) cuyo gráfico dot plot muestra a las poblaciones celulares distribuidas con base en su tamaño (FSC) y granularidad (SSC). Se analizó la región R2 donde se ubican las CMH-PKH^R. (C) En el histograma morado se observa el marcaje de PKH red sobre las CMH-PKH^R en la región R2, por lo que se realizó una correcta tinción sobre las CMH. (D) Se analizaron CEM humanas teñidas con PKH green en la (E) región R3 donde se ubican las CEM-PKH^G. (F) En el histograma verde se observa el marcaje de PKH green sobre las CEM-PKH^G en la región R3, por lo que se realizó una correcta tinción sobre las CEM. (G) Muestras de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G fueron combinadas, (H) cuyo gráfico dot plot muestra a las CEM-PKH^G ocupando una región citométricamente clara (R3) y distinta respecto a las CMH-PKH^R que ocupan otra región (R2). Al analizar cada una de estas poblaciones celulares, se observa el (H) marcaje de PKH green sobre las CEM-PKH^G y (I) PKH red sobre las CMH-PKH^R en las regiones R3y R2 respectivamente

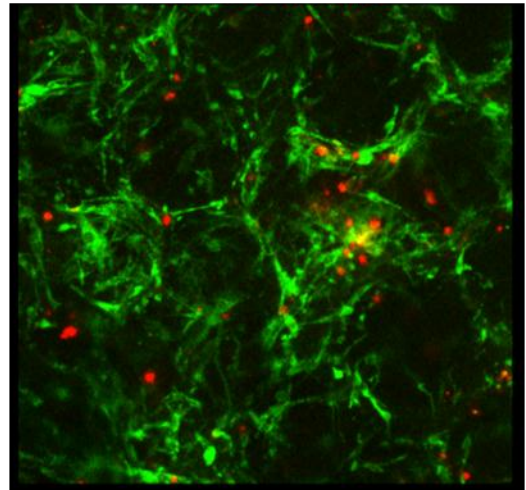
A **CEM** + **CMH** + MC



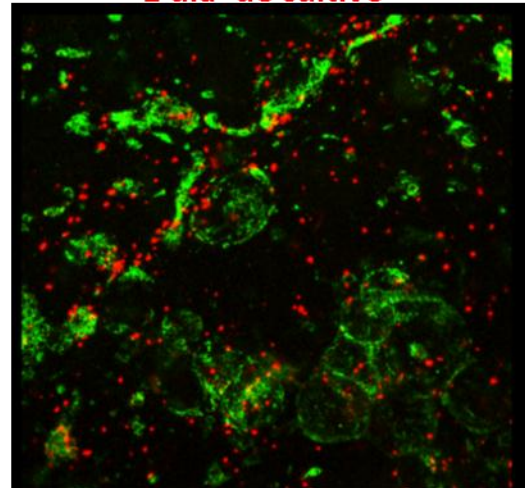
PRP

→ Confocal

B **Inicio de cultivo**



C **1 día de cultivo**



D **7 días de cultivo**

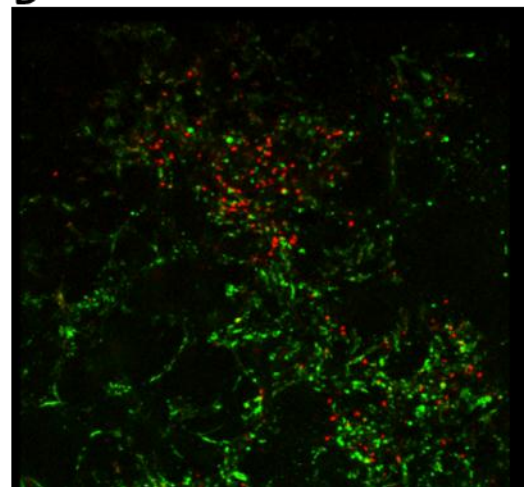


Figura 20. Evaluación de modelo 3D hematopoyético (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP mediante microscopía confocal. (A) Muestra del cultivo de CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC al cual se le adicionó PRP y la mezcla calcio-trombina para formar el modelo 3D hematopoyético. (B) Modelo 3D hematopoyético al inicio del cultivo y visualizado por microscopia confocal, se pudo detallar las células redondas teñidas de rojo y células alargadas de tinción verde que demarcan a las MC. (C) Modelo 3D hematopoyético después 1 día de cultivo, se pudo detallar nuevamente las células redondas teñidas de rojo y células alargadas de tinción verde que demarcan a las MC. (D) En el caso del modelo 3D hematopoyético después de 7 días de cultivo, se pudo observar una agrupación de células redondas teñidas de rojo y células alargadas de tinción verde que demarcan a las MC

6.10) Modelo 3D hematopoyético (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) después de 7, 15 y 30 días de implante.

Las CMH-PKH^R de ratón y las CEM-PKH^G humanas, fueron empleadas en conjunto a MC y PRP para la generación de un modelo 3D hematopoyético, el cual fue implantado en ratones durante 7, 15 y 30 días (ver materiales y métodos). Transcurridos estos tiempos, se sacrificaron los ratones y se les extrajeron los implantes (ver materiales y métodos).

En el caso de ratones de 7 días, se observó la presencia de angiogénesis alrededor del implante (figura 21A-B). Además, se aprecian agregados de color blanquecino, tal como se muestra en la figura 21C. De manera similar, en implantes de 15 (figura 21D-E) y 30 días (figura 21F-H) se evidenció angiogénesis alrededor del implante. Muestras de estos implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) fueron evaluados para estudios de migración y proliferación. Adicionalmente, otros fragmentos de los implantes fueron digeridas con collagenasa para estudios funcionales, fenotípicos y morfológicos (ver materiales y métodos) de las células contenidas en estos implantes.

