

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

“Desarrollo de estrategias biotecnológicas destinadas a la generación de células eritroides *in vitro* a partir de células madre/progenitoras hematopoyéticas derivadas de sangre de cordón umbilical”

Luisina Anabel Cappellino

Director de Tesis: Dr. Claudio C. Prieto

Co-directora de Tesis: Dra. Marina Etcheverrigaray

Lugar de realización:

Laboratorio de Cultivos Celulares

Centro Biotecnológico del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

-2018-

A lo largo de estos cinco años de formación doctoral he recibido el apoyo de numerosas personas, que han hecho posible la realización del presente trabajo de tesis y han permitido que esta sea una etapa de crecimiento académico y personal. De esta manera, quisiera agradecer profundamente a:

La Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme brindado la posibilidad de crecer profesionalmente.

A Ricardo y Marina, por abrirme las puertas del Laboratorio cuando era una estudiante de grado, hace ya más de siete años. Por su calidad humana, por la confianza depositada en mi y las oportunidades que me otorgaron.

A Claudio, por su respaldo y la confianza que depositó en mí para emprender un nuevo proyecto. Por su ganas y su optimismo, que siempre estuvieron acompañados de una palabra de aliento en los momentos en que los experimentos no resultaban. Por todas las oportunidades brindadas, por escuchar siempre mis propuestas, por los consejos, las largas reuniones y los momentos compartidos.

A todos aquellos que con su enorme predisposición hicieron posible que este trabajo se llevara a cabo brindando desinteresadamente muestras de sangre de cordón umbilical y periférica: a las pacientes y personal, ginecólogos, obstetras y enfermeros del Servicio de Maternidad del Hospital José María Cullen, de la Clínica de Ginecología y Maternidad Central y del Sanatorio Mayo; al Dr. Gustavo Orozco que facilitó las extracciones de sangre periférica, a mis compañeros de laboratorio y sus familias que realizaron numerosas donaciones.

Al Dr. Héctor Goicoechea, quien me guió en la aplicación de las estrategias de Diseño Experimental.

Al Dr. Fabián Zalazar, quien amablemente me brindó su ayuda para la determinación de hemoglobina en los cultivos realizados.

Al Dr. Horacio Rodríguez, quien se desempeñó como mi Consejero de Estudios durante el desarrollo de esta tesis y respondió atentamente a mis consultas.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivos, por su predisposición para tender una mano siempre que fue necesario, por sus consejos, por el conocimiento y la experiencia que me transmitieron, por las bromas y palabras cálidas y alegres, que hicieron que cada día de trabajo sea ameno. Espero no olvidar a nadie, pero quisiera agradecer particularmente: a Caro y Edu, por su interés y sus consejos académicos y personales, porque son estupendos investigadores y personas; a Ale Raimondi por todas las charlas compartidas; nuevamente a Gustavo Orozco, el Doc, que además de brindarme su ayuda y sus consejos profesionales y personales, me ha sacado tantas sonrisas con sus maravillosas anécdotas; a Nacho, Laura, Belu Bosco, Guille, Marcos,

Nati, Marian, Andre, Gustavo Núñez, Normis, Moni, Vale, Fran, Aqui, Víctor y Rodri, siempre con una sonrisa y dispuestos a colaborar; a Gise, de quien he recibido tanta ayuda en lo que al inglés y los trámites concierne; a los chicos de Purificación: Negro, Carlitos, Seba Reyes, Rodri Koch y Luchi, que nunca dudaron en responder a mis consultas o en ponerle alegría a los días laborales con un poco de cumbia o bachata; a los chicos de Fermentación: Iván, Nico, Kitu, Rodri P., Mauri, Cristian, por su colaboración y buena onda; a las chicas de Desarrollo Analítico, Ceci, Lore, Vir, Mari, por su ayuda y calidez; a Tito y Germán, quienes tantas veces rescataron a los equipos del laboratorio y, consecuentemente, a nuestros experimentos; a Mago Black y Copito, que siempre estaban para colaborar y compartir música o alguna charla en Biología Molecular; a los chicos de Acondicionamiento de material, Quique y Lucho, a quienes tanto molesté con la esterilización de soluciones o de alguna otra cosa, que siempre me ayudaron con una sonrisa; a Lucho, Pancho y Diego.

A mis compañeros y amigos de la oficina (de la actual y de la del fondo): Tarri, Seba A., Diego, Batta, Erne, Vero, Regi, Cele, Mili B., Agus, Soni, Mile, Juani, Jesu, Javi, Vicky. A todos ellos gracias por los momentos compartidos: las rondas de mate, las consultas respondidas, las sugerencias, la colaboración, las charlas, las salidas, las cenas, los congresos y los viajes geniales y llenos de anécdotas, que generaron un ambiente de trabajo muy ameno e incluso divertido.

A los queridos amigos y amigas que me regalaron la Tesina y la Tesis: Blondie, Ile, Sofi, Mili S., Ani, Cami, Meli, Fer, Fabri, Fede. Qué fortuna fue poder conocer gente así, locos lindos, siempre dispuestos a brindarme su cariño y amistad incondicional. Una mención especial merece mi queridísima Blondie (Anto), mi coequiper del SCT. No todo el mundo tiene la suerte de trabajar con una persona con su alegría y ocurrencias. Gracias infinitas por las innumerables charlas que compartimos, por la paciencia, dedicación, humildad y empuje, por ser capaz de ver algo bueno en cada cosa. Por hacerme compañía en esos días interminables de trabajo y prestarme una oreja y un abrazo siempre que los necesitaba (demasiadas veces), por ser, sin dudas, una amiga de fierro.

A mis amigas de la vida, las humbertinas: Evange, Elis, Cini, Mali, Chechu y Noe. A todas: por estar ahí cada día desde hace muchísimo tiempo, por ser excelentes personas; por todos los momentos compartidos, por las charlas, consejos, locuras, reuniones, por compartir mi preocupación por "las células". No nos vemos muy seguido, pero siempre nos acompañamos y alentamos a la distancia, incondicionalmente.

A mis amigas biotecnólogas: Diane, Anto, Aine, Romi, Espe, Caro, Mary, Pauli y Cyn, porque luego de 5 años de haber dejado de cursar juntas y a pesar de estar

viviendo en diferentes puntos del país, cada vez que nos reunimos parece que el tiempo no hubiese pasado. También a Franco. Gracias por acompañarme siempre.

A mi familia: a mis tíos Raúl, Marcela, Mariano, Susi, Chani y Pepe –padrino de esos de fierro-); a mis primos, Santi, Nico, Franco, Pauli, Virgi y Manu; a mi ahijada, Sofi y mis cuñados, Facu y Sofi, por acompañarme, por todo el cariño que me brindan. A mis abuelos Puni, Lucho y Laura, sé que estarían apoyándome. Especialmente gracias a mi Abuela Betty, una persona genial y con el corazón inmenso que, como en aquellos tiempos de trenzas y guardapolvos blancos, me consiente y me divierte tanto con sus ocurrencias.

A mi hermana Diane, mi psicóloga favorita, gracias infinitas ser un gran sostén, alentarme durante estos años y alegrarme con sus disparates. Por brindarme nuevas perspectivas y consejos desinteresados durante nuestras largas charlas.

A mi hermano Fran, por enseñarme otro modo de ver las cosas. Por darme la oportunidad de ser tía y madrina de la personita más hermosa y dulce, nuestra Anni.

