

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“EXPRESION DE NOTCH-1 EN DOS POBLACIONES DE CELULAS
HEMATOPOYETICAS PRIMITIVAS DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL
BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

PRESENTA

M.C. VERONICA FERNANDEZ SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. HECTOR MAYANI VIVEROS

**LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y CELULAS TRONCALES
UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN ENFERMEDADES ONCOLOGICAS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

MEXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN ESPAÑOL

RESUMEN INGLES

LISTA DE ABREVIATURAS

I. INTRODUCCION

1.1 Hematopoyésis

1.2 Compartimentos celulares

1.3 Fuentes de obtención de las CTH y CPH

1.4 Identificación y aislamiento de CTH

1.4.1 Identificación de las CTH

1.4.2 Aislamiento de las CTH

1.4.2.1 Sin uso de Anticuerpos

1.4.2.2 Con uso de Anticuerpos

1.5 Proliferación y Expansión in vitro de las CTH y CPH

1.6 Microambiente Hematopoyético

1.7 Familia Notch

1.8 Proteína Notch

1.9 Ruta de Señalización de Notch

1.9.1 Genes Blancos de Notch

1.9.2 Ruta de señalización de Notch no canonica

1.10 Función de las señales de Notch

II. ANTECEDENTES

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

IV. HIPOTESIS

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

5.2 Objetivos Particulares

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención del material biológico

6.2 Obtención de células mononucleares

6.3 Conteo celular y Evaluación de la viabilidad celular

6.4 Enriquecimiento de células CD34+

6.5 Ensayos de Formación de colonias

6.6 Separación de las poblaciones CD34⁺CD38⁻Lin⁻

y CD34⁺CD38⁺Lin⁻ por citometría de flujo

6.7 Cultivos celulares

6.7.1 En presencia de estroma

6.7.2 En ausencia de estroma

6.8 Análisis de la expresión de la proteína Notch-1 por citometría de flujo

6.8.1 Tinción celular

6.8.2 Tinción Intracelular

6.9 Extracción de RNA

- 6.9.1 Método I
- 6.9.2 Método II
- 6.10 Obtención de cDNA
 - 6.10.1 Método I
 - 6.10.2 Método II
- 6.11 Método de PCR- tiempo real
- 6.12 Extracción de células estromales
- 6.13 Extracción de proteínas de membrana
 - 6.13.1 Método I
 - 6.13.2 Método II
- 6.14 Western Blot
 - 6.14.1 Preparación de proteínas
 - 6.14.2 Transferencia
 - 6.14.3 Incubación con Anticuerpos
- 6.15 Análisis estadístico

VII. RESULTADOS

- 7.1 Análisis de la expresión de los genes *Delta-1* y *Jagged-1* y de sus proteínas en las células estromales OP9-DL1 y OP9-V Delta-1.
- 7.2 Separación de dos poblaciones celulares CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻ provenientes de SCU
 - 7.2.1 Análisis morfológico de las células hematopoyéticas provenientes de SCU, purificadas por FACS
- 7.3 Evaluación la cinética de proliferación y expansión

de las poblaciones celulares hematopoyéticas primitivas.

7.3.1 Expansión de células progenitoras hematopoyéticas.

7.4 Análisis de la expresión de Notch-1 a nivel proteína
en las poblaciones celulares hematopoyéticas primitivas.

VIII. DISCUSIÓN

IX. CONCLUSIONES

X. PERSPECTIVAS

XI. CITAS BIBLIOGRAFICAS

RESUMEN

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado que se lleva a cabo únicamente en ciertos órganos, denominados órganos hematopoyéticos (saco vitelino, bazo, hígado, médula ósea). En ellos, las células hematopoyéticas se desarrollan en un ambiente específico llamado microambiente hematopoyético (MH).

Se ha descrito que las interacciones célula-célula entre las células troncales hematopoyéticas (CTH) y las células del estroma de la médula ósea son necesarias para incrementar la supervivencia de las células troncales. *In vivo*, las CTH están fuertemente adheridas a las células del estroma de la médula ósea; *in vitro*, el contacto con las células del estroma es requerido para el mantenimiento de los cultivos a largo plazo.

Una molécula candidata que puede estar implicada en estas interacciones es el receptor Notch y sus ligandos Jagged-1,-2 y Delta-1, -3 y -4 y se ha sugerido que la activación de la ruta de señalización de Notch es importante en las decisiones del destino celular, tales como autorrenovación, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas.

En los últimos años, ha crecido el interés por desarrollar técnicas de cultivo celular utilizando diferentes líneas celulares de origen humano y de ratón, para contribuir al estudio de las células hematopoyéticas. Por tal motivo, nosotros decidimos analizar los efectos que causa la interacción de los ligandos de Notch (Jagged-1 y Delta-1) en dos poblaciones de células hematopoyéticas CD34⁺ provenientes de sangre de cordón umbilical bajo nuestras condiciones de cultivo. Para ello empleamos la línea celular OP9, que es una línea estromal de médula ósea de ratones osteopetróticos. La utilización de esta línea celular ha facilitado el estudio de mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y diferenciación de las células hematopoyéticas, demostrando su habilidad para sostener la hematopoyesis. La línea celular OP9 expresa al ligando de Notch Jagged-1. Para estudiar los efectos del ligando Delta-1 empleamos la línea celular OP9 transducida con gen Delta-1

(OP9-DL1) y su control, células OP9 transducidas solo con el vector (OP9-V) para estudiar los efectos del ligando Jagged-1.

Ambas poblaciones hematopoyéticas fueron co-cultivadas en presencia de 7 citocinas estimuladoras, bajo cuatro diferentes condiciones de cultivo: solo citocinas (control); citocinas y células estromales mesenquimales; citocinas y células OP9-DL1; citocinas y células OP9-V. La capacidad de expansión y proliferación fueron determinadas después de 7 días de cultivo.

En los cultivos de células $CD34^+CD38^-Lin^-$ en presencia de OP9-DL1 u OP9-V se encontró un incremento significativo en la producción de nuevas células con el mismo fenotipo de las células iniciadoras del cultivo (expansión). También se observó que esta población celular, expresa niveles altos de Notch-1. Por otro lado, la producción de células nucleadas totales (Proliferación) se vio disminuida comparado con el cultivo control.

En los cultivos $CD34^+CD38^+Lin^-$ en presencia de las células OP9-DL1 u OP9-V, la expansión fue similar al cultivo control, mientras que la proliferación también disminuyó. Interesantemente, en estos cultivos observamos la producción de células con fenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$.

Con estos resultados, podemos concluir, que la línea celular OP9 es eficiente para inducir la autorrenovación y/o la generación de novo de células primitivas ($CD34^+CD38^-Lin^-$), sugiriendo que estos efectos se deben, al menos en parte, a la presencia de Jagged-1 y Delta-1 y su interacción con Notch-1. En contraste, con la población intermedia ($CD34^+CD38^+Lin^-$) parece no tener el mismo efecto, posiblemente se deba a que la presencia de Notch en esta población se ve disminuida.

Con estos resultados apoyamos la idea de que la interacción celular mediada por Notch se lleva a cabo en los estadios tempranos, lo cual ayuda al mantenimiento celular, inhibiendo su diferenciación.

ABSTRACT

Hematopoiesis is a finely regulated process that takes place only in certain organs, the so-called hematopoietic organs (i.e., yolk sac, spleen, liver, and bone marrow). Within such organs, hematopoietic cells develop in a specific environment called hematopoietic microenvironment.

It has been reported that cell-cell interactions between Hematopoietic Stem Cells (HSC) and marrow stromal cells are important for stem cell survival. In vitro, the contact with primary stromal cells or stromal cell lines has been observed in long-term cultures. A candidate molecule that may be involved in these interactions is the Notch receptor. It has been suggested that Notch plays a role in cell fate decisions, such as self-renewal, proliferation and differentiation of hematopoietic cells.

In recent years, there has been an increasing interest in developing cell culture techniques using different cell lines of human and mouse origin. The OP9 cell line is a marrow stroma cell line from osteopetrotic mice. Using this cell line has facilitated the study of molecular mechanisms involved in the development and differentiation of hematopoietic cells, thus demonstrating its ability to support hematopoiesis.

In this study we have analyzed the in vitro effects of the OP9 cell line – transduced with either the Delta-1 gene (OP9-DL1) or with vector alone (OP9-V) – on two CD34⁺ cell populations: a primitive (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) and an intermediate (CD34⁺CD38⁺Lin⁻) population from human umbilical cord blood. Both populations were cultured in the presence of 7 stimulatory cytokines, under four different culture conditions: cytokines alone (control), cytokines and mesenchymal stromal cells, cytokines and OP9-DL1 cells, cytokines and OP9-V. The expansion and proliferation of both hematopoietic cell populations were determined after 7 days of culture.

In cultures of CD34⁺CD38⁻Lin⁻ cells in the presence of OP9-DL1 or OP9-V, we found a significant increase in the production of CD34⁺CD38⁻Lin⁻ cells, (Expansion), which express high levels of Notch-1. In contrast, the total nucleated cell production (Proliferation) was reduced as compared to control culture. In cultures of CD34⁺CD38⁺Lin⁻ cells in the presence of OP9-DL1 and OP9-V, cell expansion was similar to control cultures, while proliferation was also reduced. Interestingly, in these cultures we observed the production of CD34⁺CD38⁻Lin⁻ cells.

Our results indicate that, as compared to mesenchymal stroma cells, OP9 cell were more efficient at inducing self-renewal and/or de novo generation of primitive CD34⁺CD38⁻Lin⁻ cells and suggest that such effects were due, at least in part, to the presence of Jagged-1 and DL1. This study supports the notion that Notch is a key player for primitive hematopoietic cells development.

LISTA DE ABREVIATURAS:

4-HC: 4-Hidroxiperoxilofosfamida

5-FU: 5-Fluorouracilo

ALDH: Aldehído Deshidrogenasa

Ab's: Anticuerpos

CFCs: Células Formadoras de Cultivo

CFU-GM: Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos/Macrofagos

CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas

CRU: Frecuencia de Unidades Repobladoras Competitivas

CTE: Células Troncales Embrionárias

CTH: Células Troncales Hematopoyéticas

DSL: Delta, Serrate y Lag2

ECD: Dominio Extracelular

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting

FL: Ligando de FLT3

GVHD: Enfermedad Injerto Contra Hospedero

Grs: Gramos

HD: Domino Heterodimerico

HF: Hígado Fetal

HLA: Antígeno Leucocitario Humano

IL-6: Interleucina 6

Lin⁻: Linaje Negativo

Lin⁺: Linaje Positivo

LTC-IC: Células Iniciadoras de Cultivo a Largo Plazo

LTR: Repobladoras a Largo Plazo

MH: Microambiente Hematopoyético

MIN: Minutos

MO: Medula Ósea

NICD: Dominio Intracelular de Notch

NOD/SCID: Ratones diabéticos no obesos con Inmunodeficiencia combinada severa

PEST: Región compuesta de Prolina-Glutamato-Serina-Treonina

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PPR: Hormona Parathyroidea

RT-PCR: Transcripción Reversa de la PCR

SCF: Factor de Células Troncales

SEG: Segundos

SCU: Sangre de Cordón Umbilical

SPM: Sangre Periférica Movilizada

T-ALL: Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T.

TA: Temperatura Ambiente

TAD: Dominio de trans-activación

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

TPO: Trombopoietina

I. INTRODUCCION

1.1 HEMATOPOYESIS

La Hematopoyesis se define como el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética o célula troncal hematopoyética [Mayani et al., 2003; Ayala et al., 2001]. La hematopoyesis ocurre bajo condiciones muy específicas en el interior de los huesos, en la llamada médula ósea (MO). La hematopoyesis es un proceso complejo en el que interviene una gran variedad de tipos celulares y el cual es regulado por diversos factores [Mayani et al., 2007].

1.2 COMPARTIMIENTOS CELULARES

El sistema hematopoyético está organizado de una manera jerárquica, de tal modo que una pequeña población de CTH da origen a células que progresivamente van perdiendo su potencial de autorenovación, su capacidad de diferenciación llega a ser más restringida y finalmente generan células maduras [Blank et al., 2008].

El sistema hematopoyético puede ser dividido con base en el grado de maduración de las células que lo conforman y en los distintos linajes celulares que de él se generan. De acuerdo al grado de maduración celular, se han identificado cuatro compartimentos. El primer compartimento corresponde a las células más primitivas, las CTH. Estas células tienen dos características funcionales que las distinguen: son capaces de auto-renovarse (al dividirse, por lo menos una de las dos células hijas conserva las propiedades de la célula madre) y son multipotenciales (pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos) [Szilvassy et al., 2003; Mayani et al., 2003; Blank et al., 2008]. Las CTH corresponden al 0.01% del total de células nucleadas presentes en la médula ósea, por lo que su estudio puede verse limitado desde el punto de vista práctico. Sin embargo, gracias a los estudios realizados hasta ahora, sabemos que estas células tienen una morfología linfoblastoide, expresan

antígenos como CD34, CD90, CD117 y CD133 y carecen de la expresión de antígenos de linajes específicos, como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD33, CD38, CD45, CD57, CD71, Glicoforina A, etc. [Wognum et al., 2003].

Las CTH dan origen a células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación pero conservan su potencial proliferativo. Estas pueden ser multipotenciales, o bien, pueden estar restringidas a dos (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales). Las CPH constituyen el segundo compartimiento del sistema hematopoyético, el cual corresponde a <0.5% del total de células de la médula ósea; comparten ciertas características inmunofenotípicas con las CTH, como la expresión del antígeno CD34, sin embargo, presentan patrones de expresión de marcadores celulares muy particulares, de acuerdo al linaje al que pertenecen. Debido a su capacidad para generar colonias de células hematopoyéticas en cultivos semisólidos, las CPH también son conocidas como células formadoras de colonias o CFC [Mayani et al., 2007].

Las CPH dan lugar a células precursoras reconocibles por su morfología (tercer compartimiento), las cuales, a pesar de ser inmaduras, pueden ser identificadas en frotis de médula ósea a través de microscopía de luz. Las células precursoras constituyen la gran mayoría de las células de la médula ósea (>90% de las células hematopoyéticas residentes en la cavidad medular). Finalmente, el cuarto compartimiento lo constituyen las células sanguíneas circulantes [Mayani et al., 2007]

1.3 FUENTES DE OBTENCION DE LAS CTH Y CPH

Durante el desarrollo fetal y la vida postnatal temprana, la población de CTH se expande considerablemente y comienza a sufrir cambios sutiles que continúan a lo largo de la vida. Las CTH de **Hígado Fetal** humano (HF) obtenidas entre la semana 6 y 22 de gestación- tienen un alto potencial de proliferación in vitro, en comparación con las CTH provenientes de MO. Se ha observado que Células Iniciadoras de Cultivo a Largo Plazo (LTC-IC) de un

Hígado Fetal dan origen a 5 veces más Células Formadoras de Colonias (CFCs) que las LTC-IC derivadas de MO [Szilvassy et al., 2003]

A partir del nacimiento, la gran mayoría de las CTH residen en la **Médula Ósea**, donde se encuentran íntimamente asociadas con células estromales que constituyen el microambiente hematopoyético. Estas células producen gran cantidad de factores estimuladores e inhibidores, regulando así el desarrollo de las CTH. Sin embargo, un pequeño número de CTH migra constitutivamente a través de la circulación, lo que permite su amplia distribución a todo lo largo de la médula ósea y en algunos tejidos no hematopoyéticos, como el músculo, riñón, pulmón, hígado, corazón, cerebro e intestino delgado en ratón [Szilvassy et al., 2003].

Numerosos estudios en roedores, primates y humanos han demostrado que es posible inducir la movilización de CTH y CPH desde la MO hacia la circulación. Dicha movilización puede llevarse a cabo empleando una variedad de citocinas naturales (ej. IL-1, 6, 7, 8, 11, 12, 17, G-CSF y SCF) y de moléculas producidas por ingeniería molecular (ej. Daniplestim, agonista del receptor de IL-3; Leridistim, agonista dual de los receptores de IL3 y G-CSF; Mielopoietin, otro agonista dual de los receptores de IL-3 y GM-CSF); así como algunas quimiocinas (ej. MIP-1 α , SDF-1) y antagonistas de moléculas de adhesión (ej. Anticuerpo VLA-4 y AMD3100 (agonista CXCR4) [Szilvassy et al., 2003]. Estudios posteriores demostraron que dichas células de la **Sangre Periférica Movilizada (SPM)** pueden ser empleadas para reconstituir la hematopoyesis después de una mielosupresión y son muy usadas tanto en auto como en alo-trasplantes.

La **Sangre de Cordón Umbilical (SCU)**, por su parte, representa una fuente atractiva de CTH. Se ha demostrado que la SCU contiene una elevada frecuencia de células troncales y progenitoras hematopoyéticas y que éstas tienen mayor potencial de proliferación y diferenciación, con respecto a las células de sujetos adultos. En cuanto a su aplicación en trasplantes, su empleo ha aumentado considerablemente, debido a su amplia disponibilidad, su fácil acceso y la posibilidad de criopreservar las células al nacimiento para su uso posterior. Debido a la inmadurez del sistema inmune del recién nacido, los linfocitos presentes en la sangre de cordón umbilical han demostrado ser más

tolerantes a los antígenos leucocitarios humanos (HLA), provocando menos Enfermedad Injerto contra Hospedero (GVHD), tanto aguda como crónica, en un alotrasplante.

1.4 IDENTIFICACION DE CTH HUMANAS

En términos funcionales, las CTH se definen por su capacidad para regenerar, a largo plazo, todos los linajes hematopoyéticos *in vivo*. Para demostrar la existencia de las CTH y su capacidad para producir clones de larga duración *in vivo*, se han desarrollado varios modelos animales, empleando mamíferos inmunodeficientes (ratones u ovejas en estado fetal). En cuanto a su comportamiento biológico *in vitro*, se ha demostrado que las CTH tienen la capacidad para iniciar y mantener la hematopoyesis por largos periodos (varias semanas) en cultivos establecidos en presencia de células estromales; por esta razón se les conoce como LTC-IC. En términos inmunofenotípicos, las CTH se han definido de acuerdo a una serie de marcadores expresados en su superficie [Dorhkind. et. al.,1990].

Marcadores de superficie celular de las CTH humanas

A pesar de muchos estudios exhaustivos, aun no se ha encontrado un marcador molecular específico que se exprese exclusivamente en las CTH. Las células hematopoyéticas primitivas, incluyendo a las CTH, carecen de la expresión de marcadores de superficie o marcadores de linaje (lin) que son asociados con maduración terminal de tipos de células sanguíneas específicas (células T, B, NK, monocitos, granulocitos y eritrocitos); esta falta de expresión (lin⁻) puede ser usada para distinguir células inmaduras de células diferenciadas y más abundantes en una población de células hematopoyéticas [Wognum et al., 2003; Ogawa. et. al., 2002].

El enriquecimiento de células primitivas mediante la eliminación de células Lin⁺, normalmente permite un enriquecimiento de 20-500 veces en la frecuencia de CTH, dependiendo de los marcadores de linajes usados. Ejemplos de los marcadores comúnmente usados para aislar células humanas lin⁻ son: glicoforina A, expresado en eritrocitos; CD2, CD3, CD4 y CD8 expresados en linfocitos T; CD14 y CD66b en monocitos; CD15 y CD16 en granulocitos; CD19 y CD20 en linfocitos B y CD56 por células NK. En la tabla1

se resumen algunos de los marcadores de superficie de las células CTH humanas.

Tabla 1. Marcadores de superficie celular de las CTH humanas.

CD34	Glicoproteína integral de membrana, de 90-120 kD. Es un marcador de diferenciación reconocido en las células hematopoyéticas humanas primitivas [Wognum et al., 2003]. Es expresado entre el 1-4% de las células nucleadas de aspirados de MO normal en humanos y, en condiciones normales, en <0.1% de las células nucleadas en sangre periférica [Korbling et al., 2001; Thomas et al., 1999].
CD133	Es otro marcador para las CTH, conocido también como AC133. Es expresado en la mayoría, pero no en todas las células CD34+, incluyendo células repobladoras, progenitores inmaduros y progenitores de monocitos/granulocitos, pero no en progenitores eritroides [Gallacher. et al., 2000].
CDCP1 (por Cubdomain containing protein)	La expresión de CDCP1 en células hematopoyéticas humanas normales está restringido a un conjunto de células CD34+, incluyendo a las que tienen actividad repobladora de la hematopoyesis en ratones NOD/SCID.
C-KIT	El receptor para el factor de células troncales C-KIT o CD117 es expresado en las CTH y en más de la mitad de las células CD34 ⁺ , incluyendo a las CPH más comprometidas de linaje y es selectivamente sobre regulado en la diferenciación terminal de células eritroides.
KDR	Se ha reportado que células CD34+KDR+ están enriquecidas en su contenido de LTC-ICs, así como en células repobladoras capaces de injertar en ratones NOD/SCID.
VEGFR1	Otro receptor para VEGF, el VEGFR1 es expresado ~5% de las células CD34+ de SCU e hígado fetal y se ha reportado que esta población (CD34 ⁺ VEGFR1 ⁺) incluye a la mayoría de células repobladoras NOD/SCID [Wognum et al., 2003].

1.5 PROLIFERACION Y EXPANSION IN VITRO DE LAS CTH Y CPH

El **potencial de proliferación** de una célula troncal o progenitora se define como la habilidad para dividirse y generar nuevas células hijas, sin importar el tipo, linaje o estadio de las células generadas; por otra parte, el **potencial de expansión** se refiere a la capacidad de una célula para dividirse y generar nuevas células con características similares a la célula original. Estas dos características dependen de factores intrínsecos, tales como: factores de transcripción reguladores del ciclo celular, telomerasa, señales de moléculas de transducción, receptores de citocinas, etc. Sin embargo, la habilidad de una célula para exhibir tales potenciales depende de factores extrínsecos, que incluyen todos los tipos celulares y sus productos que forman parte del microambiente en que la célula se desarrolla. La proliferación y la expansión *in vitro* de las células hematopoyéticas también depende de variables como el tipo de medio de cultivo, temperatura, cambios de medio, presencia o ausencia de suero, presencia o ausencia de estroma, etc. Por lo tanto, los elementos que rodean a las CTH y CPH en el microambiente influyen en los potenciales de proliferación y expansión de las células hematopoyéticas.