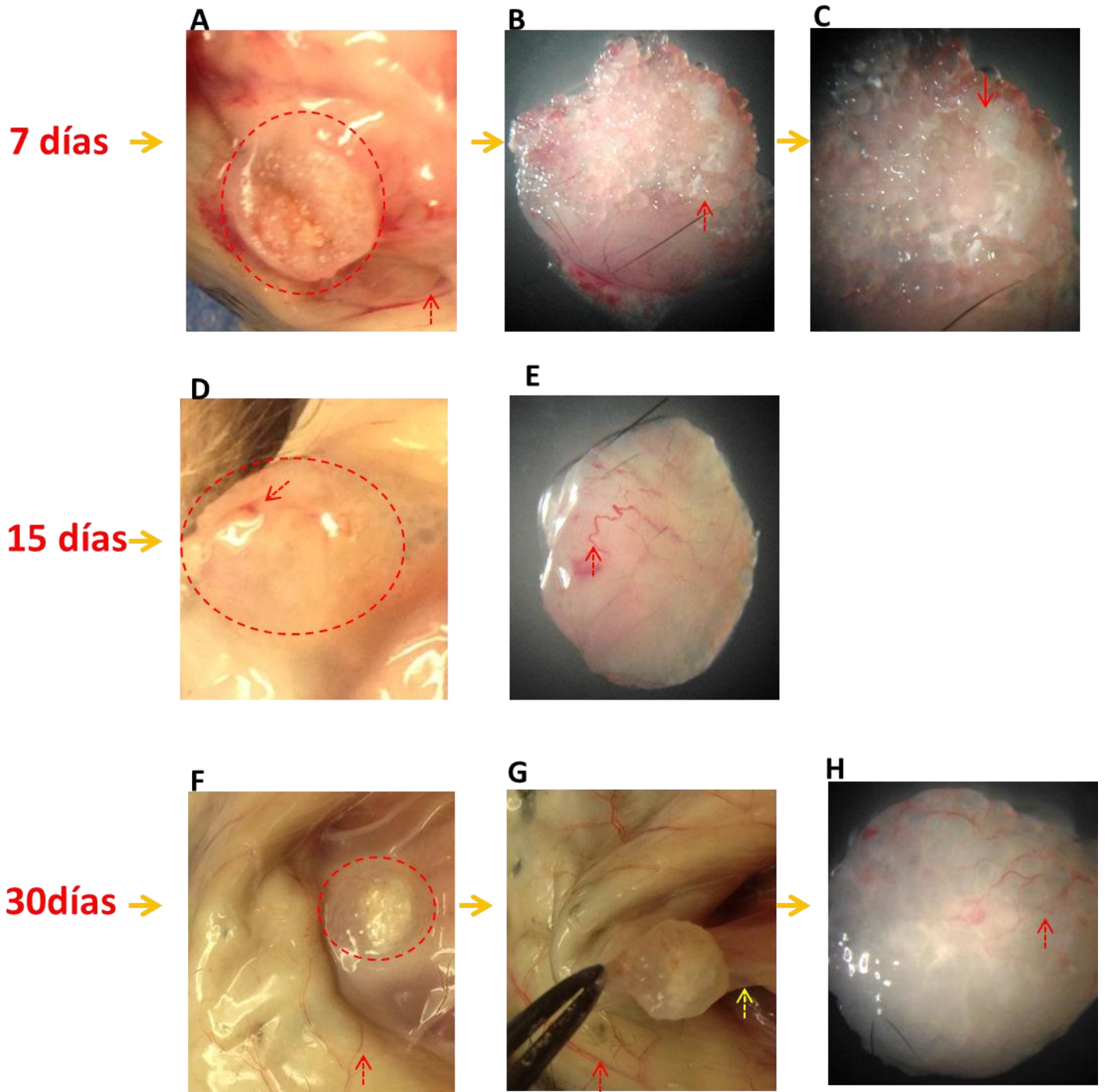


Figura 21. Extracción de los implantes (CMH-PKH^R/MC/CME-PKH^G/PRP) de 7, 15 y 30 días. (A-B) En el implante de 7 días se observaron vasos sanguíneos (flecha roja) alrededor del implante (círculo). (C) Además, se pudo apreciar agregados de color blanquecino. (D-E) En el implante de 15 días (círculo), se detalló la angiogénesis (flecha roja). (F) El implante de 30 días (círculo) se observó (F-G) integrado al tejido del ratón (flecha amarilla) y la presencia de angiogénesis a su alrededor (flechas rojas). (H) mediante microscopia se evidenció la presencia alrededor del implante (flecha rojas).

6.11) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 7 días

Para evaluar la funcionalidad de las células contenidas en los implantes de 7 días, se tomó un fragmento de este y fueron cultivados como explantes en una placa de cultivo. Observaciones microscópicas evidenciaron la presencia de células redondas y otras de tipo fibroblastoide a partir de los 2 días de cultivo (figura 22A). Una mayor migración y proliferación de células se observó a partir de los 5 días de cultivo (figura 22B). La proliferación celular se mantuvo durante 15 días después de retirar el explante (figura 22C).

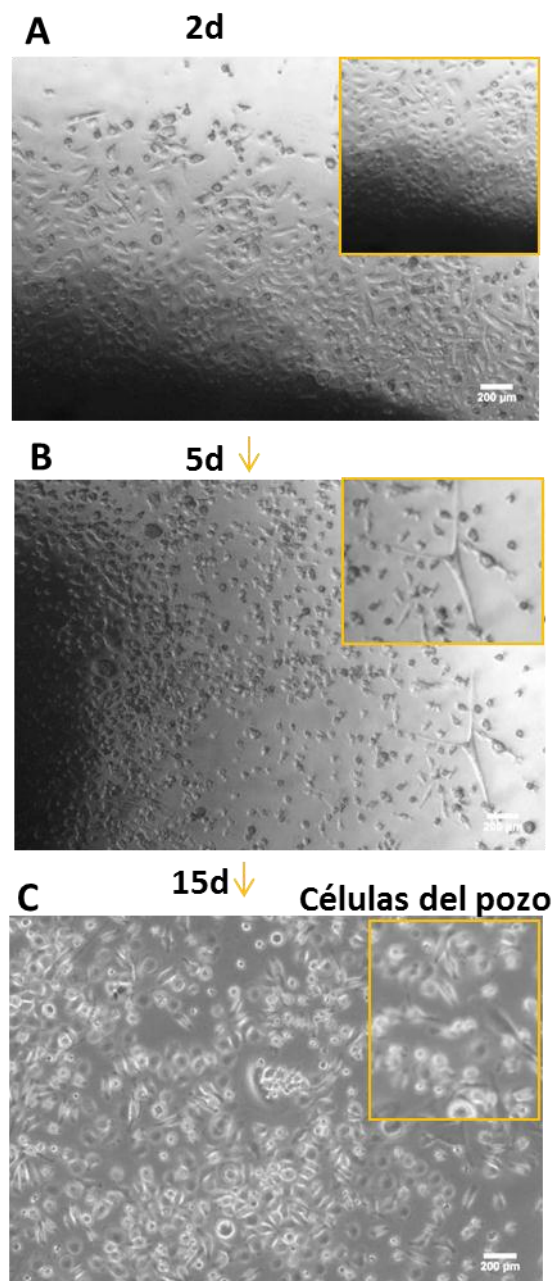


Figura 22. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 7 días. (A) transcurridos 2 días de cultivo, se observaron células redondas migrando (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X) y (B) a los 5 días de cultivo, se pudo apreciar una mayor proliferación de células redondas migrando y células tipo fibroblastoide (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X). (C) Las células redondas y fibroblastoide mantuvieron su proliferación en el cultivo, sin explante, durante 15 días (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X).

6.12) Evaluación de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 7 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.

Para evaluar la presencia de CMH-PKH^R de ratón y CEM-PKH^G humanas en los implantes de 7 días, muestras de los implantes (figura 23A) fueron digeridas con colagenasa. Posteriormente, las células obtenidas fueron analizadas por citometría de flujo (figura 26B) (ver materiales y métodos), detectándose marcaje de PKH green y PKH red en las células provenientes del implante (figura 23C-D). La presencia de estas células fue confirmada en fragmentos del implante mediante microscopía confocal (ver materiales y métodos), se observaron células redondas teñidas de rojo (CMH-PKH^R) y células alargadas verdes (CEM-PKH^G) alrededor de las MC (figura 23E)