A mis padres, Graciela y Hugo, ya que sin ellos no hubiese podido llegar a este punto. Por ser mis guías, cuidarme y hacerme la persona que soy hoy, por todos los valores inculcados, el cariño incondicional, las palabras de aliento, los consejos, el interés, las conversaciones telefónicas interminables. Por no dejarme claudicar en los momentos más difíciles. Por brindarme con gran esfuerzo todo lo que necesito y enseñarme el valor del trabajo arduo.

Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados en:

LA Cappellino, RB Kratje, M Etcheverrigaray, CC Prieto (2017). Strategy for erythroid differentiation in *ex vivo* cultures: lentiviral genetic modification of human hematopoietic stem cells with erythropoietin gene. *J Biosci Bioeng* 124 (5):591-598.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VIII
RESUMEN	XVIII
ABSTRACT	XXI
INTRODUCCIÓN	1
1. Células madre	2
1.1. Características y relevancia de las células madre	2
1.2. Potencialidad y origen	3
2. Células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPCs)	6
2.1. Propiedades de las HSPCs	6
2.1.1. Migración.....	6
2.1.2. Características fenotípicas y funcionales de las HSPCs.....	7
2.1.3. Jerarquía y potencialidad	8
2.1.4. Heterogeneidad dentro de la población de HSCs.....	11
2.2. El nicho hematopoyético	13
2.3. Fuentes	15
2.4. Aplicaciones	16
2.4.1. Trasplante	16
2.4.2. Terapia génica	17
2.4.3. Producción <i>ex vivo</i> de células sanguíneas	17
2.4.3.1. Plaquetas	18
2.4.3.2. Neutrófilos.....	18
2.4.3.3. Glóbulos rojos (GRs) y otras células eritroides.....	18
3. Diferenciación eritroide	22
3.1. La eritropoyesis <i>in vivo</i>	22
3.2. Factores de crecimiento involucrados	24
3.3. Otras variaciones fenotípicas ocurridas durante la maduración eritroide	27
4. Aspectos relevantes en los procesos biotecnológicos destinados a la producción de células eritroides	30
4.1. Medios de cultivo.....	30
4.2. Fuentes celulares alternativas bajo consideración.....	31
4.3. Sistemas de cultivo	33
5. Optimización de la composición del medio de cultivo	34
5.1. Relevancia del empleo de estrategias de diseño experimental.....	34

5.2.	Diseño de experimentos (DoE) y Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)	36
5.2.1.	La naturaleza secuencial y sistemática de la investigación de superficies de respuesta	36
5.2.2.	Modelado en la etapa de <i>screening</i> y de RSM	38
5.2.3.	Optimización de múltiples respuestas	39
6.	Ingeniería genética de HSPCs	39
6.1.	Ventajas y estructura de los vectores lentivirales	40
OBJETIVOS		45
	OBJETIVO GENERAL.....	46
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
MATERIALES Y MÉTODOS		48
1.	Reactivos y soluciones.....	49
2.	Técnicas de biología molecular	49
2.1.	Líneas celulares procariotas.....	49
2.2.	Medios de cultivo para células procariotas	49
2.2.1.	Medio LB (Luria Bertani).....	49
2.2.2.	Medio LB-Antibiótico	49
2.2.3.	Agar LB	49
2.2.4.	Agar LB-Antibiótico.....	49
2.3.	Purificación de ADN plasmídico	50
2.3.1.	Minipreparación de ADN plasmídico.....	50
2.3.2.	Maxipreparación de ADN plasmídico.....	51
2.4.	Determinación de la concentración y pureza del ADN	52
2.5.	Digestiones enzimáticas.....	52
2.6.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	53
2.7.	Precipitación de ADN	53
2.8.	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	54
2.9.	Reacciones de ligación de ADN	54
2.10.	Preparación de células <i>Escherichia coli</i> TOP10 competentes, por el método químico.....	54
2.11.	Transformación de células competentes	55
2.12.	Criopreservación de cepas bacterianas.....	55
2.13.	Revitalización de cepas bacterianas.....	56

2.14.	Estrategia de clonado para la generación de los vectores de expresión.....	56
2.14.1.	Esquema y descripción del plásmido de expresión eucariota pLV-PLK..	56
2.14.2.	Obtención del plásmido pLV-EF1 α -EPO	57
2.14.3.	Obtención del plásmido pLV-EF1 α -GFP.....	58
2.15.	PCR de colonias.....	59
3.	Técnicas de cultivo celular	60
3.1.	Medios de cultivo y suplementos para células animales.....	60
3.1.1.	DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>).....	61
3.1.2.	IMDM (<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>)	61
3.1.3.	RPMI-1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>)	61
3.1.4.	DMEM/HAM'S F-12 (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (Ham)</i>).....	61
3.1.5.	Suero fetal bovino (SFB)	61
3.1.6.	Plasma Fresco Congelado (PFC).....	62
3.1.7.	Tripsina	62
3.1.8.	Medio semisólido con metilcelulosa HSC-CFU.....	62
3.1.8.1.	HSC-CFU básico.....	62
3.1.8.2.	HSC-CFU completo con EPO.....	63
3.2.	Líneas celulares	63
3.2.1.	HEK293T/17 (ATCC, CRL-11268).....	63
3.2.2.	TF1.....	63
3.2.3.	CHO-K1	63
3.3.	Obtención de células para cultivos primarios.....	64
3.3.1.	Obtención de células mononucleares (MNCs) a partir de sangre periférica humana (SP) o sangre de cordón umbilical humana (SCU)	64
3.3.2.	Purificación de HSPCs CD34 ⁺	66
3.3.2.1.	Aislamiento de HSPCs mediante <i>sorting</i> celular por FACS (Clasificación Celular Activada por Fluorescencia)	66
3.3.2.2.	Aislamiento de HSPCs mediante selección inmunomagnética positiva de células CD34 ⁺	68
3.4.	Determinación de la concentración y viabilidad de células	70
3.5.	Criopreservación de células de mamífero.....	71
3.6.	Revitalización de células de mamífero	72
3.7.	Sistemas de cultivos de células.....	72
3.7.1.	Cultivos en adherencia y suspensión en pequeña escala.....	72
3.7.2.	Cultivos en medios semisólidos en pequeña escala.....	73

4.	Metodologías para la caracterización celular	74
4.1.	Inmunofenotipificación por citometría de flujo.....	74
4.1.1.	Titulación de anticuerpos monoclonales para citometría de flujo.....	76
4.2.	Tinción de May-Grünwald-Giemsa.....	77
4.3.	Cuantificación de hemoglobina (HGB) y determinación de índices de glóbulos rojos.....	78
4.3.1.	Análisis automatizado.....	79
4.3.2.	Cuantificación de HGB por el método manual de cianometahemoglobina modificado.....	79
5.	Desarrollo de condiciones de cultivo para la producción de células eritroides a partir de HSPCs	81
5.1.	Cultivo de HSPCs en Medio de Producción Eritroide de Referencia (MePERef).....	81
5.2.	Desarrollo de un medio de producción eritroide mediante diseño experimental (DoE).....	84
5.2.1.	Selección de suplementos de cultivo significativos para la expansión de HSPCs.....	84
5.2.2.	Optimización de los niveles de factores influyentes en la etapa de expansión de HSPCs.....	87
6.	Desarrollo de cultivos de células recombinantes	88
6.1.	Transfección de células animales. Generación de vectores lentivirales.....	88
6.2.	Concentración de partículas lentivirales mediante ultracentrifugación....	89
6.3.	Determinación del título de partículas lentivirales.....	90
6.4.	Optimización del protocolo de transducción de HSPCs con LPs.....	92
6.5.	Cultivos comparativos de células modificadas (eHSPCs) y células no modificadas (nmHSPCs).....	96
6.5.1.	Ensayo preliminar en medio semisólido.....	96
6.5.2.	Cultivos en suspensión.....	96
6.6.	Análisis de la hEPO producida por los progenitores/precusores modificados obtenidos en 6.5.2.....	98
6.6.1.	Cuantificación de la producción celular de hEPO mediante la técnica de ELISA sándwich amplificado.....	98
6.6.2.	Determinación del patrón de isoformas de hEPO mediante isoelectroenfocado (IEF).....	99
6.6.2.1.	Desalado y concentración de sobrenadantes de cultivo.....	99
6.6.2.2.	Isoelectroenfocado (IEF).....	100