Numerosos intentos se han hecho con el uso de citocinas hematopoyéticas con la intención de expandir la población de CTH y CPH *in vitro*. Interleucinas como IL-3, IL-6 e IL-11, así como el ligando de FLT-3 (FL), trombopoietina (TPO) y el factor de células troncales (SCF) han sido investigadas. Sin embargo, la mayor parte de los esfuerzos encaminados a expandir la población de CTH han fallado, debido a la diferenciación de la población original, con la subsecuente pérdida de su potencial repoblador [Ulrika et al., 2008].

Entre las diferentes citocinas que participan en la hematopoyesis, se encuentran las que actúan en los estadios tempranos de la jerarquía hematopoyética como SCF, FL, TPO e IL-6 y que pueden ser esenciales para favorecer la expansión de CTH y CPH *in vitro*. Piacibello y colegas reportaron que el cultivo de células CD34⁺ en presencia de FL y TPO, resulta en una expansión de 2×10^6 veces el número de CFC con respecto a células sin

cultivar. La adición de factores de actividad tardía, como la eritropoyetina (EPO), usualmente contribuye a la producción de gran número de células maduras; sin embargo, estas no parecen afectar la expansión de CPH [Piacibello et al., 1998]. La participación de células del estroma en la proliferación y expansión *in vitro* de células hematopoyéticas primitivas también se ha documentado. Sin embargo hay controversias al respecto. Algunos argumentan que el contacto directo entre las células hematopoyéticas con las células del estroma es necesario para el óptimo crecimiento de las células hematopoyéticas; en contraste, otros sostienen que su mayor función es para proveer citocinas solubles y su presencia puede no ser crítica mientras los cultivos sean suplementados con citocinas [Mayani et al., 2003; Ulkira et al., 2008].

Por otra parte, se ha demostrado que las CPH derivadas de SCU poseen más alto potencial de proliferación y expansión que su contraparte de MO y SPM de adultos. Gilmore y colegas, reportaron que células CD34+ derivadas de SCU fueron capaces de proliferar y expandir su número en cultivos suplementados con FL y TPO hasta por 16 semanas, generando un número significativo de CTH/CPH; en contraste, bajo las mismas condiciones de cultivo, las células CD34+ provenientes de SPM adulta fueron incapaces de generar y mantener su número inicial de CPH [Gilmore et al., 2000]. Observaciones similares fueron reportadas por Tanavde y colaboradores, en cultivos suplementados con FL, SCF y TPO de células CD34⁺ derivadas de SCU y SPM. Además, en ensayos de repoblación hematopoyética en ratones inmunodeficientes, las células derivadas de la expansión *ex vivo* de SCU mantienen, y en algunos casos incrementan, esta capacidad, al contrario de células provenientes de SPM, también cultivadas [Tanavde et al., 2002]. Acorde con los diferentes estudios, las diferencias funcionales, por lo menos en parte, se deben a que las células de SCU salen más rápidamente de la fase G₀/G₁ del ciclo celular y poseen telómeros más largos en comparación a las células de SPM. La diferenciación de las células CD34+ en los diferentes linajes también depende de la acción de citocinas específicas.

Aunque ciertos niveles de expansión *ex vivo* de CTH y CPH de SCU han sido documentados usando diferentes sistemas experimentales, dos puntos principales permanecen controversiales y representan importantes objetivos que deben alcanzarse en un futuro próximo: la generación de células hematopoyéticas que mantengan multipotencialidad y capacidad de autorenovación, así como la producción de estas células en un número suficiente para su aplicación clínica [Mayani et al., 2003].

1.6 MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

Como ya se ha mencionado, la hematopoyesis es un proceso finamente regulado que se lleva a cabo únicamente en ciertos órganos, denominados órganos hematopoyéticos (saco vitelino, bazo, hígado, médula ósea); en ellos las células hematopoyéticas se desarrollan en un ambiente específico denominado microambiente hematopoyético (MH). El MH consiste en una estructura tridimensional, altamente organizada, de células del estroma y sus productos (matriz extracelular, citocinas, quimiocinas, entre otras) que regula la localización y fisiología de las células hematopoyéticas [Mayani et al., 2007; Dorskind., 1990]. El microambiente en la MO está conformado principalmente por células hematopoyéticas (macrófagos), células endoteliales y células del estroma (refiriéndose a las células no hematopoyéticas de origen mesenquimal tales como: adipocitos, células osteogénicas, y células reticulares. En relación a este punto, la capa adherente derivada de cultivos a largo plazo de MO consiste en células de fibroblastos, macrófagos, adipocitos, células endoteliales y células de músculo liso [Deans et al., 2000].

El nicho de las células troncales está compuesto de las células del microambiente que nutren a las células troncales y permiten la homeostasis del tejido. El concepto del nicho fue introducido por Schofield en 1978, sin embargo su importancia fue retomada tiempo después con estudios realizados en *Drosophila* que proporcionaron estímulos para su resurgimiento [Moore et al., 2006; Li et al., 2005]. Históricamente, el término “nicho” es generalmente usado para describir la localización de las células troncales.

Las células del nicho proveen un refugio que protege a las células troncales de estímulos tales como: diferenciación, apoptosis, etc., que podrían alterar las reservas de células troncales. El nicho también protege contra un exceso en la producción de células troncales que podría originar un cáncer. Las células troncales periódicamente se activan para producir progenitores comprometidos y estas a su vez, producir células maduras diferenciadas de distintos linajes. Así, el nicho mantiene un balance de células troncales quiescentes y activas [Moore et al, 2006].

Uno de los mayores avances en la última década ha sido el desarrollo de técnicas de cultivo celular que hacen posible el crecimiento de células estromales seleccionadas y sus derivados lo que ha contribuido al estudio de su capacidad para mantener la hematopoyesis e identificar factores de diferenciación involucrados [Moore et al, 2006; Harvey et al., 2004].

1.7 FAMILIA NOTCH

El gen Notch ha sido identificado en una gran cantidad de especies animales (desde pequeños invertebrados hasta mamíferos) y cuatro isoformas han sido aisladas en mamíferos: Notch-1/TAN-1, Notch-2, Notch-3 y Notch-4/int-3.[Walker et al, 1999; Ganapati et al, 2007]. Aunque estos cuatro muestran sutiles diferencias en su dominio extracelular (Notch-1 y Notch-2 tienen 36 repeticiones similares al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Notch-3 tiene 34 y Notch-4 solo 29 repetidos) y en el dominio citoplasmático, el dominio de trans-activación (TAD), no se encuentra presente en los receptores Notch-3 y Notch-4; por lo estos son similares [Wang et al., 2008].

Por otro lado cinco ligandos se han identificado en mamíferos: Dos proteínas Jagged-1 y Jagged-2 y tres similares a Delta (1, 2 y 4), conocidos en conjunto como DSL [De la Coste et al., 2006; Karanu et al., 2000; Sanalkumar et al., 2010]. Son proteínas transmembranales que poseen una arquitectura conservada. Ambas familias contienen una secuencia señal, una región N-terminal no conservada de aproximadamente 100 residuos de a.a., un dominio propio de la familia (Delta o Serrate), un número variable de repetidos EGF, un

dominio transmembranal y un dominio intracelular no conservado. Las proteínas Jagged, además tienen un dominio rico en cisternas [Tien et al., 2009].

1.8 PROTEINAS NOTCH

El gen Notch codifica un receptor transmembranal de 300 kD, el cual es sintetizado a partir de un polipeptido precursor que es procesado por una convertasa en su paso por la región *trans* del complejo de Golgi, produciendo un receptor heterodimérico que se ensambla a la membrana. El receptor Notch consiste de un dominio extracelular (ECD) con 36 repeticiones similares al EGF que se localizan en la región amino terminal extracelular y participan en la unión con su ligando proveniente de otra célula, un dominio heterodimérico (HD) y tres dominios LNR (Lin-12, repeticiones Notch), seguido por un dominio transmembranal, repeticiones ankirina -necesarias para la transmisión de señales- y un motivo PEST (región rica en prolina-glutamato-serina-treonina), que tiene propiedades proteolíticas. Estos dominios de Notch proveen una plataforma para modificaciones y eventos regulatorios específicos (ver figura 1) [Tien et al., 2009; Wang et al., 2008].

PROTEINA NOTCH

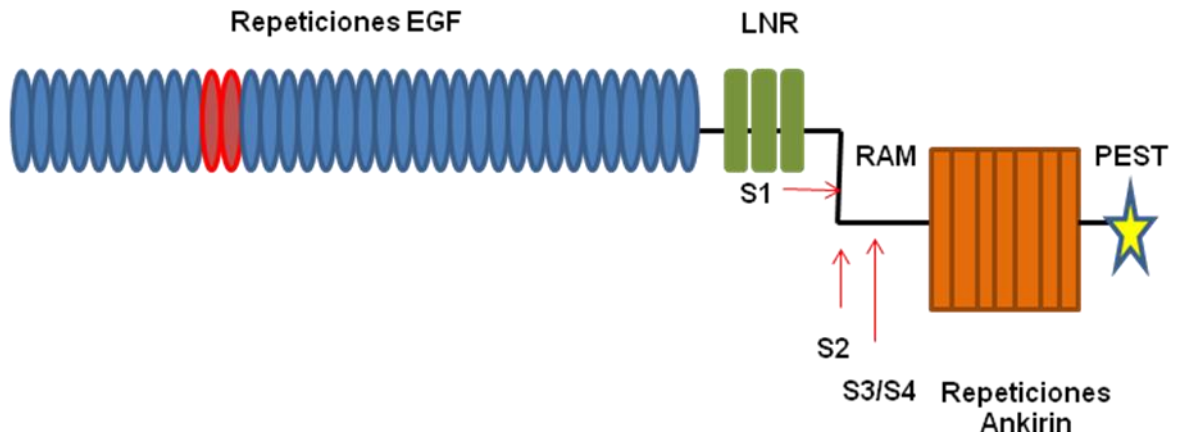


Figura 1. Ilustración esquemática de Notch. La parte N-terminal del ectodominio de Notch, consiste de 36 repeticiones similares a EGF (óvalos azules) y tres LNRs (repeticiones Lin-12; óvalos verdes). Las repeticiones 11 y 12 interactúan con el ligando (óvalos rojos). El NICD consiste de un dominio RAM N-terminal (recombinación de unión a proteína J asociada molécula) y un dominio Ankirin (ANK; rectángulos naranja) y una región menos conservada, incluyendo un dominio trans-activación variable y una secuencia C-terminal PEST (estrella amarilla). Las flechas rojas indican sitios de corte: S1 (Furin), S2 (metaloproteasa ADAM) y S3/S4 (γ -secretasa).

1.10 RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

La ruta de señalización de Notch es conservada a lo largo de la evolución en una amplia variedad de procesos del desarrollo, incluyendo la homeostasis y mantenimiento de las células troncales. La pérdida de la función de componentes de esta ruta causa desórdenes genéticos hereditarios, tales como Síndrome Alagille, disostosis espondiloctosa (SCD) y arteriopatía cerebral autosómica dominante con infarto subcortical y leucoencefalopatía. Por otra parte, la sobre-regulación de la actividad de Notch está asociada con leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL). Las señales de Notch están moduladas por glicosilación, tráfico intracelular diferencial y degradación dependiente de ubiquitina [Tien et al., 2009].

La señalización de Notch ocurre cuando los ligandos DSL se unen e interactúan con el receptor Notch, uniéndose e induciendo una serie de cortes llamados S2, S3 y S4. El corte S2 está mediado por la metaloproteasa ADAM/TACE, mientras que el corte S3/4 es intramembranal y mediado por la γ -secretasa dependiente de presenilina, resultando en la translocación del dominio intracelular de Notch (NICD) en el núcleo. Esto convierte al complejo co-represor CSL (CBF1/RBPJK en mamíferos, Su(H) en mosca y LAG-1 en lombrices) en un complejo activador (ver figura 2) [Tien et al., 2009].

En mamíferos, el Promotor 1 de unión al Factor 1 (CBF1) es un factor de transcripción que se une al ADN mediante la ruta de señalización conocida como ruta canónica de Notch. La expresión constitutiva de CBF1 está siempre unida a una secuencia específica de promotores de genes blancos de Notch, los cuales regulan su expresión. En ausencia de NICD, CBF1 recluta co-represores debido a su alta afinidad, inhibiendo la transcripción de genes blancos específicos [Sanalkumar et al., 2010]. En la tabla 1 se resumen los principales componentes de la ruta de señalización de Notch.

Cuando la ruta de señalización canónica de Notch es activada a través de la interacción con su ligando, el NICD liberado se une a CBF1 y convierte el complejo represor en un complejo activador junto con co-activadores transcripcionales específicos como Mastermind-like (MAML), y otros. La

activación de la señales de Notch dispara la expresión de varios genes blancos tales como *Hes-1* (hairly enhance of Split-1) y relacionados con la familia de factores de transcripción Hes basic hélix-loop-helix (bHLH), *nuclear factor-kappa B* (NF-kB), *ciclina D1* y *c-myc* [Wang et al., 2008]. La familia *Hes* recluta a co-represores como Groucho/TLE y regula la expresión de genes específicos de tejido como *Mash1* y *NeuroD*, requeridos para varias funciones celulares figura 2 [Sanalkumar et al., 2010].

La ruta de señalización canónica de Notch juega un papel central en diversas tareas celulares durante el desarrollo embrionario y en el mantenimiento de las células troncales, la diferenciación destino-especifico y homeostasis en el tejido adulto. De la misma manera, los componentes de Notch están implicados directamente en varios desordenes humanos. Estos incluyen al síndrome del desarrollo y la iniciación, progresión y mantenimiento de cáncer de páncreas, entre otros tipos de cáncer [Sanalkumar et al., 2010; Wang et al., 2008].

Tabla 2. Principales componentes de la ruta de señalización de Notch en mamíferos y en otros modelos.

Componente	Mamíferos	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
Receptores	Notch-1	Notch	Lin-12
	Notch-2		GLP-1
	Notch-3		
	Notch-4		
Ligandos	Delta-like 1(DLL1)	Delta	LAG-1
	Delta-like 3(DLL3)		LAG-2
	Delta-like 4(DLL4)		APX-1
	Jagged1 (JAG1)	Serrate	ARG-2
	Jagged2 (JAG2)		
Factores de transcripción	CBF1/RBPJK	Supresor de Hairless (SuH)	LAG-3
	RBPL		
	NFkB		

Genes Blanco

El proceso de activación de la vía de señalización de Notch tiene como finalidad la transcripción de genes blanco. En la tabla 2, se mencionan los principales genes blanco [Sanalkumar et al., 2010; Miele et al., 1999].

Tabla 3. Genes Blanco de Notch

GENES	DESCRIPCION
Bcl-2	Codifica una proteína integral de membrana mitocondrial, bloquea la muerte apoptótica de varios tipos celulares como linfocitos.
NFkB2	Participa en el desarrollo de órganos linfoides y estimula la expresión de varios genes como las proteínas antiapoptóticas.
HES	Factores de transcripción, que modulan negativamente a genes como los de la familia achaete-scute, que inducen la diferenciación neural.
p21	Codifica un potente inhibidor de cinasas ciclonodependientes. Esta proteína se une a los complejos ciclina CDK2 o CDK4 e inhibe su función y funciona como regulador de la progresión a G1 del ciclo celular.
IL-4	La proteína codificada por este gen es una citocina pleiotrópica producida por las células T activadas.
PI3K (Fosfatidil Inositol-3- cinasa	Proteína de señalización que confiere resistencia de muerte celular por pérdida de adhesión con la matriz circulante y a la apoptosis mediada por p53.
ERBB2	Es un factor de transcripción que estimula la proliferación y el crecimiento celular.

RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

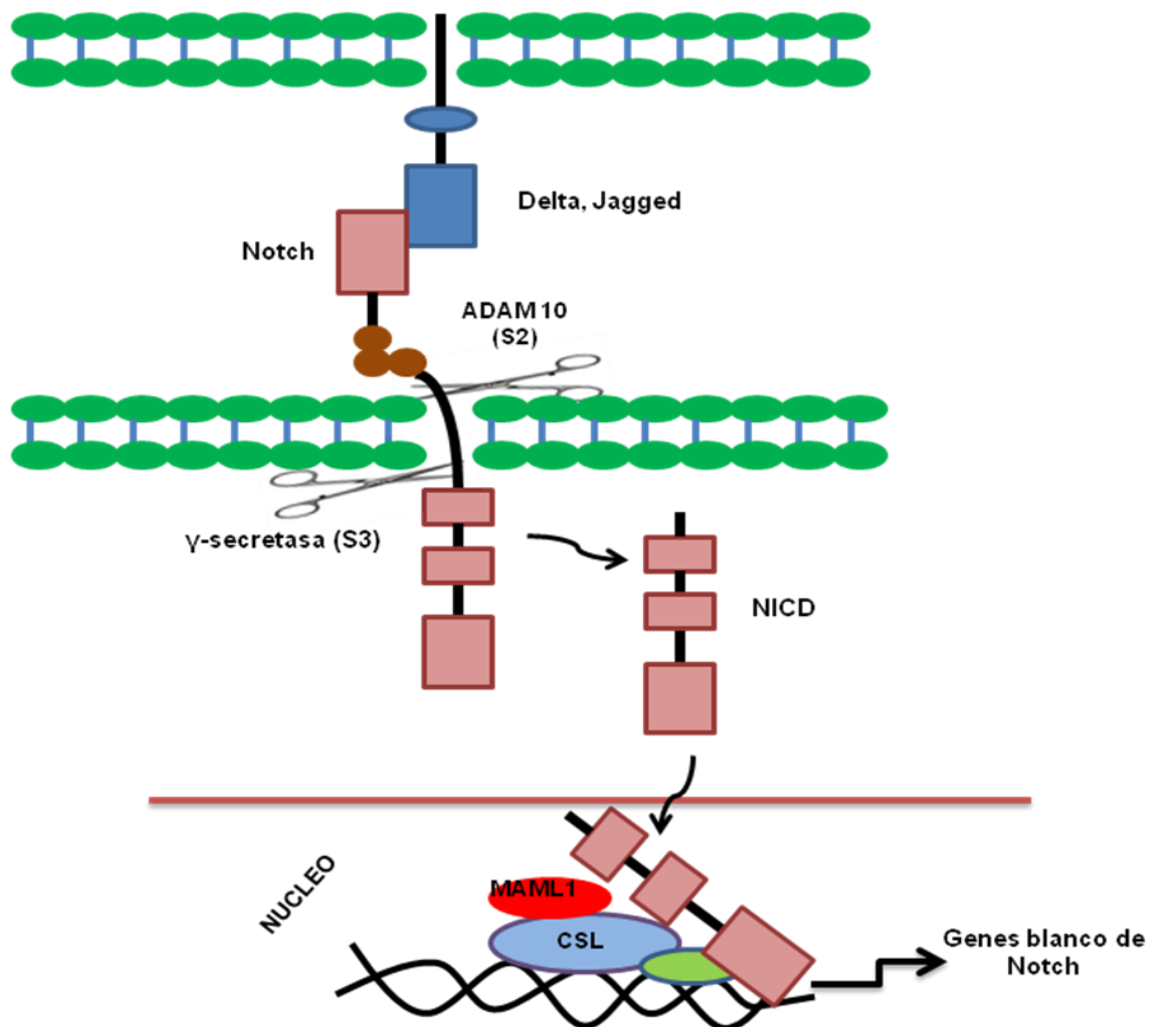


Figura 2. La ruta de señalización de Notch inicia con la unión del receptor Notch y su ligando (Jagged/Delta) expresado en células adyacentes. Esta unión, conlleva a varias rupturas (S2, S3 y S4). S2 es mediado por la metaloproteasa ADAM/TACE mientras que la ruptura S3 y S4 intermembranal es mediado por la enzima γ -secretasa. Estas rupturas conllevan a la translocación del dominio intracelular de Notch (NICD) al núcleo, donde se une con varios factores de transcripción (MAML1, CSL) promoviendo la transcripción de genes blancos de Notch.

Evidencias de ruta de señalización de Notch no canónica independiente de CBF1 en vertebrados.

Las señales de Notch independientes de CSL han sido demostradas en varias características anatómicas/fisiológicas de *Drosophila*. También han surgido reportes en vertebrados de la existencia de una ruta de señalización no canónica de Notch en varios tejidos. La discrepancia entre la expresión ligando/receptor de Notch y genes *Hes* en células neuroepiteliales, también fortalece la noción de la existencia de señales no canónicas en vertebrados.

La mayoría de los reportes iniciales han surgido en modelos donde se activan los receptores Notch sin la interacción del dominio CBF1 o donde hay presencia nula de CBF1. Dobles mutantes CBF1 son letales a nivel embrionario. Varias condiciones de modelos de ratones knock-out CBF1 fueron generadas para estudiar las señales mediadas por este co-factor durante el desarrollo embrionario en mamíferos. Sobre el análisis de reportes de las señales de Notch/CBF1 no canónicas en vertebrados, se encontró la existencia de dos tipos de activación de genes blanco de Notch independiente de CBF1: el Tipo-I involucra activación mediante el ligando de Notch, pero sin emplear CBF1; el Tipo-II logra la activación de genes blanco de Notch de manera independiente de este receptor o de la transducción de señal mediante CBF1 (ver tabla 3). En vertebrados, las señales de Notch no canónicas independientes de CBF1, fueron inicialmente reportadas en la proliferación *in vitro* de mioblastos. Más tarde, modelos *in vivo* indican la participación de la ruta no canónica independiente de CBF1 en células de tumor y su progresión. Varios efectos sobre la proliferación, transformación neoplásica, progresión del tumor y apoptosis han sido implicados como el resultado de la ruta no canónica en cáncer [Sanalkumar et al., 2010].

Tabla 4 Clasificación de las señales de Notch y su implicación funcional

RUTAS DE NOTCH				IMPLICACIONES FUNCIONALES
Canónica	Dependiente de NICD	Dependiente de CBF1		Involucrado en el mantenimiento de progenitores, decisiones específicas de diferenciación y homeostasis de tejido.
No Canónica	Dependiente de NICD	Independiente de CBF1	Tipo-I	Involucrado en la tumorigénesis, inhibición de apoptosis, especificación del destino neural.
	Independiente de NICD	Independiente de CBF1	Tipo-II	Involucrado en la proliferación de progenitores restringidos de linaje.
			Tipo-III	Involucrado en especificación del destino de neuronas GABAérgicas, proliferación de neuroblastoma.