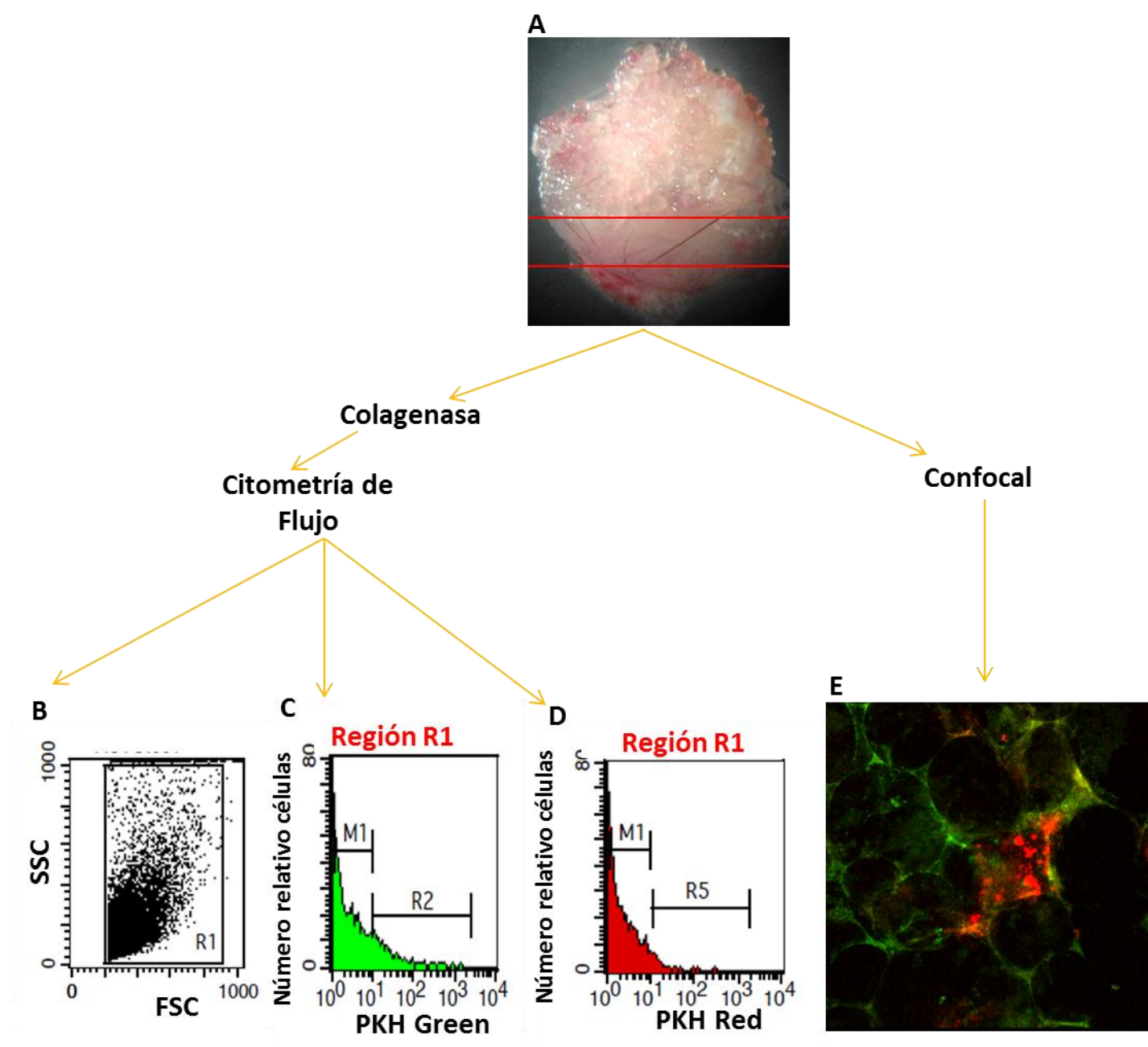


Figura 23. Análisis de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 7 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo. (A) Muestra de implante (las líneas rojas representan los cortes que se realizan al implante) empleada para ser visualizado un segmento por microscopia confocal y otro digerido con la enzima colagenasa para análisis de citometría de flujo. (B) En el análisis citométrico se muestra el gráfico dot plot con poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC), en el mismo se estableció una región (R1) donde se esperan encontrar las CMH-PKH^R y las CEM-PKH^G. (C-D) Se detectó fluorescencia de PKH en las células provenientes del implante, pero no es posible distinguir ambas poblaciones por separado. (E) En la muestra visualizada en microscopía confocal, se pudo detallar un cluster de células redondas teñidas de rojo y células alargadas verdes rodeando a las MC.

6.13) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes

(CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 7 días

Con la finalidad de confirmar la presencia de CMH y observar las características morfológicas de las células proveniente de los implantes de 7 días (figura 24A), se realizó cytopspin (frotis en portaobjeto) y tinción May-grünwald/Giemsa de estas células (ver materiales y métodos). Análisis microscópicos evidenciaron la presencia de células de linaje mieloide (neutrófilos) y monocitos de ratón, tal como se muestra en las figuras 24B-C. La capacidad de formación de colonias hematopoyéticas de las células provenientes de los implantes de 7 días, fue evaluada en un medio semisólido (metilcelulosa) suplementado con citoquinas hematopoyéticas. A los 8 días de cultivo, no se observó formación de colonias (figura 24D). Similares resultados se obtuvieron en implantes 15 días.

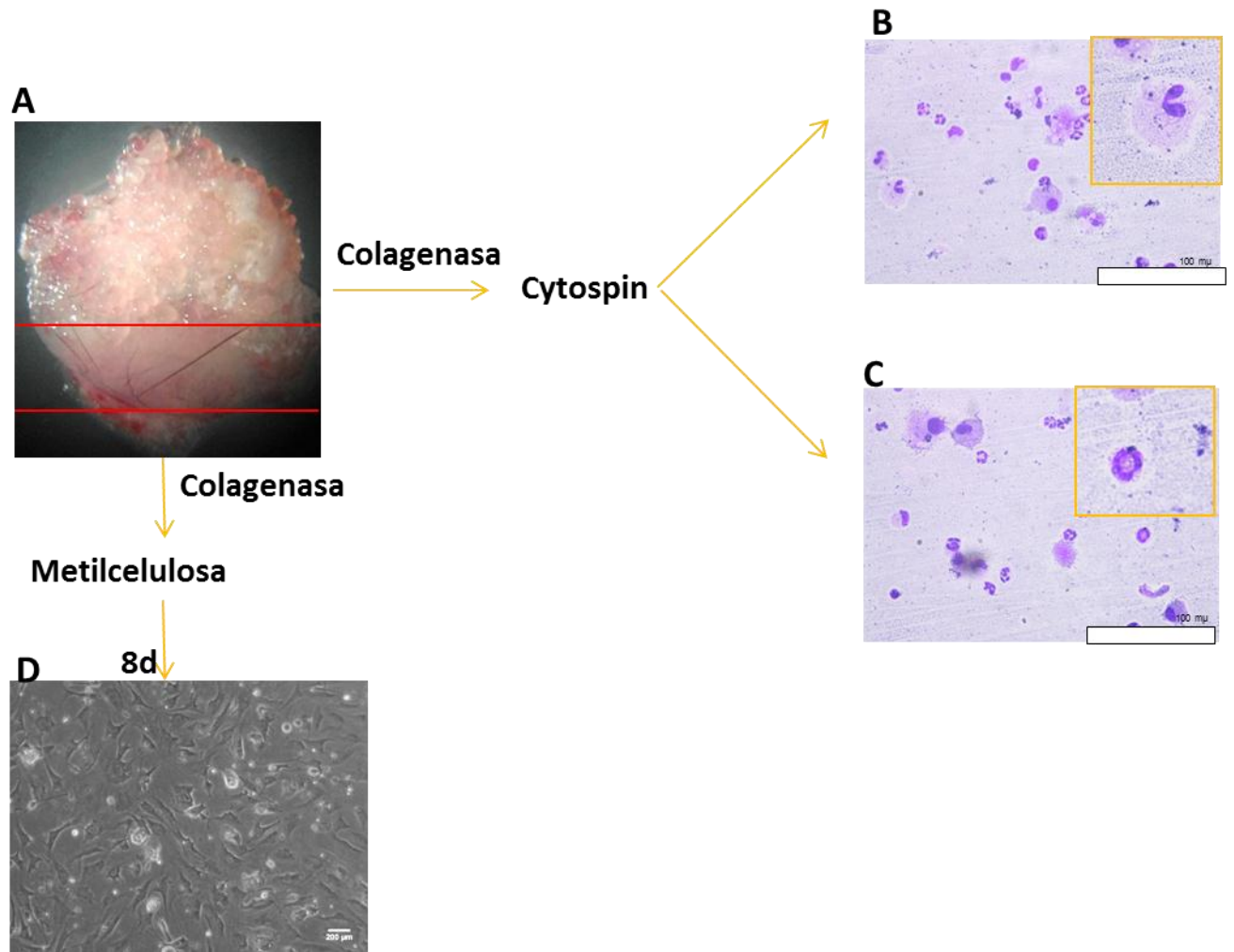


Figura 24. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 7 días. (A) Muestra de implante (las líneas rojas representan los cortes que se realizan al implante) que fue digerida con la enzima colagenasa para los estudios funcionales y morfológicos en metilcelulosa y cytopspin (frotis en portaobjeto) con tinción May-grünwald/Giemsa respectivamente. (B) En la tinción May-grünwald/Giemsa del cytopspin de las células provenientes del implante, se observaron células de linaje mieloide, tal como neutrófilos (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 40X), (C) monocitos de ratón (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 40X). (D) No se observó formación de colonias en la metilcelulosa transcurridos 8 días de cultivo (aumento 10X).