6.6.2.3.	Electrotransferencia a membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF)	101
6.6.2.4.	<i>Western Blot</i>	101
RESULTADOS		103
1.	Purificación de HSPCs utilizando como fuente sangre de cordón umbilical	104
1.1.	Generación de un banco celular de trabajo constituido por células mononucleares (MNCs) derivadas de unidades de sangre de cordón umbilical (SCU)	105
1.1.1.	Recolección de sangre de cordón umbilical (SCU).....	105
1.1.2.	Obtención de MNCs a partir de SCU y posterior generación del banco celular de trabajo.....	106
1.2.	Purificación de HSPCs CD34 ⁺	108
1.2.1.	Selección de un protocolo de aislamiento de células CD34 ⁺	108
1.2.1.1.	Clasificación celular por tecnología FACS (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> o Clasificación Celular Activada por Fluorescencia)	109
1.2.1.2.	Selección inmunomagnética positiva seguida por FACS	110
1.2.1.3.	Selección inmunomagnética positiva.....	112
2.	Desarrollo de condiciones de cultivo para la producción de células eritroides a partir de HSPCs	117
2.1.	Cultivo de HSPCs en medio de producción eritroide de referencia (MePERef)	118
2.1.1.	Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular	118
2.1.2.	Desarrollo y caracterización de los cultivos en MePERef	119
2.1.2.1.	Estudio de la expansión celular	120
2.1.2.2.	Estudio del potencial clonogénico	121
2.1.2.3.	Caracterización inmunofenotípica y morfológica.....	123
2.1.2.4.	Cuantificación de hemoglobina e índices de glóbulos rojos	126
2.2.	Desarrollo de un nuevo medio de producción eritroide	127
2.2.1.	Selección de factores (suplementos de cultivo) significativos para la expansión de HSPCs	127
2.2.1.1.	Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular	128
2.2.1.2.	Experimentos factoriales	129
2.2.1.3.	Análisis estadístico	130
2.2.1.3.1.	Respuesta 1: Porcentaje de células CD34 ⁺	131
2.2.1.3.2.	Respuesta 2: Expansión de células viables CD34 ⁺	136

2.2.1.4.	Análisis conjunto de las respuestas modeladas para la selección de factores y niveles a evaluar en la etapa de optimización	138
2.2.2.	Optimización de factores influyentes en la etapa de expansión de HSPCs por RSM.....	139
2.2.2.1.	Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular	140
2.2.2.2.	Experimentos de optimización.....	141
2.2.2.3.	Análisis estadístico	142
2.2.2.3.1.	Respuesta 1: Porcentaje de células CD34 ⁺	143
2.2.2.3.2.	Respuesta 2: Expansión de células viables CD34 ⁺	144
2.2.2.4.	Localización de las condiciones óptimas	147
2.2.3.	Pruebas de seguimiento o confirmación.....	148
2.2.3.1.	Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular	148
2.2.3.2.	Experimentos de confirmación. Cultivos y análisis	149
2.2.3.2.1.	Análisis de la Respuesta 1: Células CD34 ⁺ (%)	150
2.2.3.2.2.	Análisis de la Respuesta 2: Expansión de células viables CD34 ⁺ (veces).....	150
2.2.3.2.3.	Evaluaciones adicionales: capacidad clonogénica y marcadores eritroides	151
2.2.4.	Diferenciación eritroide de células cultivadas en MePEOpt 0-7	154
2.2.4.1.	Estudio de la expansión celular	155
2.2.4.2.	Estudio del potencial clonogénico	156
2.2.4.3.	Caracterización inmunofenotípica y morfológica.....	158
2.2.4.4.	Cuantificación de hemoglobina e índices de glóbulos rojos	161
3.	Modificación genética de las HSPCs con la secuencia de hEPO.	
	Desarrollo y análisis de cultivos de células recombinantes	164
3.1.	Construcción de vectores lentivirales para expresión en células eucariotas.....	165
3.1.1.	Construcción del vector de transferencia pLV-EF1 α -hEPO	165
3.1.2.	Construcción del vector de transferencia pLV-EF1 α -GFP	166
3.2.	Producción de los vectores lentivirales LVs EF1 α -GFP y LVs EF1 α -EPO	169
3.2.1.	Titulación de los vectores lentivirales	169
3.3.	Desarrollo y optimización de un protocolo de modificación genética de HSPCs empleando LVs.....	170
3.3.1.	Optimización de la suplementación del medio de transducción	170
3.3.1.1.	Respuesta 1: Porcentaje de células GFP ⁺	173

3.3.1.2.	Respuesta 2: Intensidad media de fluorescencia.....	174
3.3.1.3.	Respuesta 3: Número de células viables.....	177
3.3.1.4.	Localización de las condiciones óptimas	178
3.3.2.	Elección de la multiplicidad de infección (MOI)	179
3.4.	Desarrollo y análisis de cultivos de células recombinantes.....	180
3.4.1.	Ensayo preliminar de formación de colonias en medio semisólido empleando células recombinantes	180
3.4.2.	Cultivos en suspensión de células recombinantes	182
3.4.2.1.	Purificación de HSPCs y desarrollo de los cultivos.....	182
3.4.2.2.	Transducción lentiviral.....	184
3.4.2.3.	Evaluación de la expansión celular.....	185
3.4.2.4.	Análisis inmunofenotípico y morfológico	186
3.4.2.5.	Estudio de la producción de hEPO: cuantificación y determinación del perfil de isoformas	190
	DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	192
	ANEXO	205
	BIBLIOGRAFÍA	208

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α	alpha
β	beta
γ	gamma
κ	kappa
λ	lambda
μ	micro
ψ	psi
A	
AB0	Grupos sanguíneos: sistema AB0
ABAC	Asociación Banco Argentino de Células
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Algoritmo Genético
Ang-1	Angiopoyetina-1
ANN	Redes neuronales artificiales- <i>Artificial Neural Networks</i>
ANOVA	Análisis de la varianza
APC	Alofocianina- <i>AloPhicoCyanine</i>
APS	Persulfato de amonio- <i>Ammonium PerSulfate</i>
ARN	Ácido RiboNucleico
ATCC	Colección estadounidense de cultivos tipo- <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
B	
Baso	Basofílico
BBC	<i>Buffer</i> de Bloqueo para Citometría
BFU-E	Unidades formadoras de brotes eritroides- <i>Burst Forming Units-Erythroid</i>
BFU-Mk	Unidades Formadoras de Brotes de Megacariocitos
BMPs	Proteínas morfogénicas de hueso- <i>Bone Morphogenic Proteins</i>
BRP	Preparaciones biológicas de referencia- <i>Biological Reference Preparations</i>
BSA	Seroalbúmina bovina- <i>Bovine Serum Albumin</i>
BTC	<i>Buffer</i> de Tinción para Citometría