[Sanalkumar et al., 2010]

1.11 FUNCION DE LAS SEÑALES DE NOTCH

La señalización de Notch está involucrada una gran variedad de procesos celulares incluyendo el mantenimiento de células troncales, especificación del destino celular, diferenciación, proliferación y apoptosis, por lo que posee efectos pleiotrópicos en diferentes órganos. Los tres efectos principales son:

- 1) Mantenimiento de las células troncales o precursoras en un estado no diferenciado.
- 2) Influencia en las decisiones del destino celular, ya sea a través de la vía canónica o por una vía inductora dependiente de la cantidad de receptor-ligando expresado en la membrana.
- 3) Habilidad de influenciar la diferenciación y la progresión del ciclo celular. Un ejemplo claro es el sistema nervioso, en el cual Notch promueve la diferenciación de varios tipos celulares de la glía, incluyendo astrocitos, células de Schwann, de Müller y radiales.

En la tabla 5, se muestran los diferentes tipos de receptores Notch al igual que sus ligandos y su expresión en diferentes tipos celulares.

Tabla 5 Expresión de las proteínas Notch y sus ligandos.

RECEPTORES	EXPRESION CELULAR
NOTCH-1	<p>Linfocitos T en desarrollo [De la Coste et al, 2006]. Células del estroma de MO humano, células del endotelio de la vena de cordón umbilical humano (HUVECs), células hematopoyéticas de SCU CD34+CD38-Lin-, CD34+CD38+Lin-, células mieloides maduras CD33+, células T CD3+, células B CD19+ [Karanu et al, 2000]. Línea celular Jurkat [Milner et al, 1994]. Células mesenquimales de SCU [Yan-hua et al, 2010] Desarrollo vascular, renal y hepático, durante la hematopoyesis embrionaria y adulta, células de hígado fetal en ratón [Sugimoto et al, 2002].</p>
NOTCH-2	<p>Expresión débil en timocitos, células B (pro-B, 2006]. Poblaciones celulares hematopoyéticas de SCU CD34+CD38-Lin- y, CD34+CD38+Lin-, células mieloides maduras CD33+, células T CD3+, células B CD19+ [Karanu et al, 2000]. Células mesenquimales de SCU [Yan-hua et al, 2010]. Morfogénesis dental, desarrollo vascular, renal y hepático. Durante la hematopoyesis embrionaria y adulta, células de hígado fetal en ratón [Sugimoto et al, 2002].</p>
NOTCH-3	<p>Timocitos [De la Coste et al, 2006]. Neurogenesis y adipogenesis. Desarrollo vascular, renal y hepático, durante la hematopoyesis embrionaria y adulta [Sugimoto et al, 2002].</p>
NOTCH-4	<p>Desarrollo vascular, renal y hepático, durante la hematopoyesis embrionaria y adulta [Sugimoto et al, 2002].</p>

LIGANDOS	EXPRESION CELULAR
JAGGED-1	<p>Células del estroma de la MO (ratón y humano) [Walker et al,1999]. Epitelio del timo, células del endotelio de la vena de cordón umbilical humano (HUVECs), células hematopoyéticas de SCU CD34+CD38-Lin-, CD34+CD38+Lin-, células mieloides maduras CD33+, células T CD3+, células B CD19+ [Karanu et al, 2000]. Línea celular HS-27 [Iwata et al, 2004], AC-6, ALC5 y TC1 [Walker et al, 1999; Karanu et al, 2000]. Células mesenquimales de SCU [Yan-hua et al, 2010]. Osteoblastos en MO así como líneas celulares osteblásticas [Sugimoto et al, 2006].</p>
JAGGED-2	<p>Células linfoides, timocitos [De la Coste et al,2006]. Células estromales de hígado fetal, medula ósea y timo [Sugimoto et al, 2006].</p>
DELTA-1	<p>Células del estroma del timo, hígado fetal y medula ósea.[De la Coste et al, 2006; Sugimoto et al, 2006] Células mesenquimales de SCU [Yan-hua et al, 2010].</p>
DELTA-2	<p>Células del estroma de MO [Sugimoto et al, 2006].</p>
DELTA-4	<p>Expresado en sitios hematopoyéticos tales como: timo, medula ósea, nódulo linfático e hígado fetal [Sugimoto et al, 2006].</p>

II. ANTECEDENTES

Las CTH son definidas por su habilidad para regenerar todos los linajes hematopoyéticos *in vivo* [Wognum et al, 2003]. La autorrenovación y diferenciación de células troncales está influenciada por múltiples factores, incluyendo interacciones con células adyacentes, citocinas, polipéptidos, factores de crecimiento, hormonas, matriz extracelular y estímulos del microambiente que los rodea [Ganapati et al, 2007; Yan-hua et al, 2010].

El microambiente hematopoyético, es una mezcla compleja de células y factores, críticos para la regulación de la hematopoyesis. Los estudios *in vitro* del microambiente hematopoyético han empleado cultivos primarios de médula ósea a largo plazo, en los que están presentes componentes no hematopoyéticos (fibroblastos, adipositos, osteoblastos, y células endoteliales), así como hematopoyéticos, incluyendo monocitos y macrófagos.

Las condiciones de cultivo capaces de aumentar el número de CTH y que no induzcan la diferenciación ni la pérdida de la función de células troncales, aún no han sido halladas con el solo uso de citocinas individuales o combinadas [Karanu et al., 2000]. En años recientes, numerosos factores de crecimiento solubles han sido caracterizados, así como moléculas efectoras de maduración hematopoyética. Los efectos de los factores estimulantes de colonias conocidos por su habilidad para inducir la proliferación y diferenciación de progenitores comprometidos, pueden ser sinérgicamente incrementados por interleucinas como IL-1, IL-4 e IL-6 así como el factor de células troncales (SCF) y el ligando de Flt3. También se ha descrito que las interacciones célula-célula entre las CTH y las células del estroma de la MO son necesarias para incrementar la sobrevivencia de las células troncales.

In vivo, las CTH están fuertemente adheridas a las células del estroma de la MO; *in vitro* el contacto con las células del estroma es requerido para el mantenimiento de los cultivos a largo plazo. Una molécula candidata que puede estar implicada en estas interacciones es el receptor Notch. Se ha sugerido que Notch desempeña un papel importante en el desarrollo, regulando numerosos tipos de decisiones del destino celular [Walker et al, 1999].

En la hematopoyesis, las señales de Notch regulan el desarrollo y diferenciación de múltiples tipos celulares, incluyendo el de células B, T, monocitos, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos y células natural Killer [Neves et al, 2006; Ganapati et al, 2007]. Bernstein y cols., realizaron los primeros estudios donde se demostraba la expresión de Notch en precursores hematopoyéticos CD34⁺ y su papel como mediador de las decisiones del destino celular durante la hematopoyesis. Usando oligonucleótidos degenerados correspondientes a la secuencia de aminoácidos conservada de la proteína Notch y con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), demostraron la expresión del homólogo de Notch en humano, anteriormente identificado como *TAN-1*, en células CD34⁺ de MO. El análisis de la población de células hematopoyéticas de MO usando transcripción reversa-PCR (RT-PCR) confirmó que *TAN-1* es expresado en precursores CD34⁺, incluyendo a la subpoblación CD34⁺ lin⁻. Esta observación sugirió que los homólogos de Notch juegan un papel en mediar eventos de diferenciación temprana en la hematopoyesis [Milner et al, 1994]. Años más tarde, Duncan y colaboradores, demostraron la activación de la ruta de Notch en las CTH localizadas en el nicho de la MO, sugiriendo un papel definitivo de estas señales en la diferenciación y mantenimiento de las CTH [Neves et al, 2006; Ganapati et al, 2007].

Los diferentes receptores y sus ligandos tienen efectos diferenciales en distintos microambientes hematopoyéticos y estadios de la diferenciación celular. Por ejemplo, Notch-1 compromete al progenitor linfoide común dentro del linaje de células T/NK, a expensas del linaje de células B y es esencial para la generación de células troncales hematopoyéticas definitivas en embriones de ratón, mientras que Notch-2 promueve el desarrollo de la zona Marginal de células B en el bazo [Maillard et al, 2008] sin afectar el desarrollo de células T en el timo. Experimentos in vitro donde la actividad de Notch-1 fue expresada en líneas celulares y/o células primarias han demostrado que la actividad de Notch-1 expande el compartimiento de células troncales, bloqueando o retrasando la diferenciación mieloide [Neves et al, 2006].

El grupo de Walker demostró que las señales de Notch pueden actuar como un modulador de las señales del Factor de Células Troncales (SCF), y que en ausencia de factores de crecimiento recombinantes, la ruta de Notch-Jagged-1 actúa para preservar a la población CD34+ en un estadio inmaduro. Estos resultados mantienen la noción de que las señales de Notch participan en los eventos más tempranos en el comprometimiento de las CTH [Walker et al, 1999]. Por otro lado, el grupo de Iwata Mineo, encontró que la producción de OPN (Osteopontin) en los co-cultivos puede disminuir la expresión del gen Notch-1 en células CD34+. Sus datos sugieren que la producción de OPN en el microambiente puede funcionar reduciendo las señales de Jagged1/Notch-1. Los monocitos liberan OPN en el microambiente, reduciendo por lo tanto la producción de Notch-1 por parte de las células progenitoras, dando como resultado una gran proporción de células progenitoras restringidas a la diferenciación mieloide [Iwata et al., 2004].

La inducción de las señales de Notch-1 en las CTH y CPH provoca una disminución en la diferenciación terminal, previniendo el agotamiento de las CTH en toda la vida del organismo [De la Coste et al, 2006]. Experimentos de ganancia funcional (Gain-of-function experiments) sugieren que las señales de Notch aumentan la autorrenovación y disminuyen la diferenciación de progenitores hematopoyéticos [Maillard et al., 2008]. Niveles elevados de señales de Notch fueron detectados a través de exposiciones de progenitores a ligandos de Notch *in vitro*, al igual que la sobreexpresión “río-abajo” de los genes blanco como HES. Estos estudios muestran que la manipulación experimental que incrementa las señales de Notch, también aumenta la autorrenovación de progenitores primitivos hematopoyéticos [Maillard et al., 2008].

También se han reportado diferentes acciones en los ligandos de Notch. Por ejemplo, Delta-1, pero no Jagged-1, inhibe completamente la diferenciación de CD34+ a linaje de células B, mientras que promueve su desarrollo en células precursoras T/NK que son capaces de diferenciarse en células T terminales *in vitro* e *in vivo* [Wang et al., 2006]. También se observó que las CFU-M derivadas de células CD34+ fueron más abundantes que las CFU-G. Este

desequilibrio desaparece, cuando las células CD34⁺ se ponen en contacto con el ligando Jagged-1, donde decrece el compartimiento de CFU-M e incrementa las CFU-G. Es decir, se observa un efecto contrario. Por otro lado cuando progenitores maduros CD34⁺CD38⁺ se ponen en contacto con el ligando Delta-1 disminuye la generación de CFU-GM. Estos resultados sugieren que los efectos del ligando Delta-1 deben iniciar después del estadio de las células troncales, posiblemente a nivel progenitor pluripotente mieloide [Neves et al, 2006].

Delta-1 también ha demostrado tener efectos proliferativos y anti-diferenciadores en células troncales hematopoyéticas. Jagged-1, por su parte, cuando se encuentra bajo ciertas combinaciones de citocinas puede incrementar la proliferación de progenitores bipotentes y unipotentes mieloides [Neves et al, 2006].

Estudios realizados en cultivos de poblaciones celulares CD34⁺CD38⁻ provenientes de SCU, en presencia de diferentes densidades de Delta-1^{ext-IgG}, encontraron que, densidades relativamente bajas Delta-1^{ext-IgG}, promueven la generación de células precursoras CD34⁺, incluyendo células con actividad de repobladoras de ratones NOD/SCID. En cuanto a la generación de precursores linfoides tempranos, fueron similar en todas las densidades del ligando Delta-1^{ext-IgG}. Las densidades altas de Delta-1^{ext-IgG}, fueron asociadas con una disminución de la generación de células mieloides y el incremento de apoptosis de células CD34⁺ y células repobladoras. Estos estudios sugieren la importancia de la densidad del ligando Delta-1^{ext-IgG} en la diferenciación y destino celular [Delaney et al, 2005].

Otro ligando de Notch que se encuentra expresado en células estromales es Delta-4, y se ha reportado que su expresión en el estroma reduce la capacidad de proliferación de las CTH favoreciendo la autorrenovación *in vitro* [Lahmar et al, 2008].

Además de las formas unidas a la membrana de los ligandos de Notch, la existencia de las formas solubles ha sido demostrada en *C. elegans*, *Drosophila* y propuestas en vertebrados, sin embargo, el papel fisiológico de

estos ligandos solubles sigue siendo controversial. Aunque algunos estudios sugieren que estos son capaces de activar a los receptores Notch, otros sugieren que actúan como antagonistas de las señales de Notch impidiendo la interacción con sus receptores. Un estudio realizado por el grupo de Lahmar M., observaron que la expresión de Delta-4 unida a la membrana de células estromales S17 reduce la proliferación de la población celular CD34⁺CD38^{low}, favoreciendo la autorrenovación. Cuando midieron los efectos de las formas solubles de Delta-4, encontraron que estos incrementan la proliferación celular, pero no preserva a las células formadoras de colonias ni su potencial de células iniciadoras de cultivos a largo plazo [Lahmar et al, 2008].

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la última década, se ha generado gran interés sobre la expansión de células troncales y progenitoras hematopoyéticas humanas, no solo de medula ósea sino también de sangre de cordón umbilical; esto es debido al hecho de que ésta última representa una excelente fuente de células hematopoyéticas para trasplantes. Por ello, varios grupos de investigación, incluido el nuestro, nos hemos dedicado al desarrollo de las condiciones óptimas de cultivos para la expansión *in vitro* de estas células.

Las condiciones experimentales descritas hasta la fecha han consistido en sistemas de cultivo usando citocinas recombinantes, factores de crecimiento, en algunos casos anticuerpos contra inhibidores hematopoyéticos, y se han empleado capas de líneas estromales adherentes, de las cuales las más frecuentemente utilizadas son M2-10B2, AFT024, MS-5, HS-5, L87/4, FBMD-1, SC9-19 y OP9; también diferentes tipos de células estromales incluyendo estroma de MO, células endoteliales y células mesenquimales (MSC), este último proveniente de diferentes tejidos. Varios estudios han demostrado que las células del estroma son capaces de promover la expansión *ex vivo* de células troncales y progenitoras, un proceso que puede involucrar tanto al contacto célula-célula como la secreción de citocinas [Flores-Guzmán et al., 2002; Flores-Guzmán et al., 2009].

Aunque se han reportado incrementos muy significativos en el número de células progenitoras hematopoyéticas, los incrementos en el número de células troncales hematopoyéticas son muy limitados; además, las condiciones y mecanismos que controlan su proliferación, expansión y diferenciación actualmente no son del todo claros [Sugiki, et al., 2007; Yoshimoto et. al., 2009]. Nuestro grupo, previamente reportó la caracterización *in vitro* de dos poblaciones celulares hematopoyéticas derivadas de SCU, crecidas en cultivos líquidos suplementadas con citocinas recombinantes [Flores-Guzmán et al., 2005]; más tarde, se midieron los efectos de las MSC en combinación con citocinas recombinantes en el crecimiento de ambas poblaciones hematopoyéticas derivadas de SCU [Flores-Guzmán et al., 2009].

Siguiendo por el mismo camino, y tratando de contribuir a nuestro conocimiento sobre el papel de Notch y sus ligandos en el sistema hematopoyético humano, en este trabajo medimos los efectos de la línea celular OP9, transducida con el gen Delta-1 (OP9-DL1) o solo con el vector (OP9-V), en el crecimiento *in vitro* de dos poblaciones celulares hematopoyéticas CD34⁺ purificadas por FACS provenientes de SCU.

La línea celular OP9, es una línea estromal de medula ósea de ratón osteopetrótico, deficiente del factor estimulante de colonias de macrófagos (FSC-M). Las OP9, presentan el inmunofenotipo (CD45⁻, cd11b⁻, FLK-1⁻, CD31⁻ CD34⁻, CD44⁺, CD29⁺, Sca-1⁺, CD86⁻, y MHCII⁻) y expresa el ligando de Notch Jagged-1 [Gao et al, 2010; Schmitt et al, 2002]. La línea celular OP9 ha facilitado el estudio de mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y diferenciación de las células hematopoyéticas, y ha demostrado tener habilidad para soportar la hematopoyesis humana [Sugiki, et al., 2007; Yoshimoto et. al., 2009]. Por ejemplo la diferenciación de células de linaje T y B pueden ser fácilmente estudiadas *in vitro* usando los sistemas de co-cultivo con OP9-DL1 (que sobre expresa el gen Delta-1) y OP9, respectivamente. [Gao et al., 2010; Schmitt et al., 2002; Zúñiga-Pflücker., 2004; Awong et al., 2009].

Hasta ahora es muy controversial la utilización de la línea celular OP9 en el crecimiento del linaje mieloide, por lo que es de nuestro interés conocer si bajo nuestras condiciones de cultivo se ve favorecido su crecimiento, y lo más interesante es saber si la línea celular OP9 es capaz de mantener a las poblaciones primitivas (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) e intermedias (CD34⁺CD38⁺Lin⁻) provenientes de sangre de cordón umbilical en un estado indiferenciado. Lo que nos permitiría tener un modelo de expansión de células hematopoyéticas.

ACLARACION:

Es importante aclarar que inicialmente pretendíamos enfocar nuestros estudios al receptor Notch-1, pero las condiciones se dieron para estudiar la línea celular OP9 que expresa al ligando de Notch-1 (Jagged-1) y la línea OP9 transducida con el gen Delta-1 (OP9-DL1) y sus efectos sobre dos poblaciones celulares hematopoyéticas provenientes de sangre de cordón umbilical. Por lo que el título sugerido finalmente de la tesis fue: **“Efectos de la expresión de Delta-1 y Jagged-1, en el crecimiento de dos poblaciones celulares hematopoyéticas CD34+ provenientes de sangre de cordón umbilical”**. Sin embargo, por cuestiones administrativas del Posgrado en Ciencias Biomédicas, la tesis no pudo registrarse con este título.

IV. HIPOTESIS

La sobre expresión de Delta-1, favorecerá la expansión de la población más primitiva CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y disminuirá su diferenciación a progenitores comprometidos. Por otro lado, en la población CD34⁺CD38⁺Lin⁻ la sobre expresión de Delta-1 favorecerá la proliferación y la diferenciación a estadios celulares más comprometidos.

V. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Estudiar los efectos de la línea celular OP9, que sobre expresa el gen Delta-1, en el crecimiento *in vitro* de dos poblaciones celulares hematopoyéticas CD34⁺ purificadas por FACS provenientes de SCU.

5.2 PARTICULARES

- I. Analizar la expresión de los genes *Delta-1* y *Jagged-1* y de sus proteínas en las células de la línea estromal OP9, modificada para que sobre-exprese el gen *Delta-1* (OP9-DL1) y en la línea celular que expresa solo el vector vacío (OP9-V), por el método de PCR- tiempo real y Western Blotting respectivamente.
- II. Separación de dos poblaciones celulares hematopoyéticas primitivas CD34⁺ (CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻) a partir de SCU, por citometría de flujo (FACS).
- III. Evaluar la cinética de proliferación y expansión de las poblaciones celulares hematopoyéticas primitivas CD34⁺ co-cultivadas con células estromales OP9-DL1 u OP9-V y en presencia de 7 citocinas recombinantes hematopoyéticas.
- IV. Analizar la expresión de Notch-1 a nivel proteína en las poblaciones celulares hematopoyéticas primitivas CD34⁺ co-cultivadas con células estromales OP9-DL1 y OP9-V y en presencia de 7 citocinas recombinantes hematopoyéticas por citometría de flujo.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención del material biológico

Se recolectaron muestras de SCU de nacimientos normales a término, tanto de cesáreas como partos normales, de acuerdo con las normas instituciones del Hospital de Zona Troncoso (IMSS). La SCU fue recolectada en bolsas especiales para SCU con 63 ml de anticoagulante CPD (citrato, dextrosa, fosfato sodio monobásico) (BLORECEP, México). Se recolectaron muestras con un volumen de 60 a 80 ml.

6.2 Obtención de células mononucleares de SCU

Las células mononucleares se obtuvieron utilizando un gradiente de densidad (Ficoll-PaqueTM plus GE Healthcare Bio-Sciences AB) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se colocaron 20 ml de solución de Ficoll-Paque en tubos Falcon de 50 ml; a cada tubo se le adicionó lentamente 30 ml de SCU previamente diluida v/v con solución PBS pH 7.4 (GIBCO Grand Island NY USA). Los tubos se centrifugaron por 30 minutos a 375 g. Las células mononucleares se obtuvieron de la fase intermedia del gradiente y se lavaron dos veces con solución PBS centrifugando entre cada lavado por 9 minutos a 240 g. Finalmente, las células mononucleares se resuspendieron en 1ml PBS.

6.3 Conteo celular y evaluación de la viabilidad celular

El conteo celular se realizó haciendo una dilución 1:10 con solución de Turk 3% (Ac. Acético con azul de metileno) (Stem Cell Technologies Vancouver, BC). Se colocaron 10 µl de la dilución en un hemocitómetro y las células se contaron en los 4 cuadrantes de las esquinas del hemocitómetro empleando un microscopio óptico (Leica) con el objetivo 10x. El número de células obtenidas se multiplicó por 10 (factor de dilución), por 10,000 (volumen cargado en la cámara) y por el volumen total de la muestra en mililitros. La

viabilidad celular fue evaluada por exclusión con azul de tripano (GIBCO Invitrogen Grand Island N.Y. USA) en un hemocitómetro.