6.14) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 15 días

Para evaluar la funcionalidad de las células contenidas en los implantes de 15 días, se tomaron muestras que fueron colocadas y cultivadas como explantes en una placa de cultivo. Observaciones microscópicas evidenciaron la presencia de células redondas a partir de 3 días de cultivo (figura 25A). Una mayor migración y proliferación de células redondas y tipo fibroblastoide se observó a partir de los 6 días de cultivo (figura 25B). La proliferación celular se mantuvo durante 10 días después de retirar el explante (figura 25C).

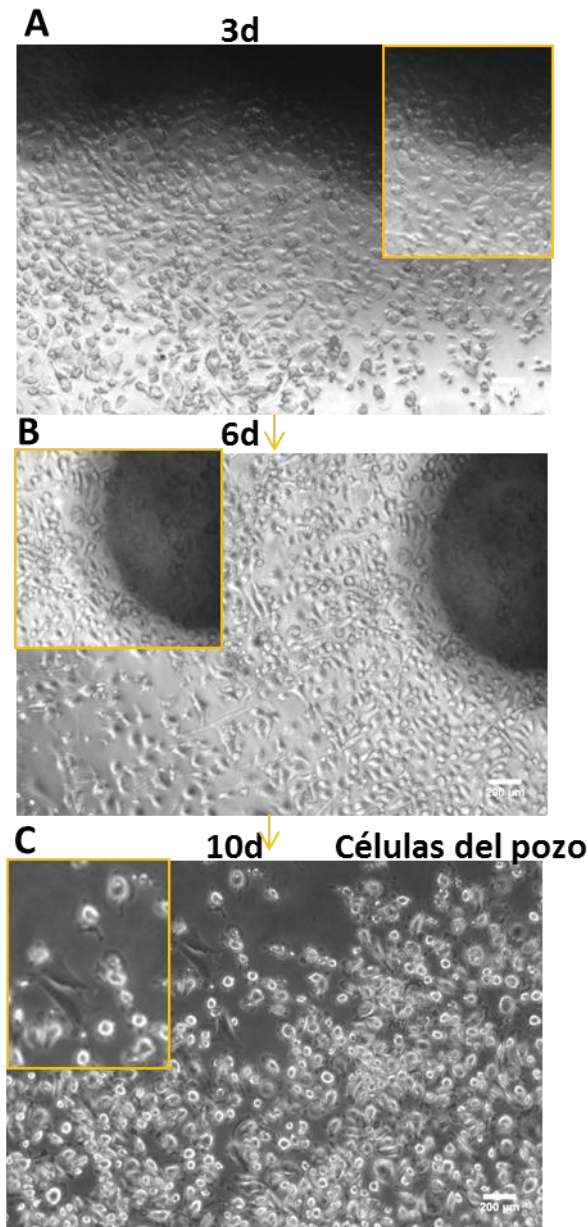


Figura 25. Evaluación de migración y proliferación de células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 15 días. (A) Transcurrido 3 días de cultivo, se observaron células redondas migrando (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X) y (B) a los 6 días de cultivo, se pudo apreciar una mayor proliferación y migración de células redondas y morfología fibroblastoide (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X). (C) Las células redondas y morfología fibroblastoide mantuvieron su proliferación en cultivo, sin explante, durante 10 días (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X).

6.15) Evaluación de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 15 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.

Para evaluar la presencia de las CMH-PKH^R de ratón y las CEM-PKH^G humanas en los implantes de 15 días, se tomaron muestras de los implantes y se visualizaron por microscopía confocal (datos no mostrados). En las muestras analizadas no se lograron detectar células teñidas con PKH. Otro segmento del implante (figura 26A) fue digerido con la enzima colagenasa, para ser analizado por citometría de flujo (figura 26B) En el análisis se detectó marcaje de PKH green y PKH red en las células provenientes del implante (figura 26C-D).

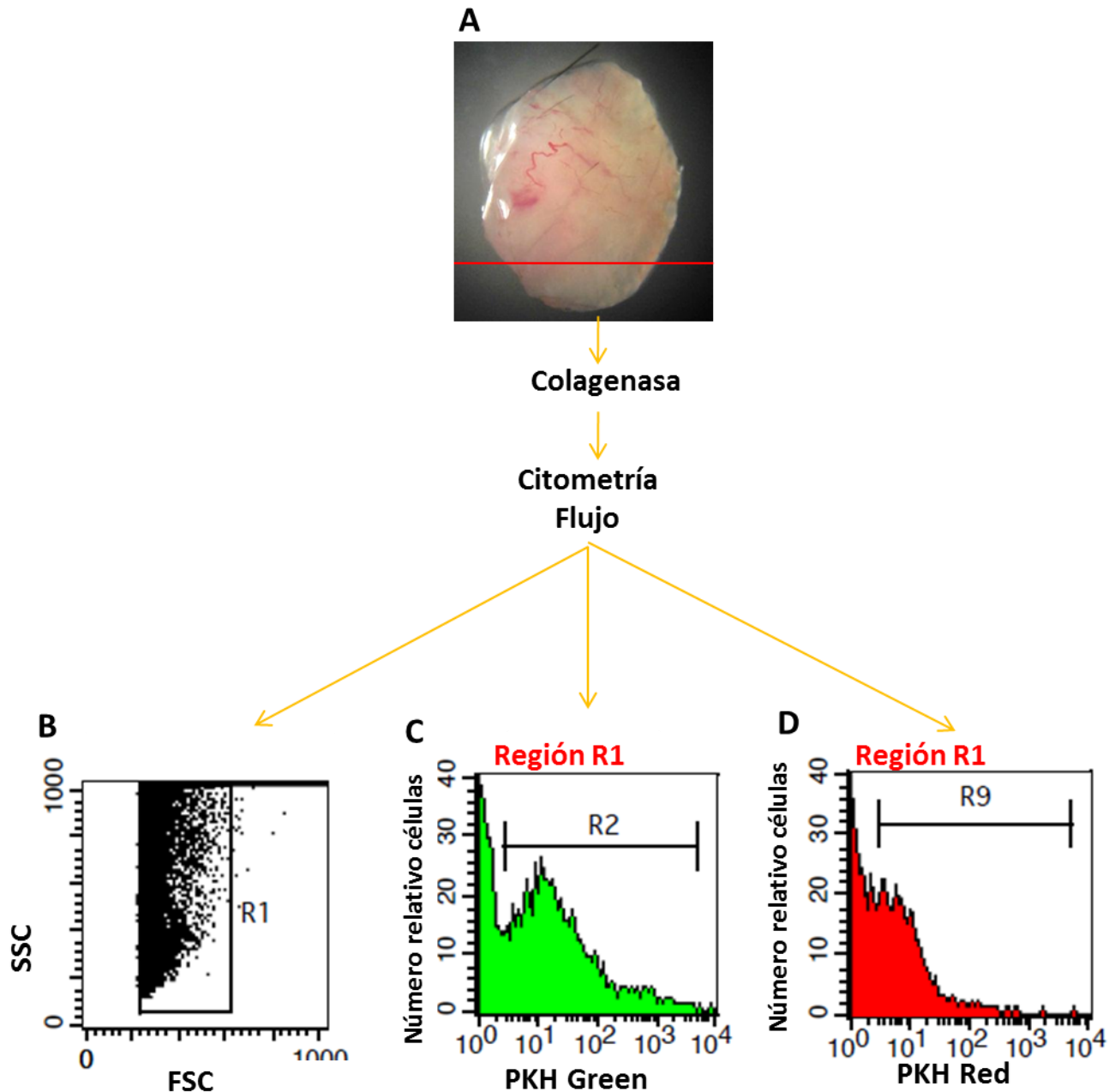


Figura 26 Análisis de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 15 días, mediante citometría de flujo. (A) Muestra de implante (la línea roja representa el corte realizado al implante) digerida con colagenasa para ser analizada por (B) citometría de flujo, cuyo gráfico dot plot muestra a las poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC), en el mismo se estableció una región (R1) donde se esperan encontrar las CMH-PKH^R y las CEM-PKH^G. (C-D) Se detectó fluorescencia de PKH en las células provenientes del implante, pero no es posible distinguir ambas poblaciones por separado.