C

CAR	Células reticulares abundantes en CXCL-12- <i>CXCL-12-Abundant Reticular cells</i>
CD	Grupos de diferenciación- <i>Clusters of Differentiation</i>
CD	Corriente Directa
Cél	Células
CFDA-1	Anticoagulante: Citrato, Fosfato, Dextrosa, Adenina
CFU	Unidades formadoras de colonias- <i>Colony Forming Units</i>
CFU-E	Unidades Formadoras de Colonias Eritroides
CFU-G	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos
CFU-GEMM	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos y Megacariocitos
CFU-GM	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Monocitos
CFU-M	Unidades Formadoras de Colonias de Monocitos/macrófagos
CFU-MK	Unidades Formadoras de Colonias de Megacariocitos
CFU-S	Unidades formadoras de colonias de bazo- <i>Colony Forming Units-Spleen</i>
CHCM	Concentración de Hemoglobina Celular Media
CHO-K1	Subclon K1 de la línea celular de ovario de hámster chino- <i>Chinese Hamster Ovary</i>
CLP	Progenitor común linfoide- <i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMP	Progenitor común mieloide- <i>Common Myeloid Progenitor</i>
CMV	Citomegalovirus
CMVp	Promotor de CMV
CO ₂	Dióxido de carbono
col.	Colaboradores
Col.	Colonias
cPPT	Tracto central de polipurinas- <i>central PolyPurine Tract</i>
CRU	Unidades competitvas de repoblación- <i>Competitive Repopulation Units</i>
c.s.p	Cantidad suficiente para
CXCL	Ligando de quemoquinas- <i>Chemokine Ligand</i>
CXCR	Receptor de quemoquinas- <i>Chemokine Receptor</i>

D

Dex.	Dexametasona
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DoE	Diseño de Experimentos- <i>Design of Experiments</i>
DE	Desviación estándar
E	
EB	Eritroblastos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECs	Células endoteliales- <i>Endothelial Cells</i>
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetra Acético
EF1 α	Factor de elongación 1 α - <i>Elongation Factor 1α</i>
EGCs	Células germinales embrionarias- <i>Embryonic Germ Cells</i>
eHSPCs	Células madre/Progenitoras Hematopoyéticas modificadas con la secuencia de EPO
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
(h)EPO	Eritropoyetina (humana)
EPOc	Eritropoyetina humana comercial
EPOR	Receptor de Eritropoyetina
ESCs	Células madre embrionarias- <i>Embryonic Stem Cells</i>
Est.	Estándar
etc.	Etcétera
F	
F	Factor
FACS	Clasificación Celular Activada por Fluorescencia- <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FcR	Receptor del Fragmento constante de las inmunoglobulinas
Fig.	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína- <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
FIX	Factor IX de coagulación
FLT3-L	Ligando de tirosina kinasa 3 similar a FMS- <i>FMS- Like Tyrosine kinase 3-Ligand</i>
FSC	Células madre fetales- <i>Fetal Stem Cells</i>
G	
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa

Gag	Poliproteína antígeno de grupo
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos- <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GFP	Proteína verde fluorescente- <i>Green Fluorescent Protein</i>
gfpHSPCs	Células madre/progenitoras hematopoyéticas modificadas con la secuencia de GFP
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos- <i>Granulocyte and Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
GMP	Progenitor de granulocitos y macrófagos- <i>Granulocyte and Macrophage Progenitor</i>
GMP	Buenas prácticas de manufactura- <i>Good Manufacturing Practices</i>
gp130	glicoproteína 130
GPA/GPC	Glicoforina A/C
GRs	Glóbulos Rojos
GVHD	Enfermedad de injerto contra huésped- <i>Graft Versus Host Disease</i>
H	
H-CAM	Molécula de adhesión celular asociada al <i>homing</i> - <i>Homing associated Cellular Adhesion Molecule</i>
HCM	Hemoglobina Celular Media
HEK293T/17	Línea celular derivada de la línea de riñón embrionario humano 293T- <i>Human Embryonic Kidney 293T</i>
HGB	Hemoglobina
Hidroc.	Hidrocortisona
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano vinculado al antígeno D- <i>Human Leucocyte Antigen- antigen D Related</i>
Holo-Transf/Holot.	Holo-transferrina
HRP	Peroxidasa de rábano picante- <i>HorseRadish Peroxidase</i>
HSA	Seroalbúmina humana- <i>Human Serum Albumin</i>
HSCs	Células madre hematopoyéticas- <i>Hematopoietic Stem Cells</i>
HSPCs	Células madre/progenitoras hematopoyéticas- <i>Hematopoietic Stem/Progenitor Cells</i>
I	
IC	Intervalo de confianza
IEF	Isoelectroenfocado
IFN- γ	Interferón γ
IGF(-1/2)	Factor de crecimiento insulínico(-1/2)/ <i>Insulin Growth Factor(-1/2)</i>

IgG	Inmunoglobulina G
IL	
(-β/1/3/4/6/9/11)	Interleuquina (-β/1/3/4/6/9/11)
IL3RA	Receptor α de IL-3 (baja afinidad)
IL3RB	Receptor de IL-3 (cadena β común)
IMDM	Medio de Dulbecco modificado por Iscove
Ins.	Insulina
iPS/iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas- <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
IT	Índice de Tinción
IT-HSC	Células madre hematopoyéticas de repoblación a plazo intermedio- <i>Intermediate Term-Hematopoietic Stem Cells</i>
K	
Klf4	Factor 4 similar a Kruppel- <i>Kruppel Like Factor-4</i>
Kpb/kb	Kilo pares de bases
L	
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LoF	Falta de ajuste- <i>Lack of Fit</i>
LSM	Método de cuadrados mínimos- <i>Least Squares Method</i>
LT-HSC	Células madre hematopoyéticas de repoblación a largo plazo- <i>Long Term-Hematopoietic Stem Cells</i>
LTR	Repeticiones Terminales Largas- <i>Long Terminal Repeats</i>
LVs	Lentivirus
LPs	Partículas lentivirales- <i>Lentiviral Particles</i>
λ	Longitud de onda
M	
mAb	Anticuerpo monoclonal- <i>Monoclonal Antibody</i>
MCI	Macizo Celular Interno
MEP(-pre/E/MK)	Progenitor de eritrocitos y megacariocitos (bipotente, con sesgo eritroide o con sesgo megacariocítico)- <i>Megakaryocytes and Erythrocytes Progenitor</i>
MePE	Medio de Producción Eritroide
MePEOpt 0-7	Medio de Producción Eritroide Optimizado usado en los días 0-7