6.4 Enriquecimiento de células CD34+:

Para el enriquecimiento de la población celular CD34+, se utilizó una selección negativa (Easy Sep) (Stem Cell Technologies Vancouver, BC) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las células mononucleares previamente obtenidas, fueron resuspendidas en medio PBS al 2% de suero fetal bovino (GIBCO Invitrogen Corporation Grand Island N.Y.) y 1mM de EDTA (SIGMA Chemical USA) a una concentración de 5×10^7 células/ml. La suspensión fue colocada en un tubo de poliestireno estéril de 12x75 mm (Becton Dickinson Franklin Lakes, USA). Se adicionó 50 μ l/ml de cocktail de anticuerpos que reconocerán a CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD41, CD56, CD66b, además de contener Glycoforina A y dextrano (Stem Cell Technologies Vancouver, BC). Se resuspendió varias veces con ayuda de una pipeta y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Después de este tiempo, se adicionó 50 μ l/ml de nanopartículas magnéticas (Stem Cell Technologies Vancouver, BC) previamente mezcladas uniformemente. La suspensión celular se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente la suspensión se llevó a un volumen total de 2.5 ml adicionando PBS con 2% de suero fetal bovino (GIBCO) y 1mM de EDTA (SIGMA-Aldrich), resuspendiendo por pipeteo. La suspensión celular se incubó a temperatura ambiente dentro de un magneto (Stem Cell Technologies Vancouver, BC) por 10 minutos. Posteriormente la suspensión celular junto con el magneto fueron inclinados rápidamente y la fracción no adherida fue recolectada en otro tubo de poliestireno estéril de 12x75 mm (Becton Dickinson). Las células se lavaron con PBS por 5 minutos a 240 g. se resuspendieron en PBS con 2% de SFB y por último se cuantificaron y se evaluó la viabilidad celular.

6.5 Ensayos de formación de colonias

Para conocer el número de células hematopoyéticas capaces de formar colonias *in vitro* (UFC) presentes en las poblaciones trabajadas, se realizaron cultivos semi-sólidos sobre metilcelulosa (que contiene 30% de SFB, 1% de albúmina sérica bovina, 2-mercaptoetanol 10^{-4} mM, 2 mM de L-glutamina, 50 ng/ml de SFC, 10 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de GM-CSF y 3 UI/ml de EPO) (Stem Cell Technologies Vancouver, BC).

Dependiendo del tipo de células a evaluar el número de células a sembrar fue la siguiente: para células mononucleares se sembraron 50,000 células; para poblaciones enriquecidas CD34+ 1000 células y para poblaciones purificadas de 500 a 1000 células.

Las células fueron adicionadas en 1ml de metilcelulosa, agitando la suspensión de dos a tres segundos, y se dejó reposar. Las células fueron transferidas a una placa para cultivo de 35x10 mm (Becton Dickinson) evitando la formación de burbujas. Las placas fueron incubadas en una cámara húmeda a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Después de 14 días, las colonias formadas se contaron con ayuda de un microscopio invertido (OLYMPUS CK2). Las colonias hematopoyéticas fueron evaluadas de acuerdo con los criterios internacionales, ubicándolas dentro de la siguiente clasificación:

UFC-MIX	Colonias que contienen células mieloides y eritroides.
UFC-E	Colonias o grupos de células eritroides con más de 50 células con evidencia de hemoglobinización.
UFC-G	Colonias que contienen células mieloides (granulocitos)
UFC-M	Colonias que contienen células monocíticas
UFC-GM	Colonias que contienen ambas poblaciones (granulocitos y monocitos)

6.6 Separación de las poblaciones CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻ por citometría de flujo

Para la separación de las poblaciones CD34⁺CD38⁻ y CD34⁺CD38⁺ se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD34-APC (BD PharmingenTM), anti-CD38-FITC e Isotipo IgG1 (CALTAGTM). En una campana de flujo laminar clase II (ESCO), las células previamente enriquecidas fueron resuspendidas en 100 µl de PBS y 3% SFB e incubadas con 2 µl de anticuerpo, a 4°C por 30 minutos y protegidas de la luz. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas con 300 µl de PBS y 3% SFB. El análisis y la separación celular se realizaron en un equipo (BD FACSAria), obteniéndose un 99% de pureza para ambas poblaciones.

6.7 Cultivos celulares

6.7.1 Cultivos en presencia de estroma

En placas para cultivo de 24 pozos (Becton Dickinson NJ, USA) se sembraron a las poblaciones celulares CD34⁺CD38⁺ y CD34⁺CD38⁻ a una densidad de 5,000 a 20,000 células por ml por pozo, en capas de células de estroma de MO de humano (células mesenquimales MSC) o de línea celular de ratón OP-9 (OP9-DL1 o OP9-V), sembradas con anterioridad en cada pozo. El medio de cultivo consistió en 1ml de medio α-MEM con 10% de SFB (GIBCO), suplementado con un cóctel de citocinas recombinantes: Factor de Células Troncales (SCF, 10ng/ml), IL-6 (10ng/ml), Trombopoyetina (TPO, 10ng/ml), Flt-3 (10ng/ml), G-CSF (10ng/ml), GM-CSF (10ng/ml) e IL-3 (10ng/ml); todas las citocinas se obtuvieron de Stem Cell Technologies Vancouver, BC. Las células se incubaron por 7 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, haciendo cambio de medio al tercer día de incubación.

Después de 7 días, se retiró el medio de cada pozo y se le adicionó 300 µl de tripsina-EDTA (GIBCO) para despegar las células adheridas, se incubaron por 5 minutos a 37°C (en caso de que fuera necesario, se repitió la incubación con 300 µl tripsina-EDTA (GIBCO)). Las células se resuspendieron

en 1 ml de medio α -MEM 10% SFB y se centrifugaron por 5 minutos a 240 g. Se realizó un lavado con PBS para eliminar la mezcla enzimática. Las células fueron filtradas con una malla de 100 μ m para eliminar aglomerados celulares, para finalmente ser resuspendidas en PBS con 2% de suero fetal bovino y EDTA (1 mM; SIGMA-Aldrich). Se realizó el conteo celular y determinación de la viabilidad.

Líneas celulares OP9-Delta-1 (OP9-DL1) y OP9-vector (OP9-V). La línea celular OP9 es una línea celular estromal que proviene de MO de ratón osteopetrótico; el co-cultivo de éstas células con CTH y CPH (proveniente de timo fetal, hígado fetal y de SCU) ha demostrado tener efecto sobre su diferenciación *in vitro*.

Ambas líneas fueron donadas amablemente por el Dr. Paul W. Kindase (Oklahoma Medical Research Foundation). Las células fueron descongeladas y sembradas en medio α -MEM con 10% de SFB.

La metodología de la transfección se describe en artículo publicado por Schmitt et al., 2002.

6.7.2 Cultivos en ausencia de estroma

Las poblaciones celulares $CD34^+CD38^{\text{Lin}^-}$ y $CD34^+CD38^{\text{Lin}^-}$ purificadas, fueron cultivadas en placas de 12 pozos a una densidad de 5,000 a 20,000 células por pozo. A cada pozo se le adicionó 1ml de medio líquido α -MEM con 10% de SFB (GIBCO), suplementado con el mismo cóctel de citocinas empleado en los ensayos en presencia de estroma. Al igual que en los cultivos en presencia de estroma, las células se incubaron por 7 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y se realizó cambio de medio al tercer día de incubación. Posteriormente fueron sacadas de los pozos y centrifugadas por 5 minutos a 240g. Las células fueron resuspendidas en PBS con 2% de

suero fetal bovino y EDTA (1mM; SIGMA-Aldrich). Por último, se realizó el conteo celular y determinación de la viabilidad.

6.8 Análisis de la expresión de la proteína Notch-1 por citometría de flujo

La expresión de la proteína Notch-1 fue analizada en las poblaciones CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻ al día 0 y después de 7 días de cultivo por citometria de flujo (BD FACS Calibur). Las células fueron marcadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD34-APC (BD PharmingenTM), anti-CD38-FITC, Isotipo IgG1-PE (CALTAGTM), anti-Notch-1-PE intracelular (BD PharmingenTM).

6.8.1 Tinción celular

En una campana de flujo laminar clase II (ESCO) las células fueron resuspendidas en 100 µl de PBS con 3% de SFB (el número de células en los tubos fue variable de acuerdo con el número de células recuperadas antes y después de los cultivos (de 100,000 a 1x10⁶ células); se adicionaron 10 µl de IgG humano (Beriglobina ® P 330mg/2ml), y se incubó a 4°C por 15 minutos (bloqueo de los receptores Fc). Trascurrido este tiempo las células se lavaron con 1 ml de PBS y se centrifugaron por 5 minutos a 375g. Las células fueron incubadas en 2 µl de su anticuerpo correspondiente a 4°C por 30 minutos y protegidos de la luz. Posteriormente las células fueron lavadas y se resuspendidas en 100 µl de PBS con 3% SFB.

6.8.2 Tinción intracelular

Después de la tinción extracelular se realizó una tinción intracelular para la determinación de la proteína Notch-1. Las células fueron fijadas con 500 µl de paraformaldehído frio, agitando en un vortex por 2-3 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Después de este tiempo, se lavaron dos veces con PBS centrifugando entre cada lavado por 7 minutos a

200 g. Se decantó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió con 1 ml de buffer SAP (saponina al 0.1% disuelta en medio HANKS) (GIBCO); las células fueron agitadas en vortex y se centrifugaron por 5 minutos a 200 g. Nuevamente, las células fueron bloqueadas con 10 µl IgG y se dejaron por 15 minutos; se lavaron con PBS, centrifugándolas por 5 minutos a 375 g. Las células fueron resuspendidas con PBS con 3% SFB y se adicionó 3 µl de anticuerpo intracelular Notch-1. Se incubaron por 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron con PBS con 3% SFB. Las células fueron analizadas por citometría de flujo (BD FACS Calibur).

6.9 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó utilizando dos métodos: con un kit RNasy® Micro (QIAGEN), para muestras con un número menor de 500,000 células y el método con TRIPURE (Roche) para muestras por arriba de 500,000 células.

6.9.1 METODO I.

Extracción de RNA por kit RNasy® Micro (QIAGEN). Las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 334 g. (BIOFUGA Heraeus; Kendro) y el sobrenadante fue removido. Se adicionó 350 µl de buffer RTL (previamente preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante; (QIAGEN) y se mezcló por 1 minuto con un vórtex. Se adicionaron 350 µl de Etanol al 70% (SIGMA), se mezcló por pipeteo y la suspensión celular se transfirió a una columna (QIAGEN) para ser centrifugada 15 segundos a 10,000 g. Se decantó el sobrenadante, se adicionó 350 µl de buffer RW1 (QIAGEN) y se centrifugó 15 segundos a 10,000 g. Se decantó el sobrenadante y se le agregó 80 µl de DNasa (previamente preparada de acuerdo a las especificaciones del fabricante; QIAGEN) se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 350 µl de buffer RW1 (QIAGEN) y se centrifugó por 15 segundos a 10,000 g. La columna se transfirió a un nuevo tubo colector (QIAGEN), se adicionaron 500 µl de buffer RPE y se centrifugó 15 segundos a

10,000 g. Se decantó el sobrenadante, se agregaron 500 µl de etanol al 80% y se centrifugó 2 minutos a 10,000 g. La columna se transfirió a un nuevo tubo colector (QIAGEN) se dejó abierta la tapa del ependorff y se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad. La columna se transfirió a otro tubo ependorff, donde se adicionaron 14 µl de agua libre de RNAsas (QIAGEN) en el centro de la membrana, se tapo y se centrifugo 1 minuto a máxima velocidad. Por último, el RNA fue cuantificado haciendo una dilución 1:50 con agua DEPEC y se leyó en un espectrofotómetro (MBA 2000, Perkin Elmer); la integridad del RNA fue analizada por medio de geles de agarosa al 1.5%.

6.9.2 METODO II.

Extracción de RNA con TRIPURE. A las muestras celulares recién obtenidas se les adicionó 750 µl de buffer de lisis TRIPURE (Roche) y se mezcló por 1 minuto en vortex. Se Adicionó 200 µl de cloroformo (SIGMA-Aldrich), se mezcló por 15 segundos por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos; posteriormente se centrifugó por 15 min a 10,000 g a 4°C (Biofuga Heraeus, Kendro). Se obtuvo la fase acuosa superior, se adicionó 500 µl de isopropanol (SIGMA-Aldrich) se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos posteriormente se centrifugó 10 minutos a 10,000 g a 4°C. Se adicionó 750µl de etanol (SIGMA-Aldrich) al 75% y se lavaron por 2 veces con etanol (SIGMA-Aldrich) al 75% por 15 minutos a 10,000 g. Los tubos con RNA se dejaron con la tapa abierta por 15 minutos para dejar que el etanol se terminara de evaporar. El RNA se disolvió en 20 µl de agua DEPEC y se incubó por 10 minutos a 60°C. Por último el RNA fue cuantificado haciendo una dilución 1:50 con agua DEPEC y se leyó en un espectrofotómetro 260 y 280 nm (MBA 2000; Perkin Elmer). La integridad del RNA fue analizada por medio de geles de agarosa al 1.5%

6.10 Métodos de obtención de cDNA:

6.10.1 METODO I.

En un tubo ependorff se preparó la siguiente mezcla:

REACTIVOS (INVITROGEN)	VOLUMEN
Random Primers (3µg/ µl)	1 µl
RNA total (de 1 gr a 5 µg)	
dTPmix (10mM)	1 µl
Agua DEPC	

Se llevó a un volumen final de 12 µl, se incubó a 65°C por 5 minutos en un termo-block (Multiblok, Lab-Line) y posteriormente, se incubó en hielo por 1 minuto.

En un tubo eppendorf se preparó la siguiente mezcla:

REACTIVOS (INVITROGEN)	VOLUMEN
Buffer 5X	4 µl
DTT (0.1M)	2 µl
RNasa (40 U/ µl)	1 µl

La mezcla se agregó al primer tubo y se incubó a 37°C por 2 minutos. Se adicionó 1 µl de enzima M-MLV reverso transcriptasa (Invitrogen), se mezcló y el tubo se colocó en un termociclador (PCR System 9700 Gene. Amp Applied

Biosystem) con los siguientes parámetros: 25°C (10 min), 37°C (50 min) y 70°C (15 min) y 4°C (∞). El cDNA se cuantificó en un espectrofotómetro 260 y 280 nm (MBA 2000, Perkin Elmer) a una dilución 1:50 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.10.2 METODO II.

En un tubo ependorff se preparo la siguiente mezcla:

REACTIVOS (PROMEGA No. C110A)	VOLUMEN
2 µg de RNA total	
1 µg de oligos de dT (500 µg/ml)	2 µl

Se llevó a un volumen de 15 µl con agua grado mili-Q.

La reacción se calentó a 70°C por 5 minutos. Posteriormente, se enfrió en hielo por 10 minutos. El tubo se centrifugó por 1 minuto a 10,000 g.

Posterior a este tiempo se le adicionó:

REACTIVOS (PROMEGA No. C110A)	VOLUMEN
dNTP's	5 µl
M-MLV 5X Buffer	5 µl
25 U RNAsin (40U/ µl)	0.6 µl
200 U M-MLV RT (200U/ µl)	1 µl

Se llevó a 25 µl con agua grado mili-Q. La reacción se mezcló e incubó por 60 minutos a 42°C.

Por último el cDNA fue cuantificado haciendo una dilución 1:50 con agua DEPEC y se leyó en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm (MBA 2000; Perkin Elmer).

6.11 PCR-tiempo real cuantitativa

La PCR-tiempo real cuantitativa se realizó usando un sonda TaqMan®. Las secuencias de las sondas utilizadas fueron las siguientes: **Notch-1**
Forward CGACGTCAACGCCGTAGAT Reverse
GCGGCATCCACATTGTTTAC marcado con FAM. Como control se utilizó el gen endógeno **GAPDH** (Applied BioSystems con el numero de catalogo NM_002046.3.)

En un tubo ependorff de 1.5 ml se realizó la siguiente reacción:

Buffer (TaqMan universal PCR Master Mix)	10 ml
Sonda Notch-1	1 µl
Sonda GAPDH	1 µl
Agua libre de RNasa	6 ml

Proteger de la luz. Todos los reactivos fueron de la marca Applied Biosystems.

A la mezcla descrita en el cuadro anterior, se le agregó 2 µl de cDNA y se mezcló. Cada reacción se hizo por triplicado. En una placa de 96 pozos (Applied Biosystems) se colocaron 20 µl. Su determinación y análisis fue en un equipo de Applied Biosystems -de acuerdo al protocolo del fabricante-. Los niveles de expresión del gen Notch-1 fueron normalizados al nivel de expresión del gen endógeno GAPDH humano. La expresión relativa de la expresión del gen mensajero Notch-1 fue calculada por la formula aritmética $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Posteriormente la expresión del gen Notch-1 del día 0 se tomo para normalizar la expresión del gen Notch-1 al día 7.

Para la determinación de la expresión de los ligandos de Notch por PCR-tiempo real, se utilizaron reactivos de Thermo Scientific (ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix Plus ROX Vial) siguiendo las condiciones que ellos recomiendan. Las reacciones se corrieron por triplicado en un termociclador StepOnePlus Real-Time System (Applied Biosystem). Al igual que con el receptor Notch, se utilizó como control endógeno el gen GAPDH. Las secuencias utilizadas fueron las siguientes: forward 5'-CATCTCTGCCCCCTCTGCTGA-3' y reverse 5'-GGATGACCTTGCCCACAGCCT-3'

La temperatura de alineamiento fue de 60 °C

Condiciones de amplificación:

95°C	15 minutos	1 ciclo
95°C	15 segundos	40 ciclo
60°C	1 minuto	40 ciclos

Primers utilizados para la expresión de los ligandos de Notch por PCR tiempo real

Delta-Like 1 humano GenBank Accession NM_005618	Forward TCCTGATGACCTCGCAACAGA Reverse ACACACGAAGCGGTAGGAGT
Jagged-1 humano GenBank Accession NM_000214	Forward TCGGGTCAGTTCGAGTTGGA Reverse AGGCACACTTTGAAGTATGTGTC
Delta-Like 1 ratón GenBank Accession NM_007865	Forward CAGGACCTTCTTTTCGCGTATG Reverse AAGGGGAATCGGATGGGGTT
Jagged-1 ratón GenBank Accession NM_013822	Forward CCTCGGGTCAGTTTGAGCTG Reverse CCTTGAGGCACACTTTGAAGTA

6.12 Obtención de células estromales

Las células estromales (MSC, OP9-V y OP9-DL1) adherentes fueron despegadas de las botellas de cultivo empleando 5 ml de medio D-MEM bajo en glucosa con tripsina al 0.05% por botella. Se incubaron 5 minutos a 37°C. Después a este tiempo se le adicionó 5 µl de SFB. Con ayuda de una pipeta de 10 ml las células fueron resuspendidas y depositadas en un tubo Falcon de 15 ml, las botellas fueron lavadas 1 vez con 1 ml de PBS estéril. Las células fueron centrifugadas 8 minutos a 240 g, se decantó el sobrenadante y la pastilla formada fue lavada con PBS y nuevamente centrifugada 8 minutos a 240 g se decantó el sobrenadante y con ayuda de una pipeta se retiró el medio restante.

6.13 Extracción de proteínas de membrana por el kit (ReadyPrep™ Protein Extraction Kit) Cat#163-2088 BIO-RAD

Después de despegar las células de las botellas de cultivo, al botón celular se le adicionó 0.5 ml de buffer M1 frío (por cada 0.005 ml del botón celular); en este paso se adicionó 20 µl de inhibidores de proteasas (Inh Prot. 25X COMPLETE). (Los buffer M1 y M2 deben de estar a 4°C antes de su uso). La suspensión celular fue sonicada en hielo por 3 minutos con intervalos de 30 segundos ON y 20 segundos OFF. Posteriormente, a la suspensión celular se le adiciono buffer M2 a un volumen igual al utilizado del buffer M1. La suspensión celular fue resuspendida por vortex por 4-5 tiempos, cada 60 segundos, con intervalos de 30 segundos manteniendo siempre el tubo en hielo. Después de este tiempo se dejó incubando por 10 minutos en hielo. Posterior a esta incubación las células fueron transferidas a un termo-block a 37°C dejándolas por 30 minutos; mezclando la suspensión por 30 segundos periódicamente (3-4 veces). La suspensión celular se centrifugó por 5 minutos a 16,000 g a temperatura ambiente. Se observaron dos fases, la fase de arriba fue trasferida a otro tubo limpio el cual fue marcado como proteínas hidrofílicas.

Al tubo que contiene la fase de abajo (proteínas hidrofóbicas) se le adicionó 0.5 ml de buffer M2 se resuspendió por vortex por 4-5 tiempos, cada 60 segundos, con intervalos de 30 segundos manteniendo siempre el tubo en hielo. Después de este tiempo se dejó incubando por 10 minutos en hielo. Posterior a esta incubación la suspensión celular fue transferida a un termo-block a 37°C dejándolas por 30 minutos; mezclando la suspensión por 30 segundos periódicamente (3-4 veces). La suspensión celular se centrifugó por 5 minutos a 16,000 g a temperatura ambiente, la fase de arriba fue trasferida al tubo que fue marcado anteriormente como proteínas hidrofílicas. La fase de abajo fue transferida a otro tubo nuevo y las proteínas obtenidas fueron purificadas utilizando un kit Cleanup (BIO-RAD cat.163-2130).

6.13.1 ReadyPre™ 2-D Cleanup Kit Cat. 163-2130 BIO-RAD

Las proteínas obtenidas fueron llevadas a un volumen final de 100µl. Se adicionó 300 µl de agente 1 precipitante, se mezcló por vortex y se incubó en hielo por 15 minutos. (Se recomienda no mezclar con pipeta en este y en los siguientes pasos para no perder muestra). Se adicionó 300 µl del agente 2 precipitante y se mezcló por vortex. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 16,000 g para formar un botón, se retiró rápidamente el tubo de la centrifuga para que el botón no se dispersara. Con una pipeta se eliminó el sobrenadante restante. Se adicionó el reactivo de lavado 1 encima del botón. Se centrifugó por 5 minutos a 16,000 g. Con una pipeta se retiró el sobrenadante. Se adicionó 25 µl de agua destilada o agua inyectable encima del botón. Se mezcló por vortex por un lapso de 10 a 20 segundos. Se adicionó reactivo de lavado 2 (previamente frío a -20°C por lo menos 1 hora antes de su uso) y se adicionó 5 µl de aditivo de lavado 2. Se mezcló por vortex por 1 minuto se incubó el tubo a -20°C por 30 minutos, cada 10 minutos el tubo fué mezclado por vortex por 1 minuto durante el periodo de incubación. Después de la incubación se centrifugó por 5 minutos a 16,000 g para formar un botón. Se decantó el sobrenadante y con una pipeta se removió el restante. Por último se dejó secar el botón por inversión por no más de 5 minutos (el botón se ve translucido) y se resuspendió con 50-100 µl de PBS ó con buffer de muestra Laemmli.