6.16) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes

(CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 15 días

Con la finalidad de confirmar la presencia de CMH y observar las características morfológicas de las células provenientes del implante de 15 días (figura 27A), se realizó cytopspin (frotis en portaobjeto) y tinción May-grünwald/Giemsa de estas células (ver materiales y métodos). Análisis microscópicos evidenciaron la presencia de monocitos y células de linaje mieloide (figura 27B). La capacidad de formación de colonias hematopoyéticas de las células provenientes de los implantes de 15 días fue evaluada en medio semisólido (metilcelulosa) suplementado con citoquinas hematopoyéticas. A los 6 días de cultivo no se observó formación de colonias (figura 27C).

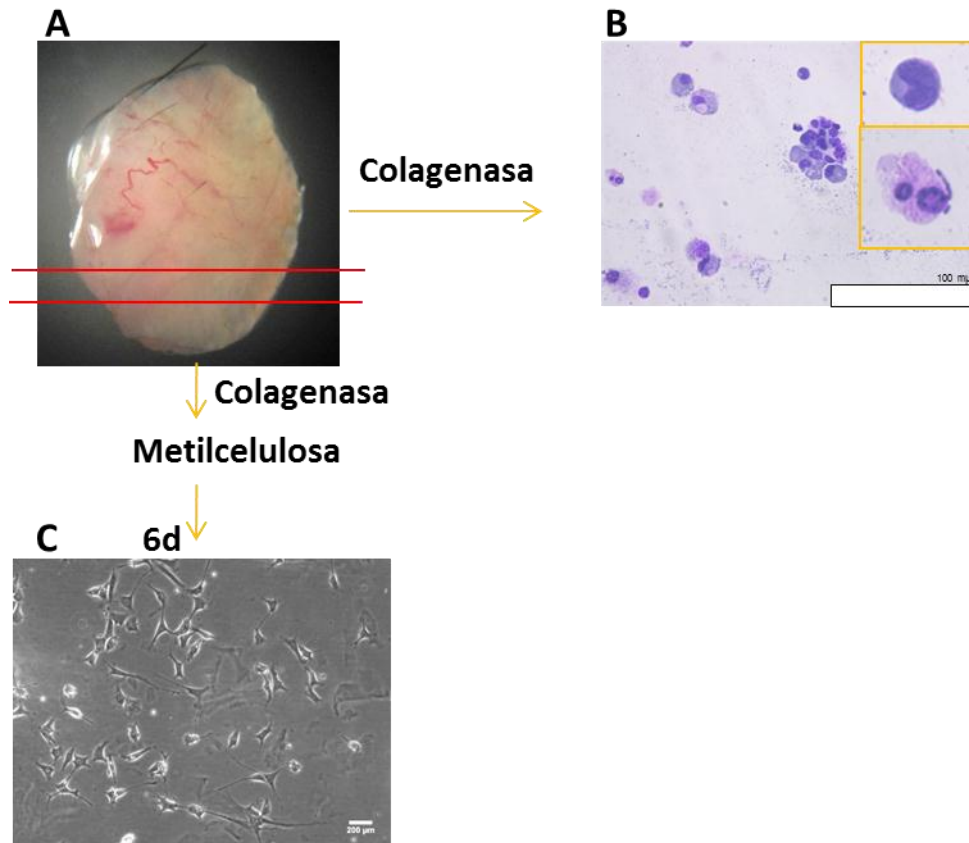


Figura 27. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 15 días. (A) Muestra de implante (las líneas rojas representan los cortes que se realizan al implante) que fue digerida con la enzima colagenasa para los estudios funcionales y morfológicos de metilcelulosa y cytopspin (frotis en portaobjetos) con tinción May-grünwald/Giemsa respectivamente. (B) En la tinción May-grünwald/Giemsa del cytopspin de las células provenientes del implante, se observaron células de linaje mieloide (imagen aumentada en el recuadro amarillo superior) (aumento 40X), monocitos de ratón (imagen aumentada en el recuadro amarillo inferior) y un cluster de células (aumento 40X). (D) Se pudo detallar células alargadas presentes en la metilcelulosa transcurridos 6 días de cultivo (aumento 10X).

6.17) Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 30 días

Para evaluar la funcionalidad de las células contenidas en los implantes de 30 días, se tomaron muestras que fueron colocadas y cultivadas como explantes en una placa de cultivo. Observaciones microscópicas evidenciaron la presencia de células redondas a partir de 3 días de cultivo, tal como se muestra en la figura 28A. Una mayor migración

y proliferación de células redondas y tipo fibroblastoide se observó a partir de los 9 días de cultivo (figura 28B). La proliferación celular se mantuvo durante 18 días después de retirar el explante (figura 28C).

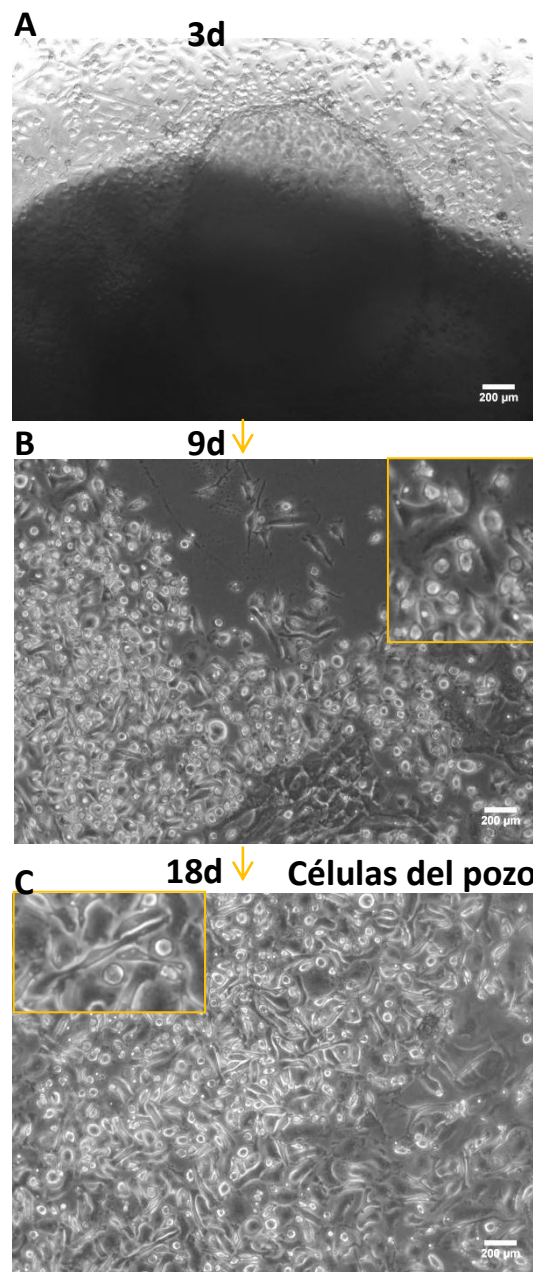


Figura 28. Evaluación de migración y proliferación de las células provenientes de implantes (CMH-^R /CEM-PKH^G /MC/PRP) de 30 días. (A) Transcurridos 3 días de cultivo, se observan células redondas migrando (aumento 10X) y (B) a los 9 días de cultivo, se aprecia una mayor proliferación y migración de células redondas y tipo fibroblastoide (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X). (C) Las células redondas y tipo fibroblastoide mantienen su proliferación en cultivo, sin explante, durante 18 días (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 10X).

6.18) Evaluación de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G provenientes de los implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 30 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo.