MePEOpt 0-7free	Medio de Producción Eritroide Optimizado usado en los días 0-7 libre de Plasma
MePERef	Medio de Producción Eritroide de Referencia empleado en los días 0-7; 7-11; 11-34
2-ME/ β -ME	2-Mercaptoetanol
miRNAs	MicroRNAs
MLV	Virus de la leucemia murina- <i>Murine Leukemia Virus</i>
MW	Masa molecular- <i>Molecular Weight</i>
MNCs	Células mononucleares- <i>Mononuclear cells</i>
MOI	Multiplicidad de Infección- <i>Multiplicity of Infection</i>
MPP	Progenitor multipotente- <i>MultiPotent Progenitor</i>
MSCs	Células madre mesenquimales- <i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MT	Medio de Transducción
N	
n	Tamaño muestral
N ₂	Nitrógeno
NA	No hay datos disponibles
n.d.	No detectable
Nef	Factor Regulatorio Negativo- <i>Negative Regulatory Factor</i>
neg	Población negativa
NK	Células asesinas humanas - <i>Natural Killer</i>
nmHSPCs	Células madre/progenitoras hematopoyéticas no modificadas/ Non Modified Hematopoietic Stem/Progenitor Cells
NR	Células No Retenidas
NSCs	Células madre neurales- <i>Neural Stem Cells</i>
O	
O ₂	Oxígeno
Oct4	Factor de transcripción 4 de unión a octámero
ON	Durante la noche- <i>OverNight</i>
OPD	Ortofenilendiamina- <i>Ortho-PhenyleneDiamine</i>
Ord.	Orden
ORF	Marco abierto de lectura – <i>Open Reading Frame</i>
ORI	Origen de replicación bacteriano
Orto	Ortocromático
Osteomacs	Macrófagos de tejido óseo
OVAT	Una variable a la vez- <i>One Variable At a Time</i>

P

p24	Proteína de cápside viral 24
PB	<i>Plackett-Burman</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de fosfatos
PBS	Sitio de unión a cebadores- <i>Primer Binding Site</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Ficoeritrina- <i>PhycoErythrin</i>
PE-Cy5	Ficoeritrina conjugada a Cianina 5
PE-Cy7	Ficoeritrina conjugada a Cianina 7
PEG	Polietilenglicol
PFC	Plasma Fresco Congelado
PGCs	Células germinales primordiales- <i>Primordial Germ Cells</i>
Poli	Policromatófilico
pos.	Población positiva
Pred.	Predicción puntual
Pro-B	Progenitores intermedios de Linfocitos B
Pro-DC	Progenitores intermedios de células dendríticas
Pro-NK	Progenitores intermedios de células asesinas naturales
Pro-T	Progenitores intermedios de Linfocitos T
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno- <i>PolyVinylidene Fluoride</i>

Q

Q Cuartil

R

R	Células Retenidas
R(1/2/3)	Respuesta 1/2/3
R ²	Coefficiente de determinación
Ret.	Reticulocito
rh	Recombinante humano
Rh-AG	Glicoproteína asociada a Rh- <i>Rh-Associated Glycoprotein</i>
RhD	Factor sanguíneo <i>Rhesus</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno- <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRE	Elemento de respuesta a Rev- <i>Rev Response Element</i>

RSM	Metodología de Superficie de Respuesta- <i>Response Surface Methodology</i>
RSV	Virus del Sarcoma de Rous- <i>Rous Sarcoma Virus</i>
S	
SCF	Factor de célula madre- <i>Stem Cell Factor</i>
SCFH	Factor de células madre glicosilado con cola de poli-Histidina
SCU	Sangre de Cordón Umbilical
SDF-1	Factor derivado de células estromales-1- <i>Stromal Cells Derived Factor-1</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SI	Separación Inmunomagnética
SIN	Auto-inactivante- <i>Self-INactivating</i>
SLS	Laurilsulfato sódico
SP	Sangre Periférica
SSC	Dispersión lateral- <i>Side Scatter</i>
ST-HSC	Células madre hematopoyéticas de repoblación a corto plazo- <i>Short Term-Hematopoietic Stem Cells</i>
SV40	Virus símico 40
T	
T3	Triyodotironina
TA	Temperatura Ambiente
Tat	Proteína transactivadora de VIH
TBS	Solución salina tamponada con Tris- <i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetrametilendiamina
TGF- β	Factor transformante de crecimiento β - <i>Transforming Growth Factor β</i>
Thy1	Antígeno de timocito- <i>Thymocyte antigen 1</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α - <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TPO	Trombopoyetina
Tween 20	Polisorbato 20
U	
UT	Unidades Transduccionales
UV	Ultravioleta

V

VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1- <i>Vascular Cellular Adhesion Molecule-1</i>
VCM	Volumen Celular Medio
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular- <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
V+I	Vector + Inserto
Vif	Factor de infectividad viral- <i>Viral Infectivity Factor</i>
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Vpr	Proteína viral R- <i>Viral Protein R</i>
Vpu	Proteína viral U- <i>Viral Protein U</i>
V _R	Vector religado
Vs	versus
VSV	Virus de la estomatitis vesicular- <i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
VSV-G	Glicoproteína G del VSV

W

WPRE	Elemento regulatorio post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota- <i>Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element</i>
------	---

X

X	Concentración de células
X _M	Concentración de células muertas
X _T	Concentración de células totales
X _V	Concentración de células viables
<i>X-mean</i>	Intensidad media de fluorescencia

UNIDADES

cm	centímetro
mm	milímetro
μm	micrómetro
nm	nanómetro
cm ²	centímetro cuadrado
g	gramo
mg	miligramo
μg	microgramo

ng	nanogramo
pg	picogramo
l	litro
dl	decilitro
ml	mililitro
μ l	microlitro
fl	femtolitro
h	hora
min	minuto
M	molar
mM	milimolar
μ M	micromolar
N	normal
UI	unidades internacionales
mU	miliunidades
kDa	kiloDalton
rpm	revoluciones por minuto
V	voltio
W	vatio
M Ω	Megaohms
%	por ciento
% (V/V)	mililitros de soluto en 100 ml de solución
% (P/V)	gramos de soluto en 100 ml de solución
mA	miliamperio
$^{\circ}$ C	grado Celsius

RESUMEN

Las células sanguíneas humanas del linaje eritroide en sus diferentes estadios de maduración presentan aplicaciones relevantes y diversas, ya sea como agentes terapéuticos en sí mismas o como potenciales vehículos celulares para la incorporación de activos en el organismo. Asimismo, podrían ser empleadas *ex vivo* en ensayos dedicados a estudiar la acción de nuevos (bio)compuestos o a detectar anticuerpos específicos anti-antígenos eritrocitarios en muestras de pacientes, con el objetivo final de identificar pares de transfusión adecuados o individuos aloinmunizados.

Debido a la dificultad para acceder a suministros celulares seguros en casos de fenotipos raros o de pacientes poli-transfundidos y poli-inmunizados, en los últimos años se han llevado a cabo esfuerzos a nivel mundial para desarrollar metodologías y herramientas biotecnológicas que permitan la producción *ex vivo* de las células eritroides requeridas a partir de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPCs). Dichos esfuerzos, en general, han tenido como finalidad la producción masiva de glóbulos rojos, que constituyen el estadio final de maduración eritroide. Si bien se ha realizado incluso una prueba de concepto de la administración en un humano de glóbulos rojos cultivados, los protocolos disponibles presentan un costo muy elevado y una baja rentabilidad. Esto impide su aplicación en la práctica clínica transfusional y restringe su empleo en el resto de las aplicaciones mencionadas.

Por estas razones, este trabajo propone el diseño y aplicación de estrategias para producir cantidades adecuadas de células eritroides a partir de HSPCs derivadas de sangre de cordón umbilical, reduciendo el uso de factores de crecimiento costosos en el proceso de cultivo y contribuyendo así a una mejor comprensión de los procesos de producción.