6.13.2 Extracción de Proteínas Totales por método Laemmli

Se lavaron las botellas que contienen las células adherentes con 1 ml PBS, a cada botella se le adicionó una mezcla que contiene buffer de carga 500 µl, inhibidores de proteasas 20 µl y β-mercapto se dejó actuar 2 minutos en hielo. Las células se despegaron con ayuda de un gendarme, depositas en un tubo eppendorf y pasadas varias veces en jeringas de diferentes calibres; por último, se pasó por una jeringa de insulina hasta que la mezcla pasara sin dificultad. Para verificar que las proteínas fueron extraídas correctamente la mezcla se calentó por 5 minutos y 10 µl de muestra fue corrida en un gel de

agarosa SDS-PAGE verificando su integridad. Las proteínas obtenidas se guardaron a una temperatura de -20°C para su posterior uso.

6.14 Western blotting

Gel de agarosa SDS-PAGE al 10%

Se marcaron 2 tubos Falcon de 15 ml (A: concentrador y B: separador) y se agregaron las siguientes cantidades en este orden:

A: CONCENTRADOR	ml	B: SEPARADOR	ml
Acrilamida 30% bisacrilamida 0.8% (fría)	0.65	Acrilamida 30% - bisacrilamida 0.8% (fría)	5.0
4x Tris Cl-SDS pH 6.8	1.25	4x Tris Cl-SDS pH 8.8	3.75
Agua	3.05	Agua	6.25
Persulfato de amonio al 10% (PSA)	0.025	Persulfato de amonio al 10% (PSA)	0.05
TEMED	0.005	TEMED	0.01

Por otro lado se limpiaron y ensamblaron los vidrios de 1 mm de grosor (BIO-RAD). Se verificó que los vidrios estuvieran bien ensamblados agregando agua entre los vidrios y posteriormente retirándola.

Primero se preparó el gel separador y se adicionó rápidamente entre los vidrios, posteriormente se adicionó 100 µl de metanol o isopropanol para emparejar el gel. Se esperó a que gelificara y se retiró quitando el exceso con

un pedazo de papel filtro. Se adicionó el gel concentrador y se colocó el peine de 10 carriles de 1mm de grosor y se dejó gelificar.

6.14.1 Preparación de proteínas

En tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 50 µg/µl de proteínas extraídas de las células problema (MSC, OP9 y OP-DL1) y se mezcló con el buffer de carga 1X a una relación 1:1. Los tubos se colocaron en agua hirviendo por 5 minutos y después en hielo por 1 minuto. Con ayuda de una pipeta se cargaron las muestras en cada pozo del gel al igual que su marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards No. Cat.161-0324 BIO-RAD). Se montó la cámara (BIO-RAD), se llenó con buffer de carga y se corrió a 100 V por aproximadamente 1 hora.

Después de este tiempo un gel fue teñido con colorante de azul de coomassie para ver la migración de las proteínas y el otro gel fue utilizado para la transferencia.

6.14.2 Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Se equilibró el gel recién corrido al igual que la membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia por lo menos 1 minuto y se cortaron 4 cuadros de papel filtro. En la cámara de transferencia (BIO-RAD) primero se colocaron 2 cuadros de papel filtro húmedos con buffer de transferencia y con ayuda de un rodillo se sacaron las burbujas, después se colocó la membrana de nitrocelulosa y encima el gel a transferir; por último, se colocaron 2 cuadros de papel filtro húmedo y nuevamente con el rodillo se retiraron las burbujas. Se colocó la plancha de la cámara, la tapa y se transfirió a 20 V por 20 minutos. Al término de la transferencia, la membrana se tiñó con colorante de rojo de Ponceau, se verificó la transferencia, se marcaron los carriles, se cortó cada carril en dos con el objetivo de un pedazo de tira utilizarlo para el control (α -tubulina y el otro para Jagged-1 ó Delta-1). Las tiras fueron desteñidas con PBS.

6.14.3 Incubación de las membranas con Ab's

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada reducida en grasa (Evelty light) al 5% diluida con TBS-Tween al 0.1% toda la noche a 4°C en agitación. Después de este tiempo se lavaron 3 veces con TBS-Tween al 0.1% por 10 minutos. Las membranas se incubaron con el primer anticuerpo a una dilución 1:50, para Jagged-1 de cabra (Santa Cruz sc-34474), para Delta-1 de ratón (Santa Cruz sc-73899) y una dilución 1:3000 para α -tubulina de ratón (Santa Cruz sc-8035) por 4 horas a 4 °C, transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-Tween al 0.1%. Las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-cabra-HRP (sc-2354) para Jagged-1 a una dilución 1:10,000, anti-ratón-HRP para Delta-1 y α -tubulina a una dilución 1:3000 (sc-2005) por 2 horas a T.A. en agitación, posterior a este tiempo las membranas se lavaron 5 veces por 10 minutos el último lavado se realizó solo con TBS.

6.14.4 Revelado

El revelado se realizó por dos métodos por Quimioluminiscencia y por método colorimétrico con Carbazol.

Quimioluminiscencia: se utilizó el Kit (GE Halthcare Cat. RPN2132) las placas para revelado fueron de la marca Kodak. Las exposiciones de las placas fueron de 2,5 y 10 minutos.

Carbazol: Se prepararon las soluciones de la siguiente manera.

Buffer de acetatos: 0.5 M Acetato de sodio mas 0.5 M Ac. Acético.

Carbazol (SIGMA AS754-100G): se pesó 0.8 grs y se adicionó en 200 ml de dimetilformamida (DMF).

Solución de trabajo: En un tubo falcon de 15 ml se adicionó 4 ml de buffer de acetatos más 1.5 de solución de carbazol diluido con DMF y 15 μ l de peróxido de hidrogeno. La reacción fue parada con agua.

En este trabajo optamos por revelar con carbazol, a pesar de que la quimioluminiscencia es el método más sensible no logramos establecer las condiciones de revelado idóneas.

6.15 Análisis Estadístico

Para determinar si existía diferencia significativa entre ellos se empleó la prueba t. La significancia estadística fue asumida cuando los valores de P fueron inferiores a 0.05.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis de la expresión de los genes *Delta-1* y *Jagged-1* y sus proteínas en las células estromales MSC, OP9-V y OP9-DL1

De acuerdo a nuestro objetivo principal, en primer lugar nos dimos a la tarea de determinar la expresión de los genes de los ligandos de Notch (*Delta-1* y *Jagged-1*) en las células estromales empleadas en este estudio. Aunque la expresión de estos ligandos ya ha sido reportada por otros grupos de investigación, era necesario asegurar que la expresión de los ligandos sobre todo en la línea celular OP9-DL1 seguía expresándose.

La línea celular OP9 ha demostrado tener la capacidad para sostener la diferenciación de CTH y CPH dentro de los múltiples linajes hematopoyéticos, pero su uso en el linaje mieloide sigue siendo muy controversial. Nosotros decidimos usar esta línea celular para estudiar su capacidad de proliferación y expansión bajo nuestras condiciones de cultivo ya establecidas en nuestro laboratorio. Por otro lado, en un trabajo publicado anteriormente por nuestro grupo, se demostró la capacidad de proliferación y de expansión de las células MSC provenientes de MO comparadas con cultivos en ausencia de estroma [Flores-Guzmán et al., 2009]. Para seguir por este camino, decidimos en este estudio comparar el comportamiento de las células MSC y de la línea celular OP9.

Por medio de RT-PCR en tiempo real, se determinó la expresión de los genes *Delta-1* y *Jagged-1* en las células estromales usados: células OP9 transducidas retroviralmente para expresar *Delta-1* (OP-DL1), células OP9 transducidas solo con el vector vacío (OP9-V) y células mesenquimales de MO normal de pacientes jóvenes.

Nuestros resultados confirmaron la expresión del gen *DL1* solo en la línea celular OP9-DL1 (17.88 ± 0.5 veces); por otro lado, el gen *Jagged-1* fue expresado en las tres líneas celulares, a diferentes niveles: en las células OP9-V fue alta (3.96 ± 0.5), en MSC la expresión fue intermedia (1.38 ± 0.1) e

inesperadamente en la línea celular OP9-DL1 su expresión fue baja (0.77 ± 0.03) (ver tabla 6).

Como un control para validar la expresión del ligando Jagged-1, utilizamos la línea celular SiHa en la cual se ha descrito su expresión [Pang et al., 2010]. Nuestros resultados con respecto a la expresión de los ligandos de Notch en las líneas celulares OP9-DL1 y OP9-V concuerdan con lo ya reportado por Schmitt y Zuñiga-Pflücker [Schmitt et al., 2002]. Por otro lado llama la atención el cambio en la expresión de Jagged-1 en las células OP9-Delta-1. Sin embargo la sobre expresión de DL-1 en las células OP9-DL1 es 4 veces más que la expresión de Jagged-1 en las células OP9-V.

Tabla 6. Expresión de los genes *Delta-1* y *Jagged-1* en las células estromales MSC, OP9-V y OP9-DL1 por PCR-tiempo real.

células estromales	DL1	Jagged-1
MSC	0	1.38±0.1
OP9-V	0	3.96±0.5
OP9-DL1	17.88±0.5	0.77±0.03
SiHa	0	>100±2.1

En esta tabla se muestra la expresión de los genes *Delta-1* y *Jagged-1* con respecto al gen GAPDH (donde la expresión de GAPDH equivale a 1). Los datos se muestran en promedio \pm desviación estándar de tres muestras analizadas en cada caso.

Una vez confirmado que las células estromales expresaban los ligandos de Notch Jagged-1 y Delta-1 a nivel RNA mensajero, era importante analizar la expresión de sus proteínas. Primero verificamos la integridad de las proteínas totales extraídas de las células MSC, OP9-V y OP9-DL1, según como se describe en la sección de materiales y métodos. Las proteínas fueron corridas en un gel al 10% y teñidas con azul coomassie.

En la Figura 3, podemos observar la integridad de las proteínas celulares obtenidas, observando un patrón similar entre ellas. Con estos resultados confirmamos que nuestros extractos proteicos se encuentran en condiciones óptimas para ser utilizados.

Como controles positivos para los ligandos de Notch, se emplearon proteínas recombinantes que nos permitieron evaluar el reconocimiento de los anticuerpos a las proteínas, estandarizar las concentraciones a utilizar de los anticuerpos primarios y secundarios y por último observar la migración las proteínas Jagged-1 y Delta-1. Cabe mencionar que también contamos con proteínas recombinantes para Jagged-2 y Delta-4 y fueron corridas junto con las proteínas Jagged-1 y Delta-1 pensando en que posteriormente también realizaremos la determinación de estas proteínas. En la Figura 4 A se muestra el gel teñido con azul coomassie donde se observa la migración de las proteínas: en el carril 1 Jagged-1 con peso molecular de 130 kDa, en el carril 2 Jagged-2 con un peso molecular de 128 kDa, en el carril 3 a Delta-1 con un peso molecular de 78 kDa y en el carril 4 a Delta-4 con un peso molecular de 78 kDa. En la Figura 4 B se muestra el western blot donde podemos observar el reconocimiento de los anticuerpos a las proteínas recombinantes.

Las proteínas recombinantes fueron reconstituidas con según las especificaciones del fabricante y a Delta-4 se le agregó 0.01% de albumina sérica, por lo que pensamos que esa banda gruesa era albumina que tiene una migración de 67 kDa, para descartarlo en otro experimento corrimos albumina a la misma concentración de que fue utilizada y la comparamos con Delta-4 y encontramos una migración similar. Se realizó un western blot, donde se corrió en un carril albumina a una concentración de 0.01% y en el otro a la proteína

Delta-4 y lo incubamos con el anticuerpo anti-delta-4 y observamos que el anticuerpo anti-Delta-4 solo reconocía a la proteína recombinante (datos no mostrados).

Teniendo las condiciones idóneas, se realizó el western blot de los extractos proteicos de las células MSC, OP9-V y OP9-DL1, utilizando los anticuerpos anti-Jagged-1 y anti-Delta-1; como control interno se utilizó α -tubulina.

En las células MSC observamos que el anticuerpo anti-Jagged1 reconoció una proteína de peso molecular de 130 kDa. que corresponde a lo esperado para Jagged-1, cuando se incubó con el anticuerpo anti-Delta-1 no hubo reconocimiento.

En las células OP9-V observamos el reconocimiento de una proteína de 130 kDa que corresponde al peso esperado para Jagged-1. En presencia del anticuerpo anti-Delta-1 no hubo reconocimiento.

En las células OP9-DL1 observamos el reconocimiento de una proteína de 78 kDa que corresponde al peso esperado para Delta-1. En presencia del anticuerpo anti-Jagged-1 no hubo reconocimiento. Por último, el anticuerpo anti- α tubulina reconoció una proteína de 55 kDa en los tres extractos proteicos utilizados ver Figura 5.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en el análisis de la expresión de los genes *Delta-1* y *Jagged-1* en las células MSC, OP9-V y OP9-DL1.

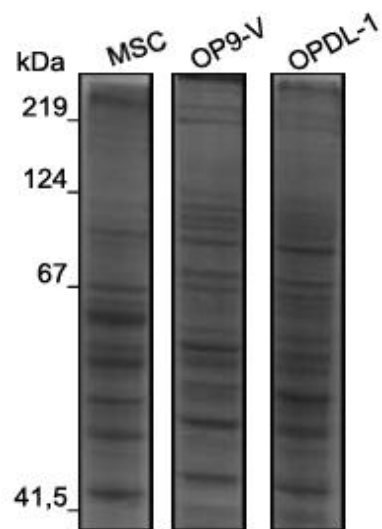


Figura 3. Extractos de proteínas totales provenientes de células mesenquimales (MSC), OP9-Vector (OP9-V) y OP9-Delta1 (OP9-DL1) fueron obtenidos por el método de Laemmli, separados en un gel de agarosa SDS-PAGE al 10% y teñidos con azul de Coomassie. En los tres carriles podemos observar la integridad de los extractos proteicos.

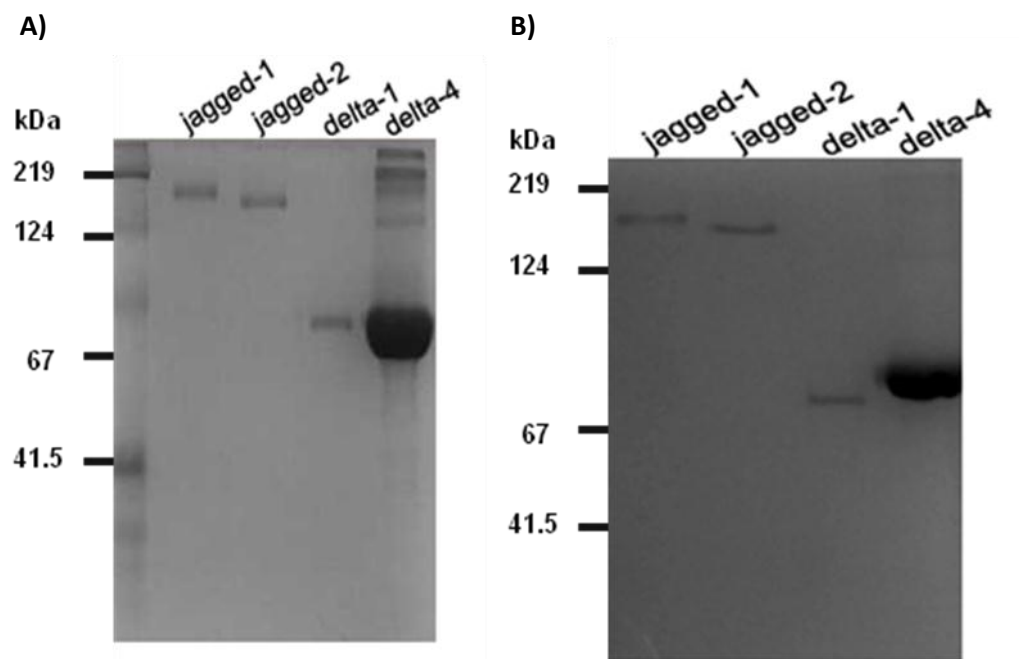


Figura 4. Western blot sobre las proteínas recombinantes Jagged-1, Jagged-2, Delta-1 y Delta-4. En la Figura A se muestra el gel teñido con azul coomassie donde se observa la migración de las proteínas: en el carril 1 Jagged-1 con peso molecular de 130 kDa, en el carril 2 Jagged-2 con un peso molecular de 128 kDa, en el carril 3 a Delta-1 con un peso molecular de 78 kDa y en el carril 4 a Delta-4 con un peso molecular de 78 kDa. En la Figura B se muestra el western blot donde podemos observar el reconocimiento de los anticuerpos a las proteínas recombinantes. Como marcador de proteína se utilizó un caleidoscopio pre-teñido.

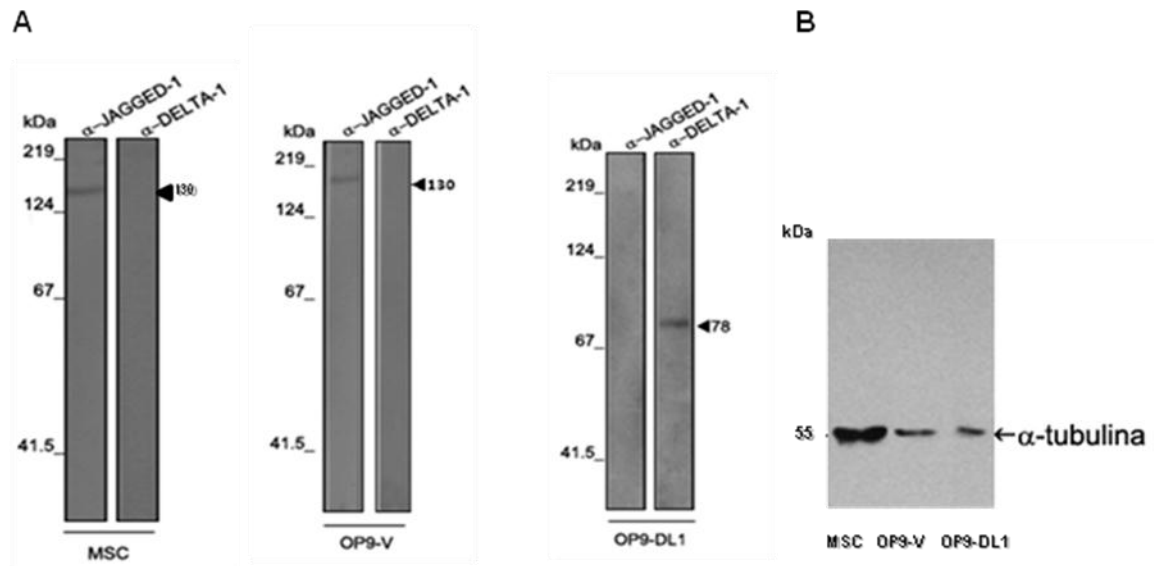


Figura 5. Expresión de los ligandos de Notch analizada por Western blot. Los extractos de proteínas totales de las células MSC, OP9-Vector y OP9-DL1 fueron corridos en un gel de agarosa SDS-PAGE al 10% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. En la Figura A se muestra el reconocimiento de Jagged-1 con un peso molecular de 130 kDa en las células MSC y OP9-V sin embargo en presencia del anticuerpo anti-Delta-1 no hubo reconocimiento. En las células OP9-Delta-1 en presencia del anticuerpo anti- Delta-1 reconoció una proteína de 78 kDa. que corresponde a la proteína Delta-1, en presencia del anticuerpo anti-Jagged-1 no hubo reconocimiento. En la Figura B se muestra la expresión de α -tubulina en los tres extractos proteicos.

Para realizar el estudio de las dos poblaciones hematopoyéticas, se procesaron más de 50 muestras de sangre de cordón umbilical (SCU). En la tabla 7, se muestran algunos parámetros relacionados con el procesamiento de las muestras, que nos ayudaron a seleccionar y minimizar variaciones entre ellas.

Tabla. 7 Parámetros de las muestras de sangre de cordón umbilical

Volumen (mililitros)	84.12 ± 6.3
No. de células MNCs obtenidas por muestra (x10 ⁶)	255.7 ± 130
No. de células post selección negativa (x10 ⁶)	1.5 ± 254
No. de células CD34+CD38- después de FACS (x10 ³)	374 ± 157
Pureza (%)	98 ± 0.5
No. de células CD34+CD38+ después de FACS (x 10 ³)	500 ± 190
Pureza (%)	99 ± 0.5
Viabilidad de las muestras (%)	85.6 ± 4.5

Los resultados se muestran en promedio ± desviación estándar de 10 muestras procesadas.

7.2 Separación de dos poblaciones celulares CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻ provenientes de sangre de cordón umbilical.

Las células hematopoyéticas provenientes de SCU fueron primeramente enriquecidas empleando la técnica de selección negativa Easy Sep, con lo que prácticamente eliminamos la mayor parte de células linaje positivo (Lin⁺) y plaquetas que pudieran interferir en el análisis.

El enriquecimiento obteniendo de células CD34⁺ Lin⁻ después de la selección negativa fue de 34.07 ± 11.7 veces que representa el promedio de 10 muestras analizadas \pm desviación estándar.