Para evaluar la presencia de las CMH-PKH^R de ratón y las CEM-PKH^G humanas en los implantes de 30 días, se tomaron muestras de los implantes de 30 días (figura 29A) y se digirieron con la enzima colagenasa, para ser analizado mediante citometría de flujo (figura 29B) (ver materiales y métodos). En el análisis citométrico se detectó fluorescencia de PKH red y PKH green, en las células provenientes de los implantes (figura 29C-D). Otro segmento del implanto se visualizó por microscopía confocal (ver materiales y métodos). Se pudo observar células redondas y células tipo fibroblastoide sin teñir (figura 29E).

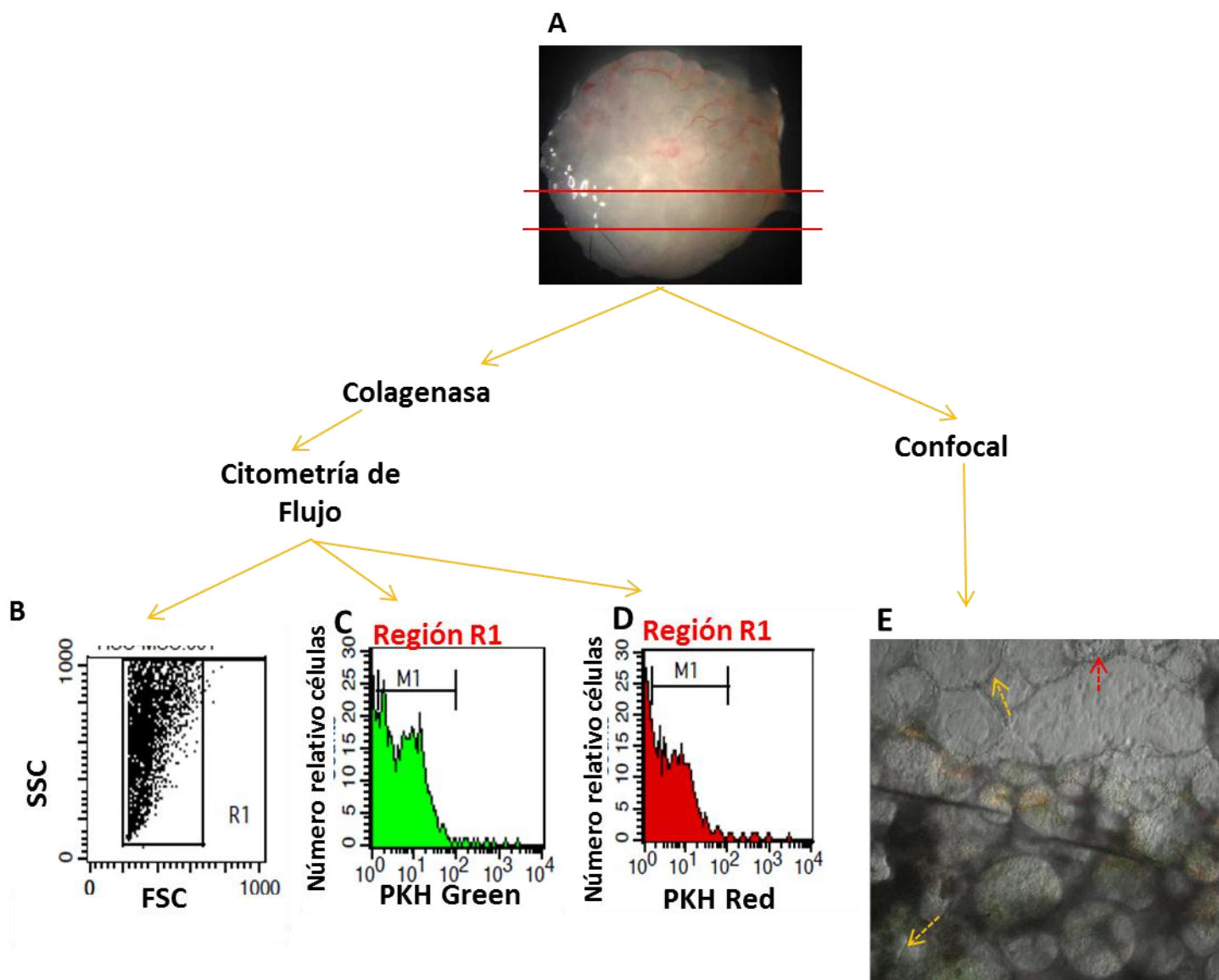


Figura 29. Análisis de CMH-PKH^R y CEM-PKH^G provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 30 días, mediante microscopia confocal y citometría de flujo. (A) Muestra de implante (las líneas rojas representan los cortes realizados al implante) empleada para ser visualizado un segmento por microscopia confocal y otro digerido con colagenasa para análisis de citometría de flujo. (B) En el análisis citométrico se muestra el gráfico dot plot con poblaciones celulares distribuidas con base en tamaño (FSC) y granularidad (SSC), en el mismo se estableció una región (R1) donde se esperan encontrar las CMH-PKH^R y las CEM-PKH^G. (C-D) Se detectó fluorescencia de PKH en las células provenientes del implante, pero no es posible distinguir ambas poblaciones por separado. (E) En la muestra visualizada por microscopía confocal se pudo detallar células redondas (flecha roja) y células tipo fibroblastoide sin teñir rodeando a las MC (flechas amarillas).

6.19) Evaluación funcional y morfológica de células provenientes del implante (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 30 días

Con la finalidad de confirmar la presencia de CMH y observar las características morfológicas de las células provenientes del implante (figura 30A), se realizó cytopspin (frotis en portaobjeto) y tinción May-grünwald/Giemsa de estas células (ver materiales y métodos). Análisis microscópicos evidenciaron células con características de linaje mielopoyético (neutrófilos) y monocitos de ratón, tal como se muestra en la figuras 30B, 30C y 30D. La capacidad de formación de colonias hematopoyéticas de las células provenientes de los implantes fue evaluada en un medio semisólido (metilcelulosa) suplementado con citoquinas hematopoyéticas. A los 8 días de cultivo se observó formación de colonias de aspecto megacariocítico, como se muestra en la figura 30E. La morfología de las células provenientes de las colonias fue evaluada mediante tinción May-Grünwald/Giemsa, se observaron células de aspecto hematopoyético (figura 30F).