Para ello se plantearon dos hipótesis principales de trabajo: por un lado, el desarrollo de procedimientos de diseño experimental permitiría generar, de manera racional, sistemática y en función de la información disponible, una formulación óptima y eficiente (es decir, que minimice el consumo de recursos) del medio de cultivo utilizado para la expansión de las HSPCs. Adicionalmente, se propuso que el empleo de un proceso de transgénesis lentiviral de las HSPCs con el gen de la eritropoyetina (hEPO) posibilitaría que las células produzcan y secreten la hormona en el medio de cultivo y que, consecuentemente, se reduciría el uso de este factor de crecimiento como suplemento.

Así, en primer lugar, la optimización de la formulación del medio de cultivo se basó en el estudio de los efectos de los suplementos de cultivo sobre la expansión celular, ya que los factores de crecimiento contribuyen en un 57,5% al costo total del

medio, mientras que la transferrina y el plasma lo hacen en un 36%. De esta manera, se empleó una estrategia de diseño experimental secuencial basada en la selección y optimización de las concentraciones de suplementos de cultivo con efectos significativos sobre la expansión de las HSPCs, las cuales, luego de su expansión, fueron cultivadas en un medio descrito para la expansión y maduración de los precursores eritroides. Inicialmente se empleó un diseño experimental factorial de *Plackett-Burman* que permitió estudiar la significancia estadística del efecto de 11 factores sobre la expansión de las HSPCs, evaluada a través del recuento en cámara de Neubauer, y de la expresión del marcador de células hematopoyéticas CD34, mediante citometría de flujo. Este análisis permitió seleccionar tres compuestos: albúmina sérica bovina (BSA), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e hidrocortisona.

En un paso posterior se optimizaron los niveles de dichos factores mediante un diseño experimental de *Box-Behnken*, en el que se mantuvieron constantes los niveles de los demás factores evaluados. Nuevamente, a partir del análisis de expansión celular y de expresión de CD34 se halló que las concentraciones óptimas de BSA, GM-CSF e hidrocortisona son 2% (P/V), 20 ng/ml y 4×10^{-5} M, respectivamente. Al finalizar la inducción eritroide de las células obtenidas en el medio de expansión optimizado, se pudo comprobar que la progresión global de los cultivos resultó favorable debido a que se alcanzó una expansión celular acumulada máxima de 571 veces en 18 días y se evidenció una diferenciación eritroide progresiva. La diferenciación celular fue evaluada mediante análisis inmunofenotípico por citometría de flujo, estudio morfológico mediante tinción de May-Grünwald-Giemsa, detección de hemoglobina y estudio de los precursores presentes por ensayos de formación de colonias. Así, se obtuvo evidencia de la elevada selectividad eritroide de las nuevas condiciones de cultivo.

La segunda estrategia abordada implicó la generación de HSPCs genéticamente modificadas con la secuencia de hEPO. Con este fin se construyeron vectores de expresión; se ensamblaron, acondicionaron y titularon vectores lentivirales y con ellos se transdujeron HSPCs. Con éstas, se efectuaron cultivos en ausencia de EPO comercial [eHSPCs-EPOc (-)], cuyo desarrollo fue comparado con cultivos de células no modificadas suplementados con EPOc [nmHSPCs-EPOc (+)]. Ambas líneas alcanzaron un estado similar de maduración, mostrando un compromiso celular hacia el linaje eritroide, lo cual fue demostrado por un decaimiento en la expresión de los marcadores CD34 y CD45, así como un incremento en la proporción de células que expresan CD71 y CD235a (marcadores eritroides), según el análisis por citometría de flujo. También se observaron cambios morfológicos y en la afinidad por colorantes característicos de la maduración eritroide. Se demostró que dicha diferenciación lograda en los cultivos de eHSPCs-EPOc (-) fue inducida por la hEPO secretada por las propias células ya que,

en primer lugar, al efectuar cultivos control de nmHSPCs-EPOc (-) no se observó diferenciación eritroide. Por otro lado, la secreción de hEPO fue probada mediante ELISA sándwich e isoelectroenfocado seguido por *Western Blot*, el cual mostró similitud entre las isoformas de EPOc y de la hEPO secretada, aunque esta última presentó isoformas levemente menos acídicas que la primera.

Así, las HSPCs genéticamente modificadas con la secuencia de hEPO fueron auto-inducidas a diferenciar *in vitro*, en ausencia de EPOc, en poblaciones altamente enriquecidas en células eritroides, lo que permitiría reducir la cantidad de EPOc adicionada en los cultivos y, de este modo, el costo asociado.

En conclusión, ambas estrategias desarrolladas en este trabajo podrían aplicarse conjuntamente en el futuro para lograr mejoras prácticas en los procesos biotecnológicos destinados a la producción *ex vivo* de células eritroides con diversos fines, los cuales se encuentran actualmente en etapas de desarrollo y optimización.

ABSTRACT

Erythroid lineage human blood cells in different maturation stages have relevant and diverse applications, both as therapeutic agents themselves and as potential cell vehicles for drug delivery into the human body. They could also be utilized *ex vivo* for (bio)compounds screening assays or for the detection of specific antibodies against erythroid antigens in patient samples in order to identify suitable transfusion matches or allo-immunized individuals.

The difficulty to find safe cell supplies in cases of rare phenotypes or poly-transfused poly-immunized patients has prompted world efforts in the last years, intended for the development of methodologies and biotechnological tools, which allow *ex vivo* production of erythroid cells from hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs). In general, such efforts aimed to produce large quantities of red blood cells, which are the final stage of erythroid maturation. Even though a proof of principle for transfusion of *in vitro*-generated red blood cells in a human has been carried out, the available protocols are expensive and not cost effective. It prevents its application in transfusional clinical practice and limits other uses.

For these reasons, this work's approach is to design and to apply strategies to produce appropriate amounts of erythroid cells from umbilical cord blood HSPCs, thus reducing expensive growth factors utilization in cultures and contributing to improve these production processes comprehension. With these aims, two hypotheses were established: experimental design development would allow rational and systematical obtainment of an optimal and efficient formulation of the HSPCs expansion culture medium. Additionally, we proposed that HSPCs lentiviral transgenesis with the erythropoietin (hEPO) gene would make cells produce and secrete the hormone into the culture medium and, consequently, it would reduce hEPO utilization as supplement.

First, in order to optimize the culture medium formulation, we studied the supplements' effects over cell expansion. It is important because growth factors contribute in a 57.5% to total medium cost, whereas transferrin and plasma contribute in a 36%. A sequential experimental design strategy was applied and it was based in the selection and optimization of concentrations of culture supplements with significant effects over HSPCs expansion. After expansion, HSPCs were cultured in a reported medium for expansion and maturation of erythroid precursors. Initially, a *Plackett-Burman* factorial experimental design was applied in order to study the statistical significance of the effects of 11 factors over HSPCs expansion, which was evaluated by Neubauer chamber cell counting and through the assessment of CD34 hematopoietic cells marker by flow cytometry. Three compounds were selected as