Una vez obtenido el enriquecimiento de las células CD34⁺ Lin⁻, se realizó el análisis y separación de las dos poblaciones celulares. A partir de las células CD34⁺ se obtuvo un 24.6% \pm 13.3 de células con fenotipo CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y un 75.40% \pm 24 de células con fenotipo CD34⁺CD38⁺Lin⁻; en ambas poblaciones obtuvimos una pureza por arriba del 95%. La Figura 6 es un esquema representativo del procesamiento de 10 muestras analizadas por separado.

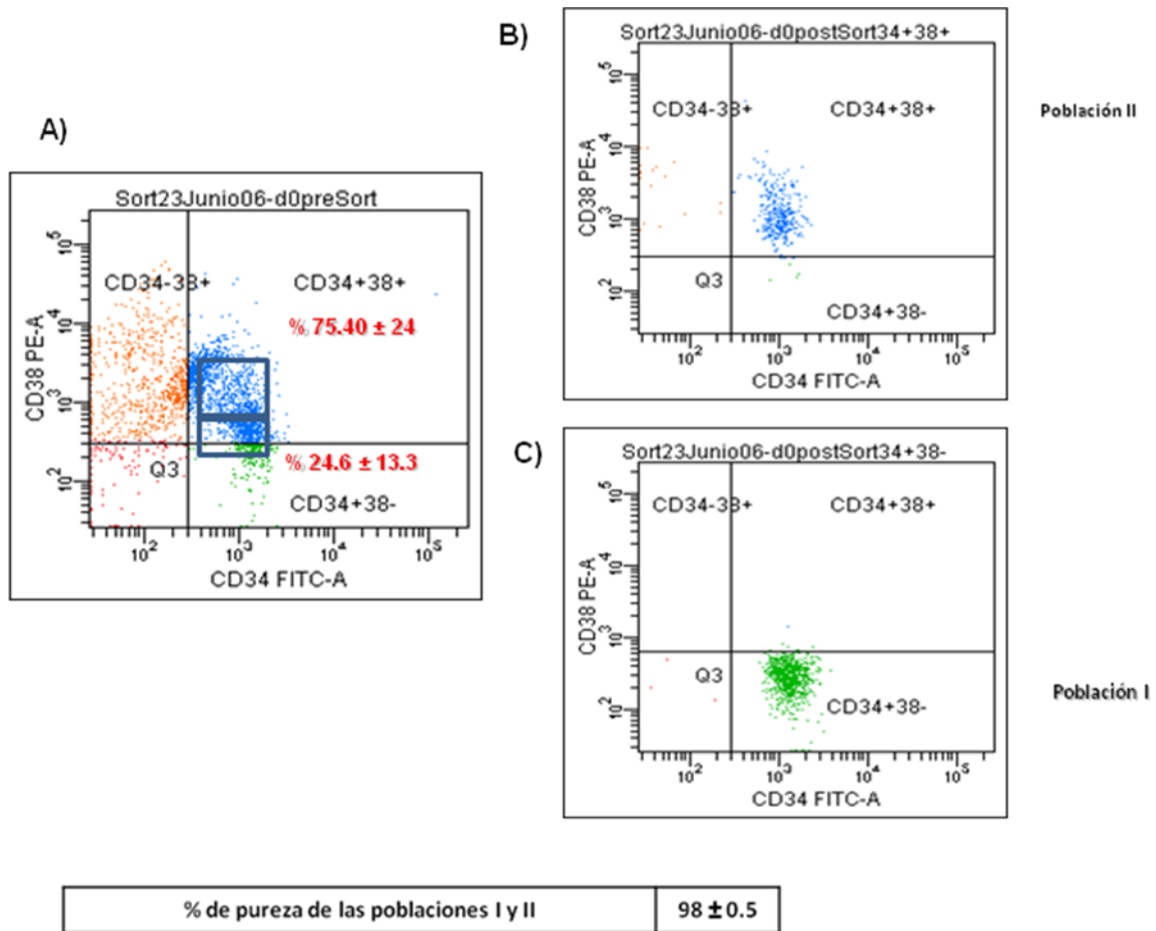
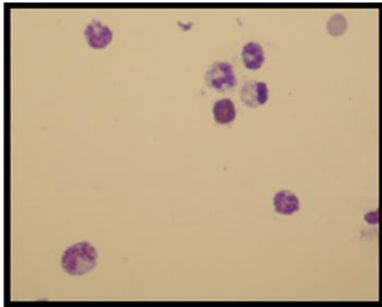


Figura 6. Separación de las poblaciones CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻ por FACS. Se muestra un ejemplo de la separación de las dos poblaciones celulares hematopoyéticas provenientes de SCU por FACS. Las células enriquecidas CD34⁺Lin⁻ fueron teñidas con anticuerpos monoclonales (CD34+/FITC, CD38+/PE) y posteriormente fueron analizadas y separadas por la expresión de antígenos. El porcentaje de células de cada población que mostramos es el promedio de 10 muestra analizadas por separado con su respectiva desviación estándar.

7.2.1 Análisis morfológico de las células hematopoyéticas provenientes de SCU, purificadas por FACS.

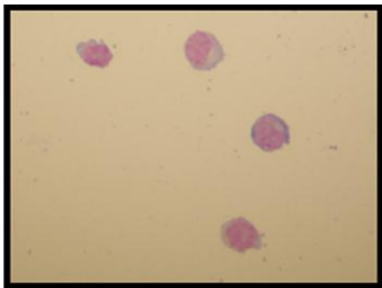
Para esquematizar los pasos de la separación hasta llegar a las dos poblaciones celulares, se tiñeron células mononucleares, en la cual podemos observar una población heterogénea, con diferentes tipos celulares fácilmente identificables por morfología (Figura 7 a). Posteriormente teñimos células enriquecidas (después de la selección negativa), observando una población más homogénea de células pequeñas, con citoplasma escaso y un núcleo grande, que difícilmente pueden ser diferenciados por su morfología (Figura 7 b). Posteriormente se tiñeron a las células purificadas (después del FACS), observando campos homogéneos, con células pequeñas parecidas a las células enriquecidas, sin embargo, también encontramos que la gran mayoría de las células en la preparación tenían forma de gota (Figura 7 c). Con estos resultados confirmamos que las poblaciones celulares más inmaduras (CTH o CPH) difícilmente pueden ser diferenciadas por su morfología y por ello es necesario recurrir al uso de la expresión de ciertos marcadores de superficie (ej. CD34 y CD38) para su estudio.

a)



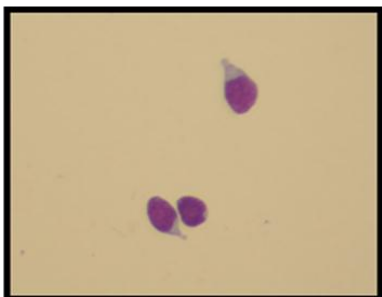
Mononucleares (MNCs) de SCU

b)



Población enriquecida células CD34+

c)



Población purificada

Figura 7. Análisis morfológico de células hematopoyéticas provenientes de SCU, de antes y después de su separación por FACS. Las preparaciones celulares fueron teñidas con colorante Wright-Giemsa y posteriormente analizadas en un microscopio óptico con el objetivo 100 x. En la figura a) se muestran células MNCs, b) células CD34⁺ enriquecidas y en c) células después de su separación por FACS.

7.3 Evaluación de la cinética de proliferación y expansión de las poblaciones celulares hematopoyéticas en presencia y ausencia de células estromales (MSC, OP9-V y OP9-DL1).

El potencial de proliferación se refiere a la capacidad de las células para generar nuevas células, independientemente de su linaje y estadio de maduración. Las condiciones de cultivo fueron estandarizadas según los requerimientos de las poblaciones celulares hematopoyéticas, así como de las células estromales utilizadas. La combinación de citocinas empleadas (SCF, TPO, FLT-3, G-CSF, GM-CSF y IL-3) en todos los cultivos fue seleccionada en base al trabajo reportado por nuestro grupo [Flores-Guzmán et al., 2002].

Como control para los cultivos con células estromales (MSC, OP9-V y OP9-DL1), usamos cultivos libres de estroma suplementados con la misma combinación de citocinas.

Nosotros determinamos el potencial de proliferación a corto plazo de las poblaciones celulares $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^+$ contando el número total de células generadas después de 7 días de cultivo.

Como se muestra en la Figura 8, en los cultivos de células $CD34^+CD38^-Lin^-$, el número total de células se incrementó alrededor de 100 veces en ausencia de estroma. En presencia de células MSC, el número total de células se incrementó 121 veces.

Cuando comparamos los cultivos con células OP9-V y los cultivos en ausencia de estroma observamos una reducción en el número total de células de un 73%, esta reducción no fue estadísticamente significativa. Interesantemente, los cultivos con células OP9-DL1, el número total de células se encontró significativamente reducido en un 35% con respecto al cultivo control ($p < 0.05$).

Por otro lado las células $CD34^+CD38^+Lin^-$ que fueron cultivadas en ausencia de estroma, el número total de células después de 7 días de cultivo se incrementó 145 veces, si comparamos éste resultado con los cultivos sin

estroma de la población $CD34^+CD38^-Lin^-$ representaría un incremento del 45% de las células $CD34^+CD38^-Lin^-$.

En presencia de células MSC, el número de células totales fue similar a lo observado en el cultivo control, mientras que en presencia de células OP9-V se redujo el número total de células en un 71% con respecto al cultivo sin estroma. Por último en los cultivos con células OP9-DL1 también se observó una reducción de un 62%, comparado con el cultivo ausencia de estroma.

En general observamos un patrón similar entre ambas poblaciones cuando fueron cultivadas en presencia de MSC, OP9-DL1 y OP9-V.

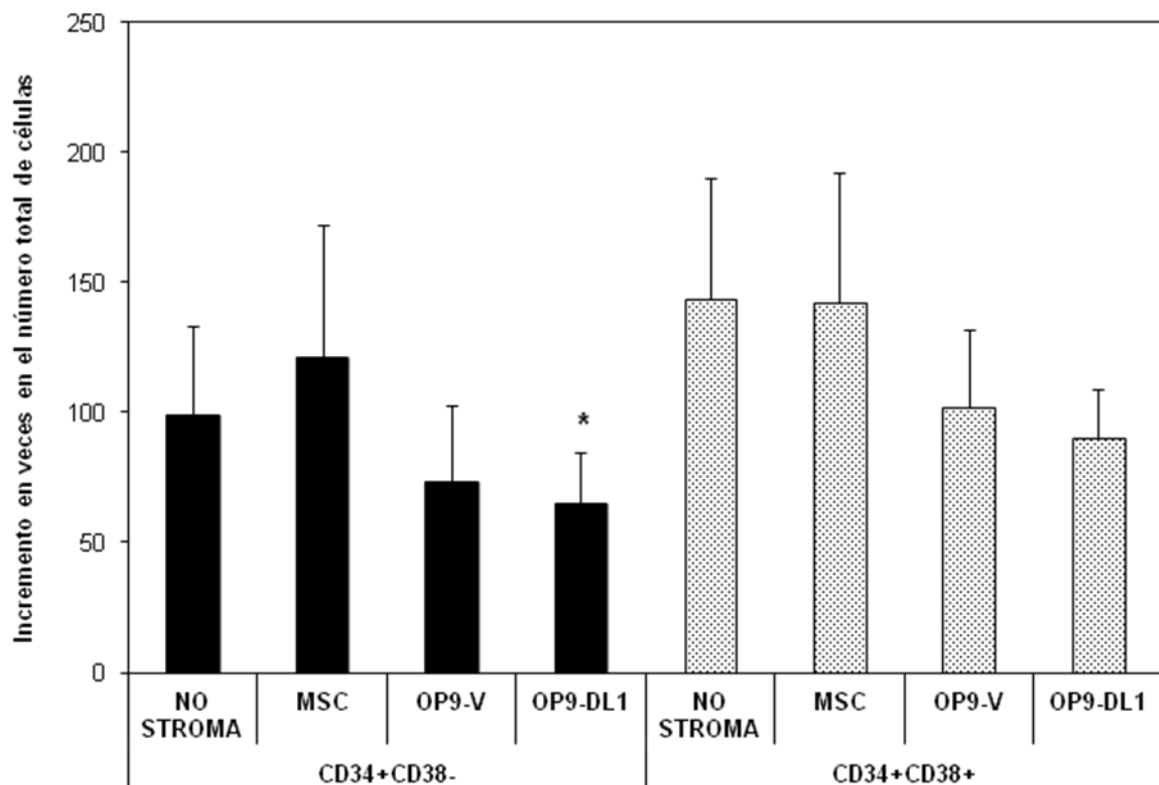


Figura 8. Proliferación celular de las poblaciones $CD34^+CD38^-Lin^-$ y $CD34^+CD38^+Lin^-$ en cultivos suplementados con citocinas, en ausencia de estroma o en presencia de células MSC, OP9-V u OP9-DL1. Los resultados mostrados representan el incremento en veces del número total de células después de 7 días de cultivo y corresponden a la media \pm desviación estándar de 9 experimentos procesados. En esta figura podemos observar un incremento en la capacidad de proliferación en ambas poblaciones, sin embargo cuando se comparan los cultivos de células $CD34^+CD38^-Lin^-$ en presencia de OP9-DL1 con los cultivos sin estroma vemos una reducción en el número total de células que es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar con su respectivo control ($p < 0.05$).

7.3.1 Expansión de células progenitoras hematopoyéticas.

El potencial de expansión se refiere a la capacidad que tienen ciertas células para producir más células que poseen fenotipo y/o características funcionales similares a ellas mismas. Nosotros medimos el potencial de expansión de las poblaciones celulares $CD34^+CD38^-Lin^-$ y $CD34^+CD38^+Lin^-$ determinando el incremento en el número de células que conservan el inmunofenotipo de la población celular original y por el análisis de células progenitoras (CFC) generadas después de 7 días de cultivo. Para esto último, las poblaciones celulares $CD34^+CD38^-Lin^-$ y $CD34^+CD38^+Lin^-$ fueron sembradas en cultivos semisólidos, después de su separación por FACS día 0 y a los 7 días de cultivo como se indica en materiales y métodos.

Primero analizamos los cultivos con la población celular $CD34^+CD38^-Lin^-$ encontrando que en ausencia de estroma el 39% de las células generadas después de 7 días de cultivo corresponden a células con fenotipo $CD34^+CD38^+Lin^-$ y el 60% a células con fenotipo $CD34^-$. En contraste las células con fenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$ corresponde solo al 1% de las células totales en el cultivo, lo que indica que no hubo un incremento en su número, en comparación al día 0 (Fig. 9A). Sí analizamos el número total de células $CD34^+$ observamos un incremento de casi 40 veces (Tabla 8).

En los cultivos en presencia de células MSC, se observó un comportamiento similar en la frecuencia de la población celular, encontrando un ligero aumento en el número absoluto de las células $CD34^+CD38^-Lin^-$ y un incremento de 54 veces en el número total de células $CD34^+$ (Tabla 8).

Interesantemente, en presencia de células OP-V, casi el 50% de las células observadas después de 7 días de cultivo mostraron un fenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$ (Figura 9A), lo que representa un incremento de 35 veces en números absolutos (Tabla 8). Por otra parte, en presencia de células OP9-DL1 las células con fenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$ correspondieron al 32%, con un aumento de 21 veces en números absolutos comparados con los cultivos sin estroma encontramos diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.25$) (Tabla 8).

Por último, las células con fenotipo CD34⁺CD38⁺Lin⁻ constituyeron el 30% en presencia de células OP9-V y el 40% en cultivos con OP9-DL1, mientras las células CD34⁻ correspondieron al 20% en presencia de células OP9-V y el número total de células CD34⁺ aumentó 58 veces (Tabla 8), por otro lado, en cultivos con OP9-DL1 las células CD34⁻ correspondieron al 30% y el número total de células CD34⁺ aumentó 46 veces (Tabla 8).

Cuando los cultivos se iniciaron con la población celular CD34⁺CD38⁺Lin⁻ en las condiciones sin estroma o con células MSC, la gran mayoría de las células presentes al día 7 fueron con fenotipo CD34⁻ (>75%), mientras que el porcentaje de células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ correspondió al 25% y 20% del total de las células, respectivamente (Figura 9B). Por otro lado se observó un incremento en el número absoluto de las células de 35 y 26 veces, respectivamente. (Tabla 8).

En cuanto a las células CD34⁺CD38⁻Lin⁻ generadas en cultivo, sus niveles fueron extremadamente bajos en los cultivos sin estroma o con células MSC (Figura 9B). En cultivos en presencia de células OP9-V y OP9-DL1, las células CD34⁻ correspondieron a la mayoría (>50%) de las observadas al día 7; por su parte, las células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ correspondieron al 22% y 26% del total de las células, representando incrementos de 22 y 23 veces, respectivamente (Tabla 8). Llama la atención que en estos cultivos, los incrementos observados en números absolutos de células totales CD34⁺ fueron menores que en los cultivos equivalentes de células CD34⁺CD38⁻Lin⁻.

Sorprendentemente, entre el 20% y 30% de las células generadas en los cultivos de células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ correspondieron a células CD34⁺CD38⁻Lin⁻ en presencia de células OP9-DL1 y OP9-V respectivamente. En conjunto, las observaciones descritas anteriormente indican claramente que la presencia de células OP9-V y OP9-DL1 favorece el crecimiento de las subpoblaciones celulares CD34⁺ más primitivas analizadas en este estudio, es decir, células CD34⁺CD38⁻Lin⁻.

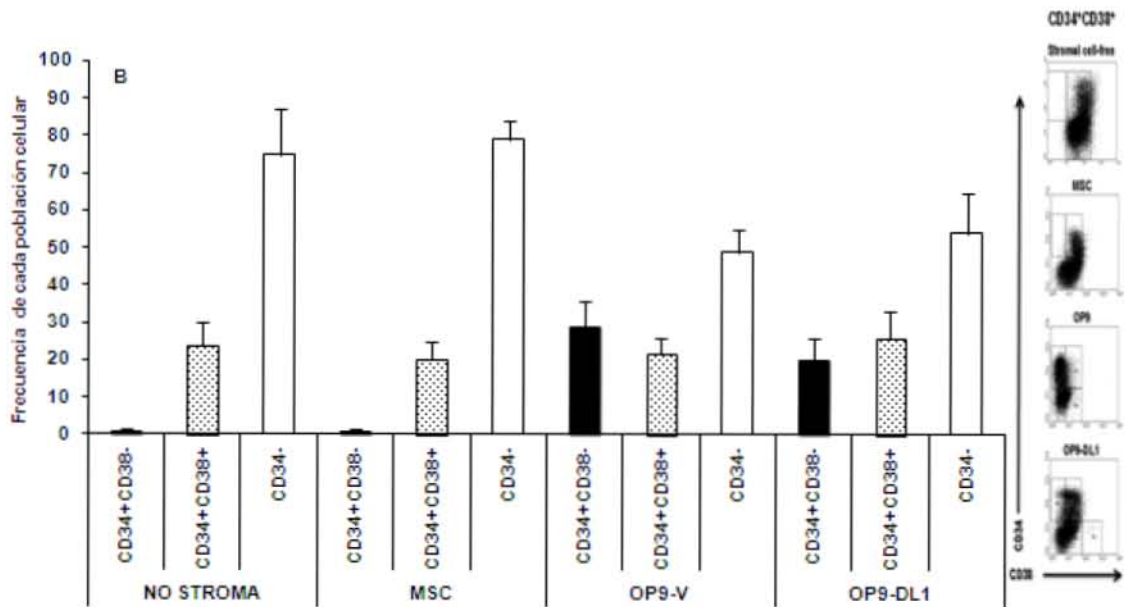
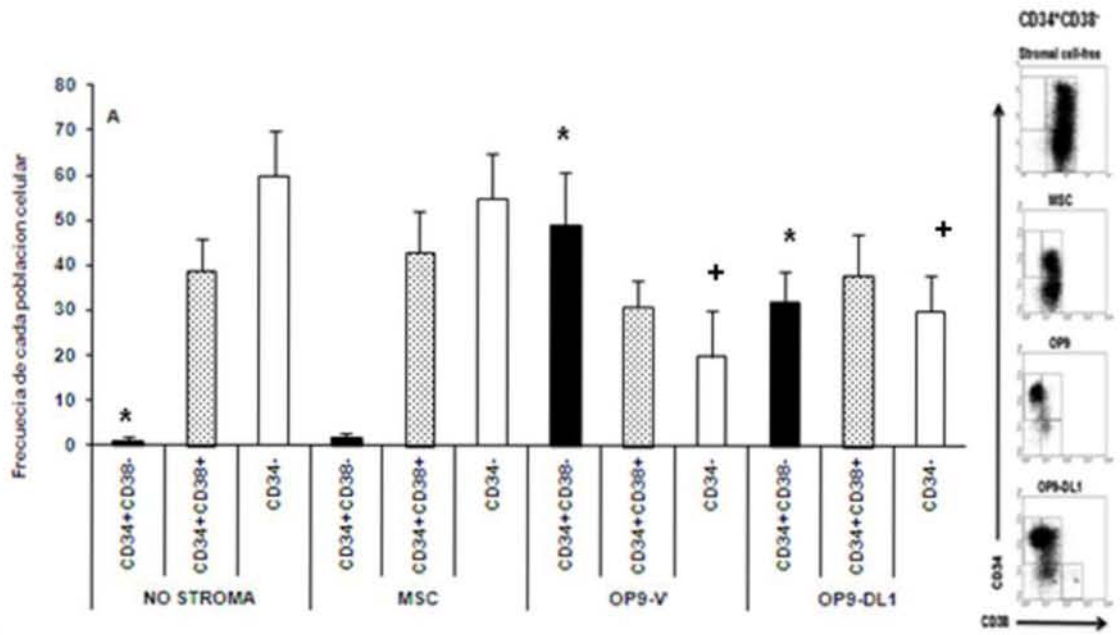


Figura 9. Generación de células CD34⁺CD38⁻Lin⁻, CD34⁺CD38⁺Lin⁺ y CD34⁻ en cultivos iniciados con poblaciones celulares CD34⁺CD38⁻Lin⁻ (A) o CD34⁺CD38⁺Lin⁻ (B) co-cultivados en ausencia de estroma o en presencia de células MSC, OP9-V u OP9-DL1. Los resultados representan el porcentaje de cada población después de 7 días de cultivo y corresponden al promedio \pm desviación estandar (n=9). En los cultivos de células iniciadoras CD34⁺CD38⁻Lin⁻ en ausencia de estroma y en presencia de células MSC no observamos diferencia significativa en la frecuencia de las poblaciones. Sin embargo sí se encontró diferencias significativas en los cultivos con células OP9-V y OP9-DL1 en la frecuencia de células CD34⁺CD38⁻ así como en la frecuencia de células CD34⁻ comparadas con los cultivos sin estroma (p<0.05). Entre los cultivos con células OP9-V y OP9-DL1 encontramos diferencias significativas en la frecuencia de células CD34⁺CD38⁻, panel A (p<0.05). En los cultivos de células iniciadoras CD34⁺CD38⁻Lin⁻ no encontramos diferencias significativas entre la frecuencia de las poblaciones celulares en presencia de MSC, OP9-V u OP9-DL1 con respecto a los cultivos sin estroma., panel B.