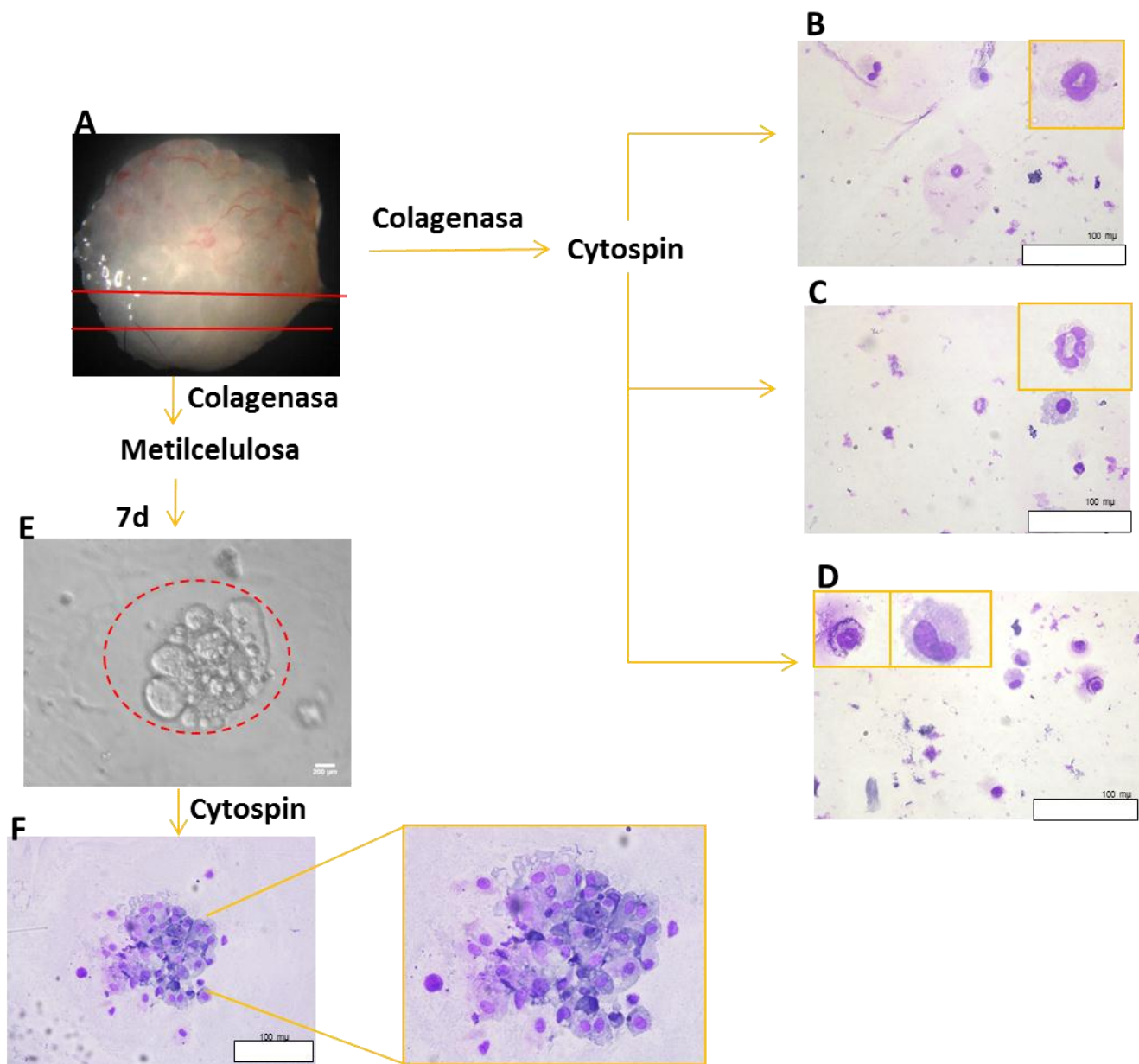


Figura 30. Evaluación funcional y morfológica de células provenientes de implantes (CMH-PKH^R/CEM-PKH^G/MC/PRP) de 30 días. (A) Muestra de implante (las líneas rojas representan los cortes que se realizan al implante) que fue digerida con la enzima colagenasa para los estudios funcionales y morfológicos de metilcelulosa y cytopspin (frotis en portaobjetos) con tinción May-grünwald/Giemsa respectivamente. (B) En la tinción May-grünwald/Giemsa del cytopspin de las células provenientes del implante, se observan neutrófilos (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 40X), (C) monocitos de ratón (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 40X) y (D) células de núcleo arriñonado (imágenes aumentadas en los recuadros amarillos) (aumento 40 X). (E) Se pudo apreciar la formación de una colonia de aspecto megacariocítico en la metilcelulosa transcurridos 8 días de cultivo (aumento 10X). (F) En la tinción May-grünwald/Giemsa del cytopspin de las células provenientes de las colonias de aspecto megacariocítico, se pudo detallar células de aspecto hematopoyético (imagen aumentada en el recuadro amarillo) (aumento 20X).

7) Discusión de resultados

Es bien conocido que en la MO las CMH se encuentran en un microambiente hematopoyético constituido por diversos componentes (citoquinas, proteínas de matriz extracelular, osteoblastos, células endoteliales, CEM, etc.) que regulan su proliferación, diferenciación y autorenovación. En el presente trabajo de investigación, desarrollamos un modelo 3D, constituido por coágulos de PRP en el cual estaban incluidas CMH aisladas de ratón, CEM humanas y MC.

Nuestros resultados muestran que en este sistema 3D, las CMH se adhieren a las CEM unidas a las MC. Esta distribución de células y proteína de matriz asemeja al nicho hematopoyético *in vivo*, donde las CMH están en contacto íntimo con las CEM, y ambos tipos celulares en relación estrecha con el colágeno (Leisten y col, 2012). Recientemente se ha reportado que el colágeno es un excelente soporte para las CEM, lo cual permite que estas células mantengan sus propiedades funcionales. (Wittig y col., 2016).

Los resultados *in vitro* e *in vivo*, obtenidos de nuestro modelo muestra que las MC tienen la capacidad de ser un excelente soporte para la adhesión de las CEM. En contraste, otros modelos 3D de MO requirieron tratar al andamiaje previamente para favorecer la adhesión celular (Nichols y col, 2009). Adicionalmente, en nuestro modelo, las CMH/CEM/MC fueron incluidos en un coágulo de PRP, el cual le confiere al microambiente una estructura tridimensional similar a las condiciones *in vivo*. Para

nuestro conocimiento, es la primera vez que se demuestra el empleo de PRP, junto a CEM, CMH y MC, para la generación de un microambiente tridimensional de MO.

Con respecto a estudios anteriores de modelos 3D de MO, se han empleado distintos tipos de andamiajes (hidroxiapatita, colágeno, cristales de coloides, entre otros) y células (células endoteliales, CEM, células de tejido adiposo), con la finalidad de proveerle soporte un biológico las CMH y a su vez mantener su capacidad de diferenciación y autorenovación. Los modelos de MO constituidos por andamiajes de hidroxiapatita, CEM y CMH han tenido éxito en mantener algunas poblaciones celulares indiferenciadas, capaces de proliferar, migrar y de diferenciarse en varios tipos celulares (Fujita y col., 2010; Di Maggio y col., 2011).

Un modelo que presentó una gran similitud con el nuestro fue el desarrollado por Leisten y colaboradores (Leisten y col., 2012). En este trabajo utilizaron CEM, CMH y colágeno tipo I para la generación de una MO, con el cual lograron obtener la proliferación, migración, alta viabilidad de las CMH y el mantenimiento de una población indiferenciada. Sin embargo, en este reporte no se realizaron ensayos de funcionalidad de las células de su capacidad de formación de colonias. En nuestro trabajo mostramos que las CMH implantadas en ratones como parte del complejo CEM-MC-PRP mantienen su capacidad de formar colonias hematopoyéticas.

En nuestro trabajo mostramos que los implantes de CMH/CEM/MC/PRP no fueron rechazados, a pesar de que estaban presentes CEM humanas, apoyando estos resultados

datos previos sobre la seguridad de emplear CEM en trasplantes alogénicos (Ryan y col., 2005). De manera importante podemos resaltar la formación de angiogénesis alrededor de los implantes colocados en ratones. Resultados similares han sido reportados usando modelos de MO con CEM y andamiajes de hidroxiapatita. (Fujita y col., 2010; Ueda y col., 2014). La angiogénesis en los implantes de CMH/CEM/MC/PRP puede explicarse por factores angiogénicos secretados por las CEM, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas en inglés) (Wu y col., 2007). Estos vasos pueden contribuir a la invasión de células del receptor al implante o a la salida de células desde el implante hacia el receptor. Esto último podría tener un beneficio en casos de reconstitución de MO.

Las células obtenidas de los implantes digeridos con collagenasa mostraron ser capaces de proliferar y migrar de los explantes a diferentes tiempos de cultivo. En estudios anteriores de generación de modelos MO, también se ha evidenciado la proliferación celular, pero con la diferencia con nuestro trabajo que fueron por períodos de tiempo menores a los evaluados en este trabajo (Leisten y col., 2012). Con estos resultados se muestra que nuestro sistema es capaz de soportar células, tanto hematopoyéticas como estromales, por largos periodos de tiempo, lo cual es de gran interés para su aplicación a futuro en regeneración de MO.

En el proceso de hematopoyesis, como se mencionó anteriormente, a partir de una CMH se generan todos los linajes celulares (diferenciación celular) y copias de la CMH (autorenovación) (Di Maggio y col., 2011). Dicho proceso es evidenciado en nuestro modelo 3D de MO, mediante la observación morfológica de las células provenientes de

los implantes, en los que se apreció la diferenciación de las células a linajes mieloides y linfoides. Estudios de microscopía evidenciaron la presencia de células de tipo sanguíneo en provenientes de los implantes, lo cual fue confirmado por análisis citométricos, que evidenciaron la presencia de CMH, entre las células provenientes del implante, y por su capacidad de formación de colonias en metilcelulosa. Nuestros resultados muestran que nuestro modelo 3D (CMH/CEM/MC/PRP) cumple con las funciones básicas de una MO de mantener la autorenovación, diferenciación y supervivencia de las CMH en el microambiente.