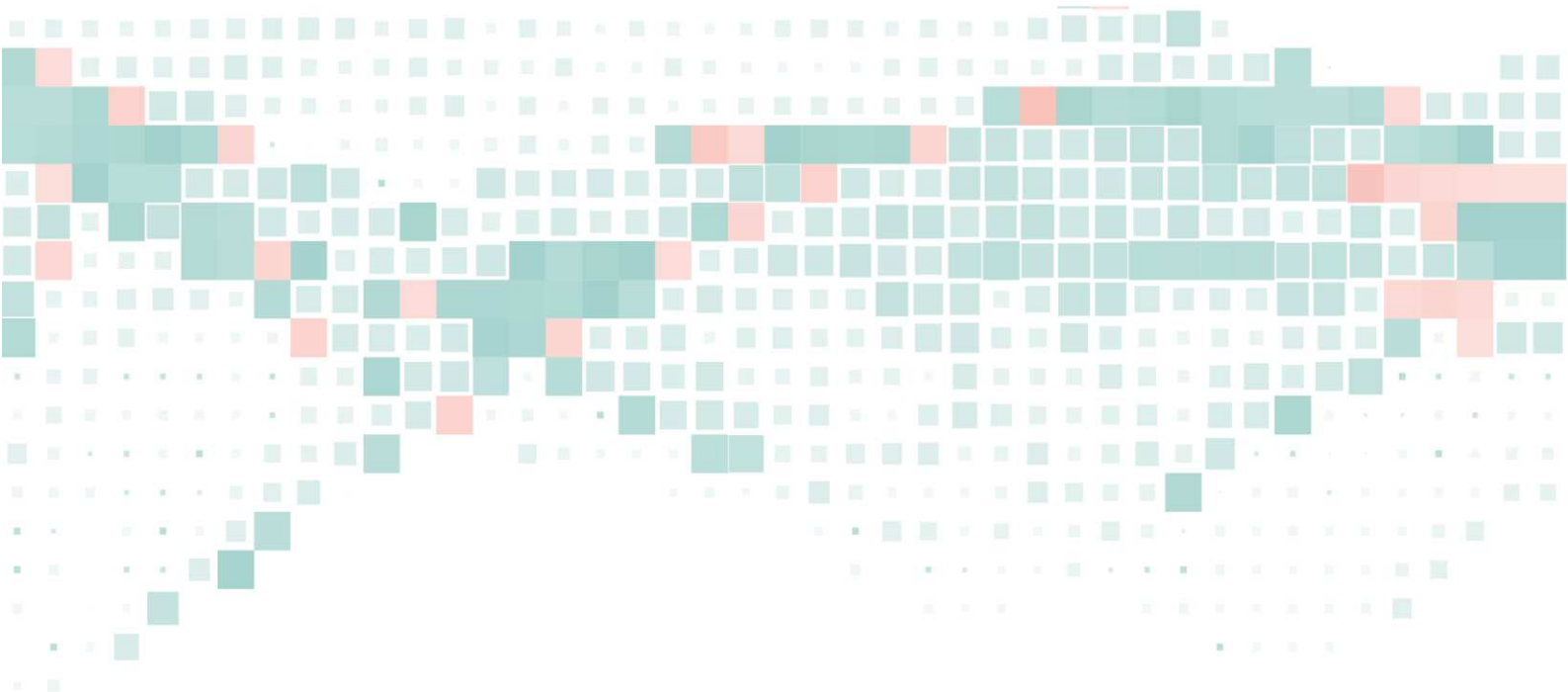
significant: bovine seric albumin (BSA), granulocyte and macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF) and hydrocortisone.

A *Box-Behnken* design was utilized to optimize the selected factors' levels, maintaining the remaining factors in constant levels. After cell expansion and CD34 expression analysis, the optimal concentrations of BSA, GM-CSF and hydrocortisone were found to be 2% (W/V), 20 ng/ml and 4×10^{-5} M, respectively. Cells obtained from the optimized culture medium were induced to differentiate, after which it was possible to observe an adequate global progress: 571-fold accumulated cell expansion was reached in 18 days and progressive erythroid differentiation was evidenced. Cell differentiation was assessed through flow cytometry immunophenotypic analyses, May-Grünwald-Giemsa staining morphological studies, hemoglobin detection and colony forming units' assays evaluation. They showed culture conditions allow high erythroid selectivity.

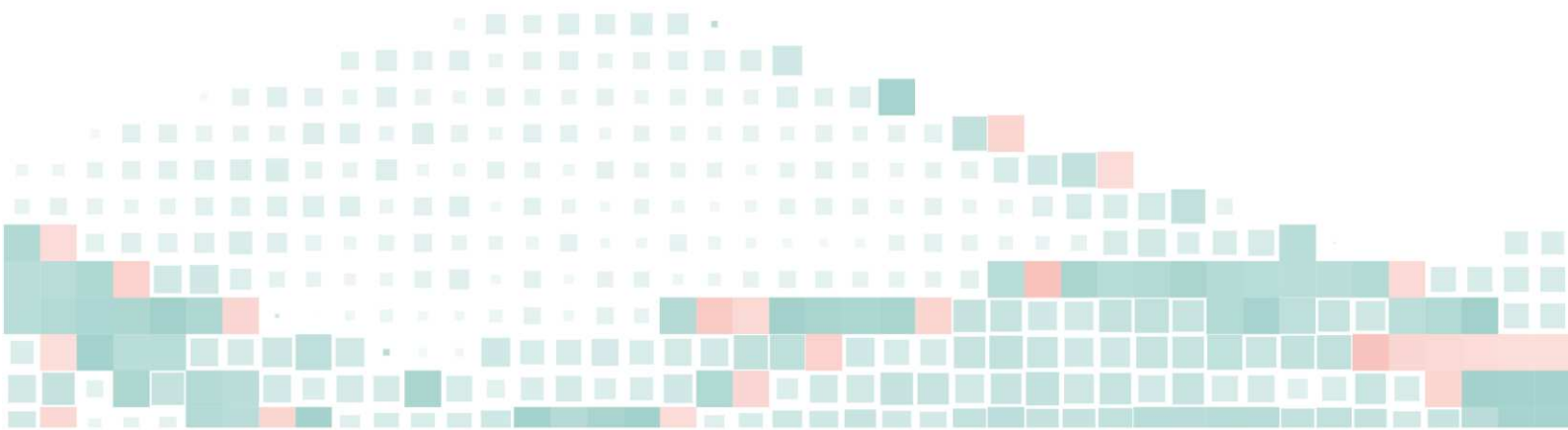
The second approach consisted in the generation of genetically modified HSPCs with hEPO sequence. Expression vectors were generated; lentiviral vectors were assembled, concentrated, titrated and finally used to transduce HSPCs. Transduced cells were cultured in absence of commercial EPO [eHSPCs-EPOc (-)] and these cultures were compared with non-modified cell cultures supplemented with EPOc [nmHSPCs-EPOc (+)]. Both cell lines reached a similar maturation state and showed erythroid cell commitment. This was proven by a reduction in CD34 and CD45 markers' expression and an increase in the percentage of CD71 and CD235a (erythroid markers)- expressing cells, as shown by cytometric analysis. In addition, morphological changes and a shift in dyes affinity, which is characteristic of erythroid maturation, were evidenced. The cell differentiation reached in eHSPCs-EPOc (-) cultures was shown to be induced by secreted hEPO: control cultures of nmHSPCs-EPOc (-) did not show erythroid differentiation; furthermore, hEPO secretion was proven by sandwich ELISA and isoelectric focusing followed by western blotting, which showed high similarity between EPOc and secreted hEPO isoforms, although the latter had slightly less acidic isoforms.

Thus, eHSPCs were self-induced to differentiate *in vitro* in absence of EPOc, into populations highly enriched in erythroid cells, which allows reducing the amount of EPOc added into cultures and the consequent associated cost.

In conclusion, both strategies developed in this work are interesting to be applied together in the future in order to improve the biotechnological processes intended for *ex vivo* production of erythroid cells with different purposes, which are currently in development and optimization stages.



Introducción



Omnis cellula e cellula (todas las células vienen de células). Rudolph Virchow (1858).