*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra su respectivo control (p<0.05).

+: Diferencia estadísticamente significativa al contrastar contra el cultivo con OP9-DL1 (p<0.05)

Población de células iniciales	Condiciones de cultivo	Células que expresaban el fenotipo original	Total de células CD34 ⁺
CD34 ⁺ CD38 ⁻ Lin ⁻	Control	0.9 ± 0.31	39 ± 8
	MSC	2.4 ± 1.3	54 ± 11
	OP9-V	35.7 ± 11*	58 ± 12
	OP9-DL1	21.1 ± 9*	46 ± 10
CD34 ⁺ CD38 ⁺ Lin ⁻	Control	35.1 ± 5	36 ± 7
	MSC	26.4 ± 4	27 ± 6
	OP9-V	22.4 ± 5	52 ± 8
	OP9-DL1	23.4 ± 6	40 ± 7

Tabla 8. Expansión de las subpoblaciones CD34⁺. Los resultados representan el promedio ± desviación estandar (n=9) y corresponden al incremento en veces en números absolutos de la población celular indicada después de 7 días de cultivo, bajo las cuatro condiciones experimentales probadas.

*:Diferencia estadísticamente significativa al contrastarse con su respectivo control (p<0.25).

Posteriormente se analizó el número y tipo de células progenitoras capaces de formar colonias hematopoyéticas, como se muestra en la Figura 10.

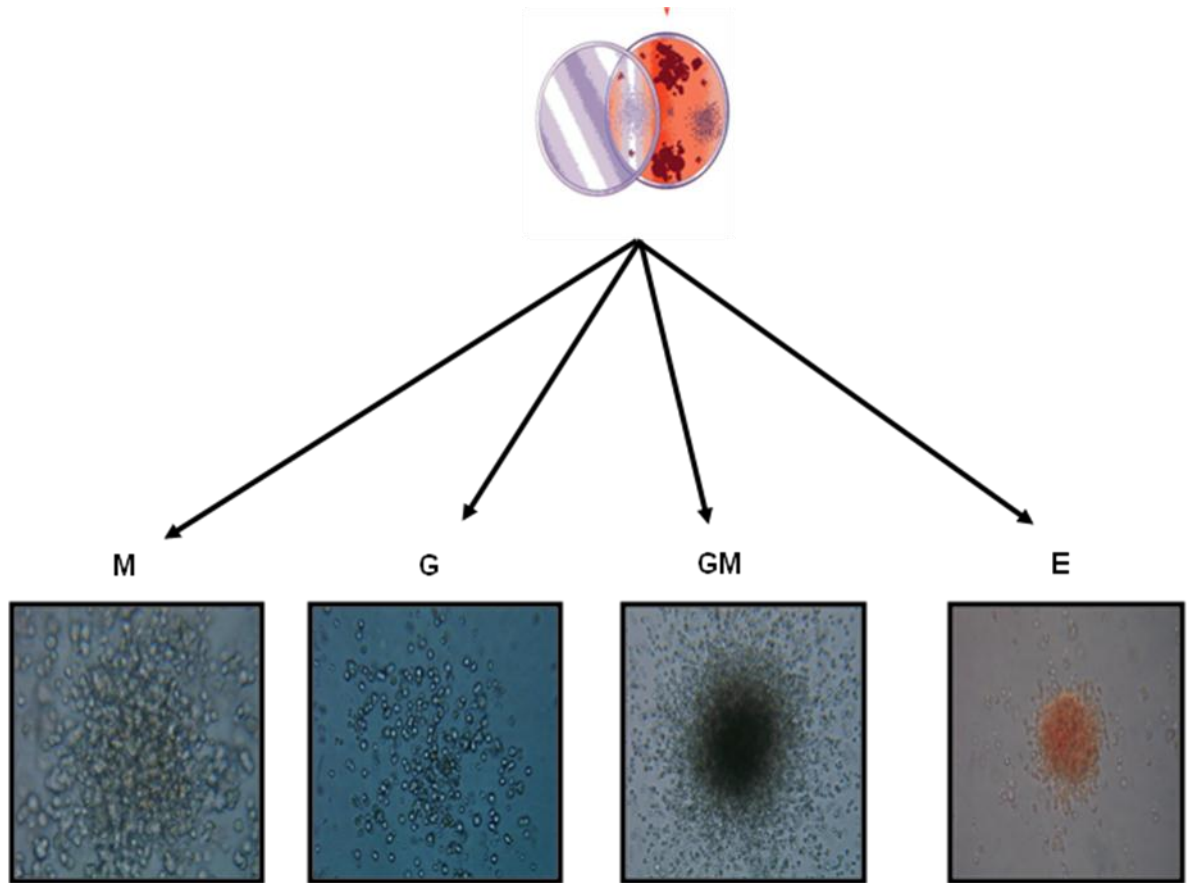


Figura 10. Morfología de las células formadoras de colonias (CFC).

Después de 14 días de cultivo las células fueron cuantificadas de acuerdo a su morfología y clasificadas por el tipo de colonia formada. En la figura se muestran un esquema representativo de los tipos de colonias observadas por microscopía óptica.

M: macrófagos

G: granulocitos

GM: granulocitos/macrófagos

E: eritroide

Cuando se analizó el número de CFC en los cultivos de células CD34⁺CD38⁻Lin⁻ sin estroma después de 7 días de cultivo, su número se elevó 9 veces con respecto al número de células observadas al día 0, mientras que en presencia de células MSC, se observó un incremento de 22 veces (Figura 11). En cultivos con células OP9-V un incremento de 15 veces fue observado y en presencia de células OP9-DL1, la expansión fue similar a lo observado en el cultivo sin estroma. Patrones de crecimiento muy similares fueron observados en los cultivos con células iniciadoras CD34⁺CD38⁺Lin⁻; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de CFC en cultivos establecidos sin estroma y con células OP9-V y OP9-DL1, mientras que un incremento de 29 veces fue observado en cultivos con células MSC (Figura 11). Los incrementos observados en el número de CFC en los cultivos de CD34⁺CD38⁺Lin⁻ fueron más altos que lo observado en los cultivos de células CD34⁺CD38⁻Lin⁻.

Cuando el tipo de CFC fue analizado, observamos que en cultivos de células CD34⁺CD38⁻Lin⁻, los progenitores mieloides fueron los más numerosos, correspondiendo a un 50% - 60% de todas las CFC, mientras que las CFC eritroides y multipotentes correspondieron al 40% - 50% y un 2% - 4%, respectivamente (Tabla 9).

Lo interesante fue encontrar un incremento en la proporción de colonias eritroides (72% de CFC totales) en cultivos establecidos con células OP9-DL1.

En cultivos de células CD34⁺CD38⁺Lin⁻, los progenitores fueron en su mayoría de tipo mieloides después de 7 días de cultivo en ausencia de estroma, con células MSC y células OP9-V. De acuerdo con los resultados de células CD34⁺CD38⁻Lin⁻, las células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ cultivadas con células OP9-DL1, produjeron principalmente progenitores eritroides (56% del total de CFC; Tabla 9).

Cuando consideramos las veces de expansión en el total de CFC y la proporción de cada tipo de ellas en conjunto, fue evidente que para ambas poblaciones celulares hematopoyéticas, los cultivos establecidos con células MSC representaron la mejor condición para obtener el máximo incremento en

números absolutos de los tres tipos de células progenitoras. De hecho, para las células $CD34^+CD38^-Lin^-$ los incrementos máximos en CFC mieloides, eritroides y multipotentes, fueron 21, 23 y 10 veces respectivamente. Para la células $CD34^+CD38^+Lin^-$, por otro lado, los incrementos máximos en CFC mieloides y eritroides fueron de 41 y 15 veces, respectivamente (Ver tabla 9).

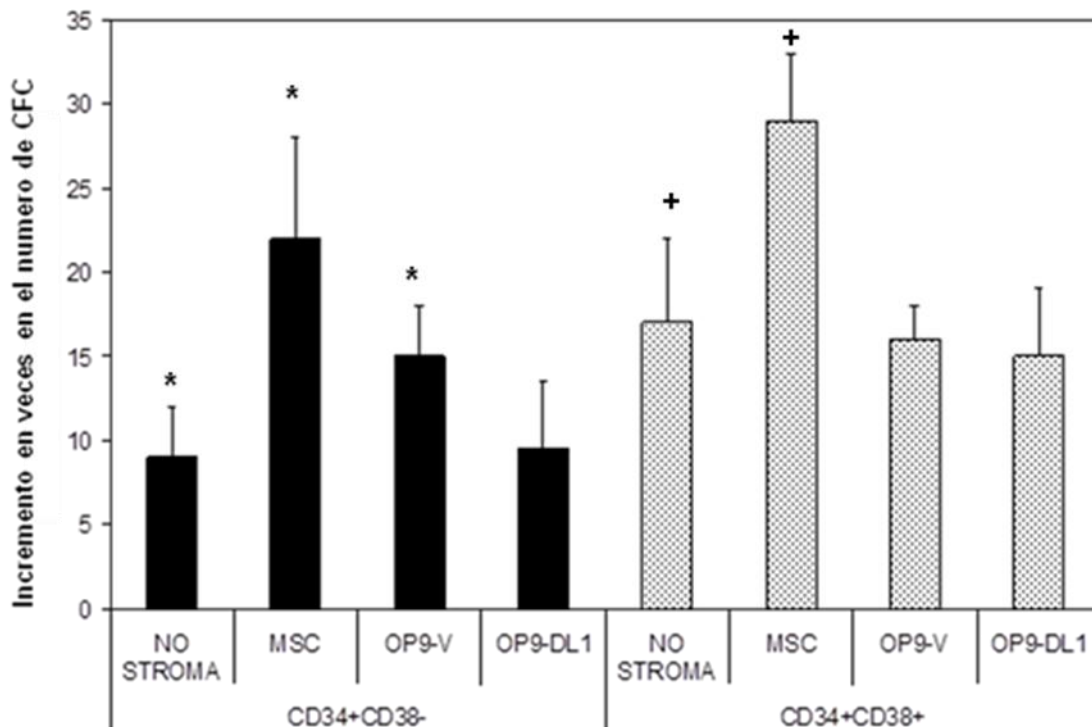


Figura 11. Expansión de las células CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻ en cultivos suplementados con citocinas sin estroma o con células MSC, OP9-V y OP9-DL1. Los resultados mostrados representan el incremento en veces en el número de células formadoras de colonias (CFC) después de 7 días de cultivo, comparadas con el día 0 y corresponden a los promedios \pm desviación estándar (n=9). En los cultivos de células CD34⁺CD38⁻Lin⁻ los incrementos observados en el número de CFC con células MSC y OP9-V fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) comparados con los cultivos sin estroma. En los cultivos de células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ observamos diferencia significativa cuando se compararon los cultivos de células MSC con los cultivos sin estroma ($p < 0.05$)

*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastarse con su respectivo control ($p < 0.05$).

+: Diferencia estadísticamente significativa al contrastarse con su respectivo control ($p < 0.05$).

	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	CFU-E	BFU-E	CFU-MIX
CD34⁺CD38⁻						
Día 0	38 ± 16	15 ± 7	2 ± 1	9 ± 5	32 ± 8	4 ± 2
Control	36 ± 12	12 ± 5	1 ± 1	21 ± 4	29 ± 6	2 ± 1
MSC	33 ± 9	12 ± 4	2 ± 1	9 ± 4	41 ± 8	3 ± 2
OP9-V	43 ± 10	12 ± 5	ND	15 ± 4	30 ± 7	ND
OP9-DL1	24 ± 7	6 ± 3	ND	19 ± 7	53 ± 10	ND
CD34⁺CD38⁺						
Día 0	35 ± 12	15 ± 8	1 ± 1	9 ± 3	39 ± 9	1 ± 1
Control	53 ± 10	20 ± 7	1 ± 1	10 ± 6	16 ± 3	1 ± 1
MSC	57 ± 11	15 ± 6	1 ± 1	9 ± 4	18 ± 6	ND
OP9-V	42 ± 9	12 ± 5	ND	14 ± 7	32 ± 10	ND
OP9-DL1	36 ± 9	8 ± 3	ND	25 ± 9	31 ± 11	ND

Tabla 9. Frecuencia de los distintos tipos de colonias producidos en cultivos semisólidos provenientes de las poblaciones celulares CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y CD34⁺CD38⁺Lin⁻. Los resultados representan el promedio ± desviación estándar (n=9) y corresponden a la frecuencia de cada tipo de colonias hematopoyéticas después de 7 días de cultivo.

ND: no detectado.

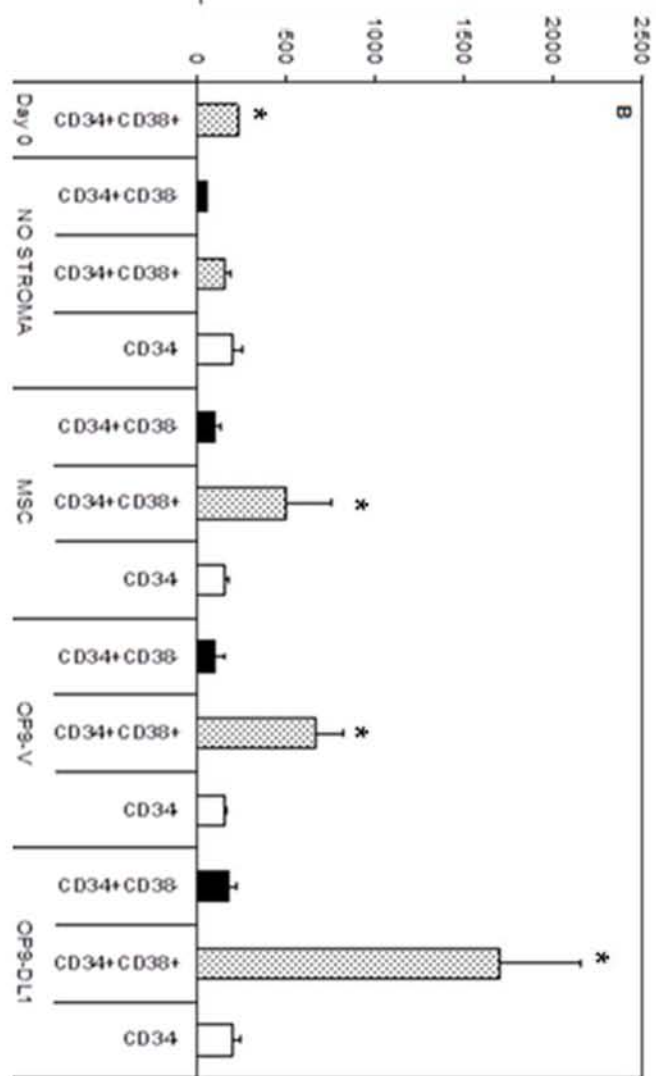
7.4 Análisis de la expresión de Notch-1 a nivel proteína en las poblaciones celulares hematopoyéticas primitivas, en presencia y ausencia de células estromales OP9-V y OP9-DL1, usando citometría de flujo.

Medimos la expresión de la proteína Notch-1 en las subpoblaciones $CD34^+CD38^-Lin^-$ y $CD34^+CD38^+Lin^-$ por citometría de flujo, al día 0 y después de 7 días de cultivo. Al día 0, las células $CD34^+CD38^-Lin^-$ mostraron bajos niveles de expresión de Notch-1 y estos niveles permanecieron así en las tres subpoblaciones celulares ($CD34^+CD38^-Lin^-$, $CD34^+CD38^+Lin^-$ y $CD34^-$) después de 7 días de cultivo sin estroma (Figura 12A). Un patrón similar fue observado en co-cultivos con células MSC, aunque se vio un incremento de 2.7 veces en la expresión de Notch-1 en la células $CD34^+CD38^-Lin^-$.

Cuando los cultivos fueron con células OP9-V, las células $CD34^+CD38^-Lin^-$ y $CD34^+CD38^+Lin^-$ incrementaron los niveles de expresión de Notch-1 4.75 y 11 veces respectivamente, en comparación al día 0, ambos resultados fueron estadísticamente significativos en comparación con los cultivos al día 0; mientras que las células $CD34^-$ mostraron niveles similares a los observados en los cultivos iniciales. En los cultivos con células OP9-DL1, un patrón similar fue observado; sin embargo, los niveles de expresión de Notch-1 fueron más altos que lo observado en presencia de células OP9-V (figura 12A). Ambos resultados fueron estadísticamente significativos en comparación con los cultivos al día 0.

Cuando analizamos la expresión de Notch-1 en las células $CD34^+CD38^+Lin^-$ observamos que también fue bajo en los cultivos iniciales (día 0). Después de 7 días de cultivo sin estroma, los niveles de Notch-1 permanecieron bajos, e incluso existió una disminución con respecto al día 0 (Figura 12B). En cultivos en presencia de células estromales, los niveles de expresión de Notch-1 solo se incrementaron en las subpoblaciones $CD34^+CD38^+Lin^-$ (2.1 veces con células MSC, 2.9 veces con en células OP9-V y 7.3 veces con células OP9-DL1). En las tres condiciones de cultivo los resultados fueron estadísticamente significativos en comparación con los cultivos al día 0.

Intensidad media de fluorescencia de NOTCH-1



Intensidad media de fluorescencia de NOTCH-1

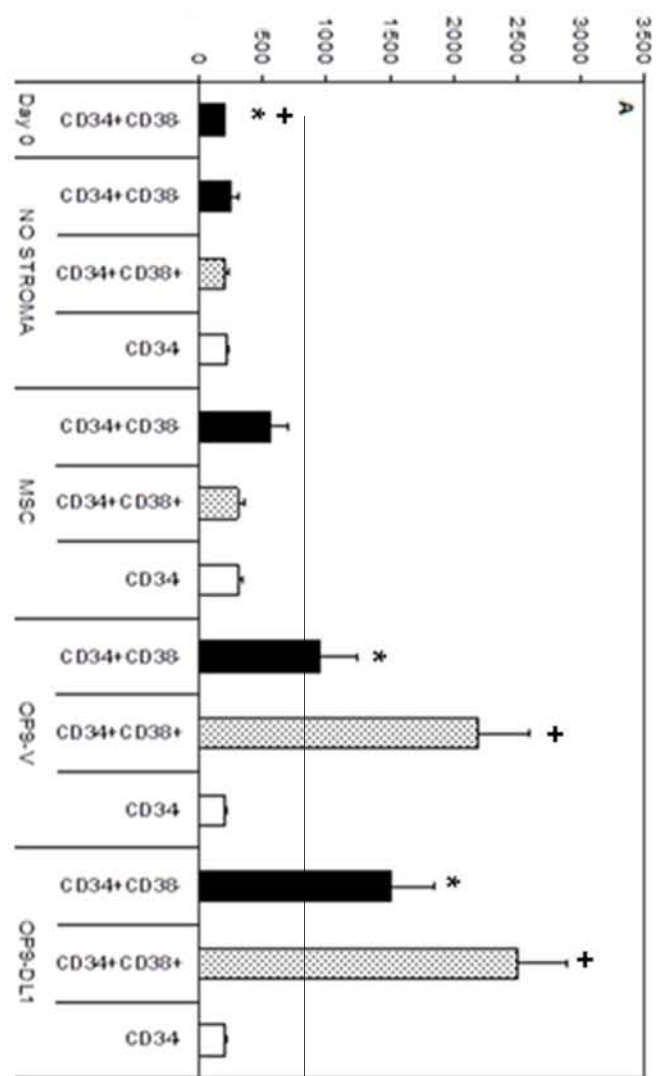


Figura 12. Expresión de la proteína Notch-1 en poblaciones celulares hematopoyéticas primitivas. La expresión de la proteína Notch-1 fue analizada en cultivos con células iniciadoras CD34⁺CD38⁻Lin⁻ (Panel A) y en células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ (Panel B) en ausencia de estroma o en presencia de células MSC, OP9-V u OP9-DL1. Los resultados mostrados representan la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) al día 0 y después de 7 días de cultivo y corresponden al promedio \pm desviación estándar (n=5).

En los cultivos iniciados con células CD34⁺CD38⁻Lin⁻, fueron observadas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) al comparar con el día 0 en los cultivos con células OP9-V y OP9-DL1 en las subpoblaciones CD34⁺CD38⁻Lin⁻, y CD34⁺CD38⁺Lin⁻. Para los cultivos iniciados con las células CD34⁺CD38⁺Lin⁻, en los cultivos con células MSC, OP9-V y OP9-DL se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la subpoblación de células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ al compararlos con los cultivos al día 0.

*: Diferencia estadísticamente significativa al contrastarse con el día 0 ($p < 0.05$).

‡: Diferencia estadísticamente significativa al contrastarse con el día 0 ($p < 0.05$).

VIII. DISCUSION

Nuestro grupo ha estado interesado en el estudio de CTH y CPH provenientes de SCU, y en el desarrollo de estrategias para la expansión ex vivo de dichas células. Nosotros previamente reportamos la caracterización de dos poblaciones linaje-negativo (Lin^-) derivadas de SCU, enriquecidas en células $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ y $\text{CD34}^+\text{CD38}^+$ que difieren en términos de su biología: las células $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ muestran un alto potencial de proliferación y expansión cuando son cultivadas en cultivos líquidos suplementados con citocinas recombinantes con actividad estimuladora temprana y tardía [Flores-Guzmán et al., 2005; Flores-Guzmán et al., 2006]; también se demostró, que las células con fenotipo $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ son más dependientes de células MSC para su desarrollo *in vitro* que las células con fenotipo $\text{CD34}^+\text{CD38}^+$ [Flores-Guzmán et al., 2009].