En resumen, nuestro trabajo muestra el desarrollo de un modelo 3D de MO constituido por CMH/CEM/MC/PRP que mantiene y soporta la funcionalidad de las CMH. Este es el primer modelo 3D de MO reportado con estas características. Estudios posteriores permitirán avanzar en las posibles aplicaciones de este modelo 3D de hematopoyesis en condiciones experimentales en las cuales está alterada la producción de células sanguíneas

8) Conclusiones

- Las CMH de ratón incluidas en un sistema 3D de coágulo de PRP, junto con CEM humanas y MC, mantienen su funcionalidad y capacidad de proliferar, diferenciarse y formar colonias hematopoyéticas, tanto in vitro como in vivo
- CEM humanas incluidas en un sistema 3D de coágulo de PRP, junto con CMH de ratón y MC, son detectadas a los 3 meses, tanto in vitro como en implantes de ratones
- El sistema constituido por CMH de ratón, CEM humanas, MC, incluidas en un coágulo de PRP, constituye un potencial modelo de hematopoyesis in vitro.

9) Referencias

- 1) Aria, Fumio; Hosokawa, Kentaro; Toyama, Hirofumi; Matsumoto, Yoshiko; Suda, Toshio. (2012). Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1266: 72-77.
- 2) Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. 21:77-89.
- 3) Cao, Huimino; Oteiza, Ana; Nilsson, Susan K. (2013). Understanding the role of the microenvironment during definitive hemopoietic development. *Experimental Hematology*. 41:761–768.
- 4) Cardier, José; Barbera, Guillen. (1997). Extramedullary Hematopoiesis in the Adult Mouse Liver Is Associated With Specific Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells. *Hepatology*. 26: 165-175.
- 5) Choi, Jaehoon; Won Minn, Kyung; Chang, Hak. (2012). The Efficacy and Safety of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells: An Update. *Archives of Plastic Surgery*. 39:585-592
- 6) Clever, Hans; Snippert, Hugo J. (2011). Tracking adult stem cells. *European Molecular Biology Organization Reports*. 12: 113-122.
- 7) Di Maggio, Nunzia; Piccinini, Elia; Jaworski, Maike, Trumpp, Andreas; Went, David J., Martin, Ivan. (2011). Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials*. 32:321-329
- 8) Diaz-Solano, Dylana; Wittig, Olga; Ayala-Grosso, Carlos; Pieruzzini, Rosalinda; Cardier, José E. (2012). Human Olfactory Mucosa Multipotent

- Mesenchymal Stromal Cells Promote Survival, Proliferation, and Differentiation of Human Hematopoietic Cells. *Stem Cells dev.* 21: 3187-3196.
- 9) Fujita, Atsushi; Migita, Makoto; Ueda, Takahiro; Ogawa, Rei; Fukunaga, Yoshitaka Shimada, Takashi shimada. (2010). Hematopoiesis in regenerated bone marrow within hydroxyapatite scaffold. *Pediatric Research*.68: 35-40.
 - 10) Ikuta, Koichi; Weissman, Irving. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89:1502-1506
 - 11) Leisten, Isabelle; Kramann, Rafael; Ventura Ferreira, Mónica S.; Bovi, Manfred; Sabine, Neuss; Ziegler, Patrick; Wagner, Wolfgang; Knüchel, Ruth; Schneider, Rebekka K. (2012). 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche.*Biomaterials*. 33:1736-1747
 - 12) Lo Celso, Cristina; MacLean, Adam; Stumpf, Michael P.H. (2016). Concise Review: Stem Cells Population Biology: Insights from Hematopoiesis. *Stem Cells*. 35: 80-88.
 - 13) Ma, Teng; Yan, Li; Kniss, Douglas; Yang, Shang-Tian; Lasky, Larry C. (2001). Cutting Edge Communication Human Cord Cell Hematopoiesis in Three-Dimensional Nonwoven Fibrous Matrices: *In Vitro* Simulation of the Marrow Microenvironment Cell Processing. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 10: 355-368.
 - 14) McCulloch, E.A.; Till, J.E. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*. 14: 213-222.

- 15) Nichols, Joan E; Cortiella, Joaquin; Lee, Jungwoo; Nilesa, Jean A.; Cuddihy, Meghan; Wang, Shaopeng; Cantu, Andrea; Mlak, Ron; Valdivia, Esther; Yancy, Ryan; Bielitzki, Joseph; McClure, Matthew L.; Kotove, Nicholas A. (2009). *In vitro* analog of human bone marrow from 3D scaffolds with biomimetic inverted colloidal crystal geometry. *Biomaterials*. 30: 1071-1079

- 16) Nilsson, Susan; Johnston, Hayley; Whitty, Genevieve; Williams, Brenda; Webb, Ryan; Denhardt, David; Bertoncello, Ivan; Bendall, Linda; Simmons, Paul; Haylock, David. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 4:1232-1239.

- 17) Osbourne, Barbara A.; Golbsy, Richard A; Kindt, Thomas A. (2007). *Inmunología de Kuby*. McGraw-Hill Interamericana. Sexta edición. USA

- 18) Orkin, Stuart H; Zon, Leonard (2008) Hematopoiesis: An evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 132:631-644.

- 19) Papyannopoulou, Thalia; Scadden, David. (2016). Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood*. 111: 3923-3930.

- 20) Ryan, Jennifer M; Barry, Frank P; Murphy, J Mary Murphy; Mahon, Bernard P. (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of inflammation*. 2:1-11

- 21) Scadden, David. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 441: 1075-1079.

- 22) Scadden, David T.; Morrison, Sean J. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 505: 327-334.

- 23) Terry, Thomas E.; Eaves, Allen C.; Wognum, Albertus W. Wognum. Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cell. (2003). Archives of Medical Research. 34: 461-475.
- 24) Ueda, Takahiro; Fujita, Atsushi; Ogawa, Rei; Yasuhiko, Itoh; Fukunaga, Yoshitaka; Shimada, Takashi; Migita, Makoto. (2014). Adipose-derived stromal cells grown on a hydroxyapatite scaffold can support hematopoiesis in regenerated bone marrow *in vivo*. Cell Biology International. 38: 790-798
- 25) Vazin, Tantis; Freed, William. (2010). Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. Restorative Neurology and Neuroscience. 28: 589–603.
- 26) Weissman, Irving L.; Heimfeld, Shelly; Spangrude, Gerald. (1988). Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. Science. 41: 58-62
- 27) Weissman, Irving L. (2000) Stem Cells: Units of Development Units of Regeneration, and Units in Evolution. Cell. 100: 157-168
- 28) Weissman, Irving L. (2000) Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities. Science. 287: 1442-1446
- 29) Wittig, Olga; Cardier, José; Paez-Cortez, Jesus. (2010). Liver Sinusoidal Endothelial Cells Promote B Lymphopoiesis from Primitive Hematopoietic Cells. Stem Cells and Development. 3: 341-349
- 30) Wittig, Olga; Romano, Edigio; González, Cesar; Diaz-Solano Dylana; Marquez, Maria Elena; Tovar, Pedro; Rodolfo Aoun; Cardier, José. (2016). A method of treatment for nonunion after fractures using mesenchymal stromal cells loaded on collagen microspheres and incorporated into platelet-rich plasma clots. International Orthopaedics. 40:1033-1038.

- 31) Wu, Yaojiong; Chen, Liwen; Scott, Paul G.; Tredget, Edward E.
(2007) Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through
Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells*. 25: 2648-2659.
- 32) Xi, Rongwen. (2009). Anchoring stem cells in the niche by cell adhesion
molecules. *Cell Adhesion and Migration*. 3: 396-401