Existen diferentes líneas celulares de origen ratón ó humano que son empleadas para co-cultivos con células hematopoyéticas (de origen embrionario, hígado fetal, MO y SCU). Una de las líneas más empleadas para la diferenciación de células hematopoyéticas principalmente para la diferenciación de células linfoides (T y NK) es la línea celular OP9 [Schmitt et al., 2002; Vodyanik et al., 2005; Martin et al., 2008]. La línea celular OP9 consiste en células estromales de MO derivada de ratones con osteopetrosis, los cuales son deficientes del factor estimulante de macrófagos (M-CSF) [Vodyanik et al., 2005].

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la línea celular OP9, que sobre expresa con el gen Delta-1 (OP9-DL1) en el crecimiento *in vitro* de dos poblaciones celulares hematopoyéticas CD34^+ purificadas por FACS provenientes de SCU. Para ello, analizamos la expresión de dos ligandos de Notch, Jagged-1 y Delta-1, a nivel de ARN mensajero y de proteína. Nosotros encontramos que en la línea celular OP9-Vector, OP9-Delta-1 y en células MSC el ligando Jagged-1 se expresa a diferentes niveles. Por otro lado, encontramos que el ligando Delta-1 solo es expresado en las células OP9-Delta-1, a nivel mensajero y proteína. Nuestros resultados concuerdan con lo ya reportado por el grupo de Zuñiga-Pflücker quienes observaron la presencia

a nivel ARN mensajero de Jagged-1 pero no de Delta-1 en la línea celular OP9 [Schmitt et al., 2002]. Cabe mencionar que también es de nuestro interés realizar el análisis de los ligandos de Notch Jagged-2 y Delta-4, por lo que ya contamos con las proteínas recombinantes y las condiciones necesarias para poder determinar su expresión.

Para estudiar los efectos de la interacción de las dos poblaciones celulares $CD34^+CD38^-Lin^-$ y $CD34^+CD38^+Lin^-$ con la línea celular OP9, implementamos en nuestro laboratorio la separación por citometría de flujo (FACS). Obteniendo una pureza arriba del 95% en todas las muestras utilizadas, lo cual nos permitió trabajar con poblaciones menos heterogéneas fenotípicamente hablando.

Cuando realizamos el estudio de proliferación de la población celular $CD34^+CD38^-Lin^-$ pudimos observar un incremento de 121 veces, comparada con los cultivos sin estroma, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo. Cuando esta población celular fue co-cultivada en presencia de OP9-V y OP9-DL1 su capacidad de proliferación fue menor a lo observado en ausencia de estroma al igual que con las células MSC. Este resultado concuerdan con lo reportado por nuestro grupo, donde se observó que en presencia de células MSC la capacidad de proliferación se ve favorecía particularmente en las células más primitivas $CD34^+CD38^-Lin^-$ [Flores-Guzmán et al., 2009]. También correlaciona con el incremento en la expresión de Notch-1 en las dos poblaciones celulares $CD34^+$ en presencia de MSC. En cuanto a la población $CD34^+CD38^+Lin^-$, aunque es mayor el incremento de la proliferación comparada con los cultivos con células más primitivas, no hay diferencia entre las condiciones de cultivo (sin estroma y MSC).

Por otra parte, pudimos observar en nuestros cultivos de células $CD34^+CD38^+Lin^-$ que cuando están en presencia de OP9-V y OP9-DL1, significativamente favorecen la expansión de las células hematopoyéticas primitivas. Esta expansión no fue observada en cultivos que solo tenían citocinas solubles, y fue solo leve en cultivos que contienen células MSC. Estos resultados correlacionan con un incremento en la expresión de Notch-1 en las

dos poblaciones de células CD34⁺ detectada después de 7 días de cultivo. Por lo anterior, nosotros asumimos que la ruta de señalización de Notch (inducida por el ligando Jagged-1 y/o DL1) está involucrada en la expansión de las células hematopoyéticas primitivas *in vitro* y esto a su vez, está de acuerdo con reportes previos indicando que Notch es importante para la autorrenovación de las CTH *in vitro* [43,49].

Es interesante destacar estas observaciones, la expresión de Notch-1 puede ser inducida por sus ligandos cuando estos están presentes en las células adyacentes, y al parecer los niveles de expresión de Notch están correlacionados con los niveles de expresión de Jagged1 y Delta-1. Este efecto se observó, después de 7 días de cultivo de las células CD34⁺ solo en presencia de citocinas donde no hubo un aumento en la expresión de Notch-1, en presencia de MSC un ligero aumento fue observado (con nivel moderado de expresión de Jagged-1); sin embargo, un aumento significativo en la expresión de Notch-1 fue evidente cuando las células hematopoyéticas fueron cultivadas con OP9-V (con altos niveles de expresión de Jagged-1) y niveles aun más altos en la expresión de Notch fueron observados en los cultivos en presencia de OP9-DL1 (niveles muy altos de expresión de DL-1 y bajos niveles de Jagged-1). Nuestros resultados son consistentes con los estudios previos por el grupo de Bhatia donde demuestran que Jagged-1 soluble fue capaz de inducir la expresión de Notch-1 en las células CD34⁺CD38⁻Lin⁻ provenientes de SCU [Karanu et al., 2003]. Por otro lado la expresión de Notch-1 parece ser exclusiva de las células CD34⁺, ya que no se observó su expresión en las células CD34⁻ generadas después de 7 días de cultivo con las células OP9-V u OP9-DL1.

En los cultivos iniciados con la población CD34⁺CD38⁻Lin⁻, los niveles de las células CD34⁺ totales generadas en presencia de las células que expresan los ligandos de Notch fue superior a lo observado en cultivos que solo contenían citocinas; este hallazgo concuerda con previos estudios donde se muestra que jagged-1 y Delta-1 pueden actuar como reguladores mitogénicos induciendo la proliferación de las células hematopoyéticas y la expansión de las células CD34⁺ [Ohishi et al., 2002; Karanu et al., 2003].

En los cultivos iniciados con la población $CD34^+CD38^+Lin^-$ en presencia de células OP9-V u OP9-DL1 observamos la generación de células $CD34^+CD38^-Lin^-$. Esta observación podría ser interpretada como un indicio de una posible generación de células troncales a partir de células progenitoras. Sin embargo, nosotros no realizamos ningún análisis funcional a las células generadas en estos cultivos, no sabemos si este fenotipo de CTH corresponde a células mas inmaduras o solo es la falta de expresión del marcador CD38 como resultado de las condiciones *in vitro*. El grupo de Dick demostró que la expresión del marcador CD38 es reversible en células troncales hematopoyéticas humanas dependiendo del estadio en el ciclo celular [Mckenzie et al., 2007]. Además, el mismo grupo de investigación ha mostrado disociación entre la funcionalidad de las CTH y su fenotipo después de la expansión *in vitro* [Milner et al., 1996]. Cabe mencionar que las células $CD34^+CD38^-Lin^-$ generadas a partir de la población $CD34^+CD38^+Lin^-$ no mostraron incremento en la expresión del receptor Notch-1, en contraste a lo observado en las $CD34^+CD38^-Lin^-$ generadas por la población $CD34^+CD38^-Lin^-$.

Por otro lado, es interesante destacar que en nuestros estudios, los incrementos en los niveles de células $CD34^+CD38^-Lin^-$ y de células $CD34^+$ totales fueron observados en los cultivos con células OP9-V es decir, las que expresan al ligando Jagged-1 pero no a DL1 y no con células OP9-DL1. Aunque estos resultados no son claros, sin embargo estos resultados parecen estar de acuerdo con lo observado por el grupo de Delaney quienes muestran que los efectos de DL1 son dosis dependiente. Ellos observan que la baja concentración del ligando $DL1^{ext-IgG}$ resulta en un aumento significativo en la producción de células $CD34^+$, mientras que una alta concentración de ligando $DL1^{ext-IgG}$ induce apoptosis de células primitivas y disminuyen los niveles de células $CD34^+$ [Delaney et al., 2005]. En contraste a este efecto estimulatorio en la generación de células $CD34^+CD38^-Lin^-$, ninguna de las condiciones con células OP9-V ni OP9-DL1 tienen un efecto significativo en la generación de CFC en cultivo. Los cultivos de células $CD34^+CD38^-Lin^-$ en presencia de células OP9-DL1 resulta en una significativa disminución en los niveles de CFC mieloides. Esta observación concuerda con estudios previos por diferentes

grupos donde muestran que DL1 induce una disminución en el número de progenitores mieloides (UFC-GM) y que la expresión de Notch causa una disminución en la diferenciación de células granulocíticas [Neves et al., 2006; Ohishi et al., 2002; Miele et al., 1999; Milner et al., 1996].

IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, así como el análisis de los mismos, llegamos a las siguientes conclusiones:

-Las células primitivas $CD34^+CD38^-Lin^-$ en presencia de células OP9-V u OP9-DL1 aumentan su capacidad de expansión produciendo nuevas células con fenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$ y con niveles altos de expresión del receptor Notch-1.

-Las células primitivas $CD34^+CD38^-Lin^-$ en presencia de células OP9-V u OP9-DL1 disminuyen su capacidad de producir nuevas células nucleadas totales, es decir, disminuye su capacidad de proliferación.

- Las células primitivas $CD34^+CD38^+Lin^-$ en presencia de células OP9-V u OP9-DL1, no incrementan su capacidad de expansión, sin embargo, su capacidad de proliferación se ve disminuida.

-A partir de células primitivas $CD34^+CD38^+Lin^-$, en presencia de células OP9-V u OP9-DL, hubo una producción significativa de células con fenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$.

X. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados y discusiones presentados en esta tesis, las perspectivas de trabajo futuros se orientan a la caracterización en términos funcionales de la población con fenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$ generada en los cultivos de células $CD34^+CD38^+Lin^-$ en presencia de las células OP9-V u OP9-DL1, ya que sería interesante saber si realmente se trata de una población inmadura, para ello se podrían realizar estudios *in vitro* como cultivos a largo plazo, demostrando su capacidad de mantener los cultivos celulares. También se podría pensar en estudios *in vivo* usando ratones irradiados eliminando células de la MO posteriormente injertar nuestra población celular y medir su capacidad repobladora.

También sería interesante analizar la expresión de los ligandos de Notch (Jagged-2 y Delta-4) a nivel de RNA mensajero y de proteína en las células estromales OP9-V, OP9-DL1 y MSC; ya que en algunas células estromales y líneas celulares se han reportado la presencia de estos ligandos. Finalmente, sería de interés la realización de ensayos de inhibición de la ruta de señalización de Notch-1, para confirmar que la ruta de Notch está involucrada en la expansión y proliferación *in vitro* de las células hematopoyéticas primitivas, inducidas por sus ligandos. Este ensayo se realizaría utilizando un inhibidor de proteasas γ -secretasa.

XI. CITAS BIBLIOGRAFICAS

Alvarado-Moreno A., Chávez-Gonzalez A., Cérbulo A., Arriaga L. and Mayani H. Cell cycle differences in vitro between primitive hematopoietic cell populations from adult and umbilical cord blood. *Stem Cells and Development*. 2007; 16:223-30.

Awong G, La Motte-Mohs RN, Zúñiga-Pflücker JC. In vitro human T cell development directed by notch-ligand interactions. *Methods Mol Biol* 2008; 430: 135-142.

Awong G., Herer E., Surh D, Dick J, Ross N. Motte-Mohs L. and Zúñiga-Pflücker JC. Characterization in vitro and engraftment potential in vivo of human. *Blood*. 2009;114:972-982.

Ayala D.R., Galán A.P., Martínez L.J. Hematopoyesis. Eritopoyesis Fisiopatología Eritroide. *Medicine*. 2001; 50:2613-2620.

Blank U., Karlsson G., and Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*. 2008; 111: 492-503.

De la Coste A. and Freitas A. A. Notch signaling: Distinct ligands induce specific signals during lymphocyte development and maturation. *Immunology Letters* 2006; 102:1-9.

Deans R.J. and Moseley A.B. Mesenchymal stem cell: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*. 2000; 28:875-884.

Delaney C., Varnum-Finney B., Aoyama K., Brashem-Stein and Bernstein I. Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood*. 2005; 106:2693-2699.

Dorshkind K. Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu.Rev. Immunol.*1990; 8:111-37.

Feugier P., Li N., Jo D-Y., Shieh J H., Mackenzie K., Lesesve J F., Latger-Cannard V., Bensoussan D., Crystal R G., Rafil S., Stoltz J F., More M. Osteopetrotic mouse stroma with thrombopoietin, c-kit ligand, and flk-2 ligand supports long-term mobilized CD34+ hematopoiesis in vitro. *Stem cells and development.* 2005; 14:505-516.

Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Martínez-Jaramillo G, Mayani H. In vitro characterization of two lineage-negative, CD34⁺ cell-enriched hematopoietic cell populations from human umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2005; 7:334-344.

Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Martinez-Jaramillo G, Fernandez-Sanchez V, Valencia-Plata I, Alarcon-Santos G, Mayani H. Individual and combined effects of Mesenchymal Stromal Cells and recombinant stimulatory cytokines on the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from human umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2009; 11:886-896.

Flores-Guzmán P, Gutierrez-Rodriguez M. and Mayani H. In vitro Proliferation, expansión, and differentiation of a CD34⁺ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of Medical Research.* 2002; 33:107-114.

Flores-Guzmán P, Martinez-Jaramillo G, Mayani H. Growth kinetics of progenitor cell-enriched hematopoietic cell populations in long-term liquid cultures under continuous removal of mature cells. *Cytotherapy* 2006; 8: 299-307.

Gallacher L, Murdoch B., Wu D., Karanu F., Keeney M and Bathia M. Isolation and characterization of human CD34-Lin⁻ and CD34⁺Lin⁻ hematopoietic stem cell using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000; 95:2813-2819.

Ganapati U., Tan H., Lynch M., et. al. Modeling Notch Signaling in Normal and Neoplastic Hematopoiesis: Global Gene Expression Profiling in Response to Activated Notch Expression. *Stem Cells*. 2007; 25:1872-1880.

Gao J, Yan XL, Li R, Liu Y, He W, Sun S, Zhang Y, Liu B, Xiong J, Mao N. Characterization of OP9 as authentic mesenchymal stem cell line. *J Genet Genomics*. 2010; 37:475-82.

Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shaddud RK. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34⁺ hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*; 2000, 28:1297-1305.

Harvey K. and Dzierzak E. Cell-cell contact and anatomical compatibility in stromal cell-mediated HSC support during development. *Stem cells*. 2004; 22:253-258.

Iwata M., Awaya N., Torok-Storb B., et. al. Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch1 gene expression in CD34⁺ cells. *Blood*. 2004; 103:4496-4502.

Jones RJ., Barber JP., Collector MI., Kaufmann SH, Ludeman SM., Colvin OM., Hilton J. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 1995; 85:2742-2746.

Karanu F.N., Murdoch B., Gallacher L., Wu D.M., et al. The Notch ligand Jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J.Exp. Med*. 2000; 192:1365-1372.

Karanu FN Yuefei L., Gallarcher L., Sakano S. and Bathia M. Differential response of primitive human CD34⁻ and CD34⁺ hematopoietic cells to the Notch ligand Jagged-1. *Leukemia*. 2003; 17:13366-1374.

Korbling M., Anderlini P., Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cell matter?. *Blood*. 2001; 98:2900-2908.

La Motte-Mohs RN, Herer E, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* 2005; 105:1431-1439.

Lahmar M., Catelain C., Poiraul S., Dorsch M., et. al. Distinct effects of the soluble versus membrane-bound forms of the Notch ligand Delta-4 on human CD34⁺CD38^{low} cell expansion and differentiation. *Stem Cells*. 2008; 26:621-629.

Lemieux ME. and Eaves CJ. Identification of properties that can distinguish primitive populations of stromal cell-responsive lympho-myeloid cells from cells that are stromal cell-responsive but lymphoid-restricted and cells that have lympho-myeloid potential but are capable of competitively repopulation myeloablated recipient. *Blood*. 1996; 88:1639-1648.

Li L. and Xie T. Stem cell Niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005; 21:605-31.

Li Yin-Ping, Paczesny S, Lauret E., Poirault S., Bordigoni P., et. al. Human mesenchymal stem cells license adult CD34⁺ hematopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the notch pathway. *The Journal of Immunology*. 2008, 180:1598-1608.

Maillard I., Koch U., Dumortier A., Shestova O. et. al. Canonical Notch Signaling Is Dispensable for the Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:356–366.

Martin C.M., Woll P.S., Ni Z., Zuñiga-Pflucker and Kaufman D.S. Differences in lymphocyte developmental potential between human embryonic stem cell and umbilical cord blood-derived hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2008;122:2730-2737.

Mayani H. Alvarado-Moreno J.A. and Flores-Guzman P. Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells present in circulation. *Archives of Medical Research*. 2003; 34:476-488.

Mayani H., Flores-Figueroa E., Pelayo R., Montesinos J.J., Flores-Guzmán P., Chávez González A. Hematopoiesis. *Cancerología*. 2007; 2:95-107

McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, Dick JE. Reversible cell surface expression of CD38 on CD34-positive human hematopoietic repopulating cells. *Exp Hematol* 2007; 35:1429-1436.

Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol*. 1999;181:393-409.

Milner L., Kopan R., Martin D. and Bernstein I. A human homologue of the *Drosophila* Developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood*. 1994; 83:2057-2062.

Milner LA, Bigas A, Kopan R, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13014-13019.

Moore K.A. and Lemischka I.R. Stem Cells and Their Niches. *Science*.2006; 311:1880-1885.

Morgan H. T. "The theory of the gene". *American Naturalist*. 1917; 51: 513–544.

Neves H., Weerkamp F., Gomes C.A., et. al. Effects of Delta1 and Jagged 1 on Early Human Hematopoiesis: Correlation with Expression of Notch Signaling-Related Genes in CD34+ Cells. *Stem Cells*. 2006; 24:1328-1337.

Ohishi K, Varnum-Finney B, Bernstein ID. Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34+CD38- cord blood cells. *J. Clin. Invest.* 2002; 110:1165-1174.

Ogawa M. Changing phenotypes of hematopoietic stem cell. *Exp. Hematol.* 2002; 30:3-6.

Pang R., Leung C., Ye T., Liu W., Chiu C., Lam K., Lee K and Yeung W. Micro RNA-34a suppresses invasion through down regulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2010; 31:1037-1044.

Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Aglietta M. Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self renewal and amplification vs proliferation. *Leukemia*. 1998, 12:718-727.

Sahovic EA, Colvin M., Hilton J., Ogawa M. Role of aldehyde dehydrogenase in survival of progenitor for murine blast cell colonies after treatment with 4-hydroperoxycyclophosphamide *in vitro*. *Cancer Res*. 1998; 48:1223-1226.

Sanalkumar R., Dhanesh S.B. and James J. Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell Mol. Life Sci*. 2010; 67:2957-68.

Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 in vitro. *Immunity* 2002; 17: 749-756.

Stier S., Cheng T., Dombkowski D., Carlesso N. and Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*. 2002; 99:2369-2378.

Sugiki, T., Uyama, T., Toyoda, M., Morioka, H., Kume, S., Miyado, K., Matsumoto, K., Saito, H., Tsumaki, N., Takahashi, Y., Toyama, Y., and Umezawa, A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J. Cell. Biochem.* 2007; 100:1240–1254.

Sugimoto A., Yamamoto M., Suzuki M., Inoue T., Nakamura S., Motoda R., Yamsaki F. and Orita K. Delta-4 notch ligand promotes erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cell. *Experimental Hematology*. 2006; 34:424-432.

Sun H, Zhang X, Xinghua C, Cheng Z, Gao L, Feng Y, Peng X, Gao L. Human Umbilical Cord Blood-Derived Stromal Cells are Superior to Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Inducing Myeloid Lineage Differentiation in vitro. *Stem Cells Dev.* 2011;

Szilvassy S .J. The biology of hematopoietic stem cell. *Archives of Medical Research*. 2003; 34: 446-460.

Tanavde VM, Malehorn MT, Lumkul R, Gao Z, Wingard J, Garrett ES, Civin CI. Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Exp Hematol*. 2002; 30:816-23.

Tien A., Rajan A. and Bellen H. A Notch undated. J. Cell Biol. 2009; 184:621-629.

Tomas T.E., Miller CL, Eaves CJ. Purification of hematopoietic stem cell for further biological study. Methods. A companion to methods in enzymology. 1990; 17:202-218.

Vodyanik Maxim A., Bork Jack A., Thomson James A. and Slukvin Igor I. Human embryonic stem cell–derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. Blood. 2005;105:617-626.

Wagner W., Roderburg C, Wein F, Diehlmann A., et.al. Molecular and Secretory Profiles of human Mesenchymal Stromal Cells and their Abilities to Maintain Primitive Hematopoietic Progenitors. Stem Cells. 2007; 25:2638-2647.

Walker L., Lynch M., Silverman S., Fraser J., et al. The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. Stem cells 1999;17:162-171.

Wang H., Pierceb L.J. and Spangrudea G.J. Distinct roles of IL-7 and stem cell factor in the OP9-DL1 T cell differentiation culture system. Exp Hematol. 2006; 34:1730–1740.

Wang Z., Li Y, Banerjee S. y Sarkar F. Exploitation of the Notch signaling pathway as a novel target for cancer therapy. Anticancer Research. 2008; 28:3621-3630.

Wognum A.W. Eaves A.C. and Thomas T.E. Identification and Isolation of Hematopoietic stem cells. Archives of Medical Reseach. 2003; 34: 461-475.

Yan-hua H., De-quan W., Feng G., Guo-dong LI and Xin-chen Z. Notch signaling: a novel regulating differentiation mechanism of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J.* 2010;123:606-614.

Yin T. and Li L. The stem cell niches in bone. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006; 116: 1195-1201.

Yoshimoto, M., Heike, T., Chang, H., Kanatsu-Shinohara, M., Baba, S., Varnau, J.T., Shinohara, T., Yoder, M.C., and Nakahata, T. Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp. Hematol.* 2009. 37:1400–1410.

Zúñiga-Pflücker J.C. T-cell development made simple. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4:67–72.