1. CÉLULAS MADRE

1.1. Características y relevancia de las células madre

Las células madre se encuentran presentes en la mayoría de los organismos multicelulares y son las determinantes fundamentales del crecimiento y la regeneración. Éstas se definen como células capaces de auto-renovarse (es decir, de generar al menos una copia idéntica de la célula hija) y diferenciarse en una variedad de tipos celulares más especializados, propiedad que se denomina potencialidad celular [1,2]. Aunque la característica de auto-renovación también se cumple para las células cancerosas, que se dividen de manera descontrolada, la división de las células madre se encuentra altamente regulada [3].

Un aspecto importante relacionado con la auto-renovación y la generación de células diferenciadas, es el destino de las dos células hijas cuando una célula madre se divide. La división simétrica se define como la generación de células hijas destinadas a adquirir el mismo destino celular, ya sea dos células madre o dos células con mayor grado de diferenciación. Por otro lado, si una célula hija tiene identidad de célula madre y la otra célula hija comienza a diferenciarse, esto se denomina división asimétrica de las células madre [4]. Este tipo de división es particularmente interesante porque las células madre logran tanto auto-renovarse como producir células diferenciadas en una única división celular [5]. Sin embargo, una desventaja de la división asimétrica es que esto hace que las células madre sean incapaces de expandirse en número. Estos dos modos de división permiten un control dinámico de sus números [6]. Los datos disponibles, aunque son frecuentemente incompletos, sugieren que la mayoría de las células madre tienen la capacidad de alternar entre modos de división asimétrica y simétrica, y que el balance entre estos dos modos se encuentra defectivo en algunos estados de enfermedad. Brevemente, dos tipos principales de mecanismos dirigen la división celular asimétrica: el primero se basa en la partición asimétrica de los componentes celulares que determinan el destino celular (mecanismos intrínsecos); el segundo involucra la ubicación asimétrica de las células hijas en relación a factores externos (mecanismos extrínsecos) [6]. Estos mecanismos se muestran en la Figura 1.

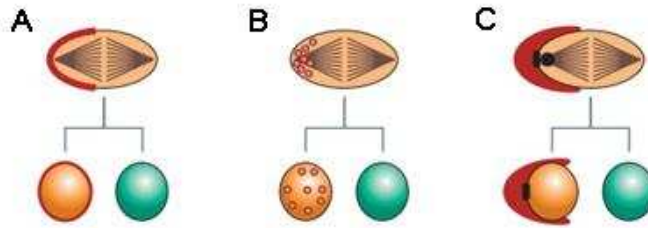


Fig. 1. Controles de la división asimétrica de células madre (se muestran tres mecanismos simples, pero no necesariamente son los únicos posibles). **A.** La localización asimétrica de reguladores de la polaridad celular (rojo) inicia la división asimétrica. Las células madre se indican en color naranja y las células diferenciadas, en verde. **B.** Los determinantes del destino celular (rojo) pueden ser segregados hacia el citoplasma de una célula hija, como se indica aquí, o pueden estar asociados a la membrana, el centrosoma u otro constituyente celular que se encuentra distribuido diferencialmente en las células hijas. **C.** La orientación regulada del huso mitótico retiene sólo una célula hija en el nicho de célula madre (rojo), de modo tal que sólo esa célula hija tiene acceso a las señales extrínsecas necesarias para mantener la identidad de célula madre, lo cual genera un resultado asimétrico, aún cuando la división en sí misma es intrínsecamente simétrica. En un modelo similar pero alternativo, la célula hija ubicada de manera más alejada del nicho se encuentra expuesta a señales que inducen la diferenciación (figura modificada de Morrison y Kimble, 2006 [6]).

Estas células se consideran los componentes biológicos más críticos necesarios para el adecuado crecimiento y desarrollo durante la embriogénesis, pero también se ha demostrado que juegan roles indispensables en organismos adultos, en los que constituyen una fuente necesaria para la reposición celular de prácticamente todos los tipos celulares diferenciados maduros [1]. De esta manera, la investigación en el área de las células madre ha ganado interés durante las últimas dos décadas ya que representan nuevas perspectivas en terapias basadas en células y en medicina regenerativa, incluso para pacientes con condiciones incurables. Sin embargo, aún existen dificultades técnicas en su utilización que sólo podrán ser superadas luego de años de investigación profunda. En segundo lugar, las células madre aisladas de pacientes pueden servir como modelo *in vitro* para varias enfermedades y para el desarrollo de drogas. Finalmente, la comprensión de la biología de las células madre mejorará nuestro conocimiento sobre la embriogénesis y la biología celular en general [2].

1.2. Potencialidad y origen

Todas las células madre se originan a partir de lo que podría considerarse la célula madre fundamental, el óvulo fecundado. Como una entidad *totipotente*, el óvulo fecundado o cigoto (y también los blastómeros tempranos) tiene la capacidad de dar origen a todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios (o trofoblasto) durante el crecimiento y desarrollo de un organismo [2]. Es durante el proceso de maduración embrionaria que ocurre la determinación, en la cual se generan una variedad de tipos

de células madre más especializadas, con propiedades diferentes que permiten el desarrollo de tejidos y órganos específicos. Por ejemplo, las células madre *embrionarias* tienen la capacidad *pluripotente* de conducir la formación de todos los tejidos del embrión propiamente dicho (es decir, los tejidos derivados de las tres capas germinales: endo-, meso- y ectodermo así como las líneas germinales), pero no de tejidos extraembrionarios como la placenta o la membrana amniótica. A medida que el embrión madura, se producen células madre *multipotentes* determinadas, las cuales proveen la capacidad limitada pero extremadamente poderosa de producir tipos celulares más diferenciados específicos de tejido (dentro de una misma capa germinal). Un ejemplo de multipotencia es la población de células madre del sistema hematopoyético, que conduce la formación de la sangre a partir de una célula madre precursora común, tanto durante el desarrollo embrionario, como durante toda la vida luego del nacimiento. Mientras que las células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPCs) pueden diferenciarse en una variedad de tipos de células de la sangre, no contribuyen a otros sistemas de órganos. Esta capacidad de diferenciación restringida las define como *adultas* [1]. Las células madre adultas, entonces, se encuentran en organismos completamente desarrollados y en la sangre de cordón umbilical [2]. Existen en muchos órganos: médula ósea, piel, cerebro, intestinos, hígado, tejido adiposo, cartílagos y córnea del ojo [7]. Finalmente, en el adulto maduro, las células madre *unipotentes* residen en unos pocos sistemas como el corazón y el sistema nervioso central, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse sólo en un linaje maduro [1]. La jerarquía de células madre se describe esquemáticamente en la Figura 2.

Adicionalmente, los científicos han encontrado el modo de producir células madre a partir de células somáticas adultas de los pacientes mediante reprogramación nuclear. La metodología para la derivación de células madre a través de pluripotencia inducida (iPS) fue desarrollada por Yamanaka y col., quienes determinaron cuáles son los factores de transcripción necesarios para revertir el fenotipo celular terminalmente diferenciado. De este modo, encontraron cuatro factores de transcripción clave, Oct4, c-Myc, Klf4 y Sox2, que al ser introducidos en células somáticas adultas en combinación, dirigen una conversión morfológica y molecular que resulta en la obtención de células semejantes a células embrionarias. Más tarde se demostró que c-Myc es dispensable para la inducción de pluripotencia. Este avance puede eliminar la necesidad de utilizar embriones en el desarrollo de terapias de medicina regenerativa basadas en células madre pluripotentes [1,8].

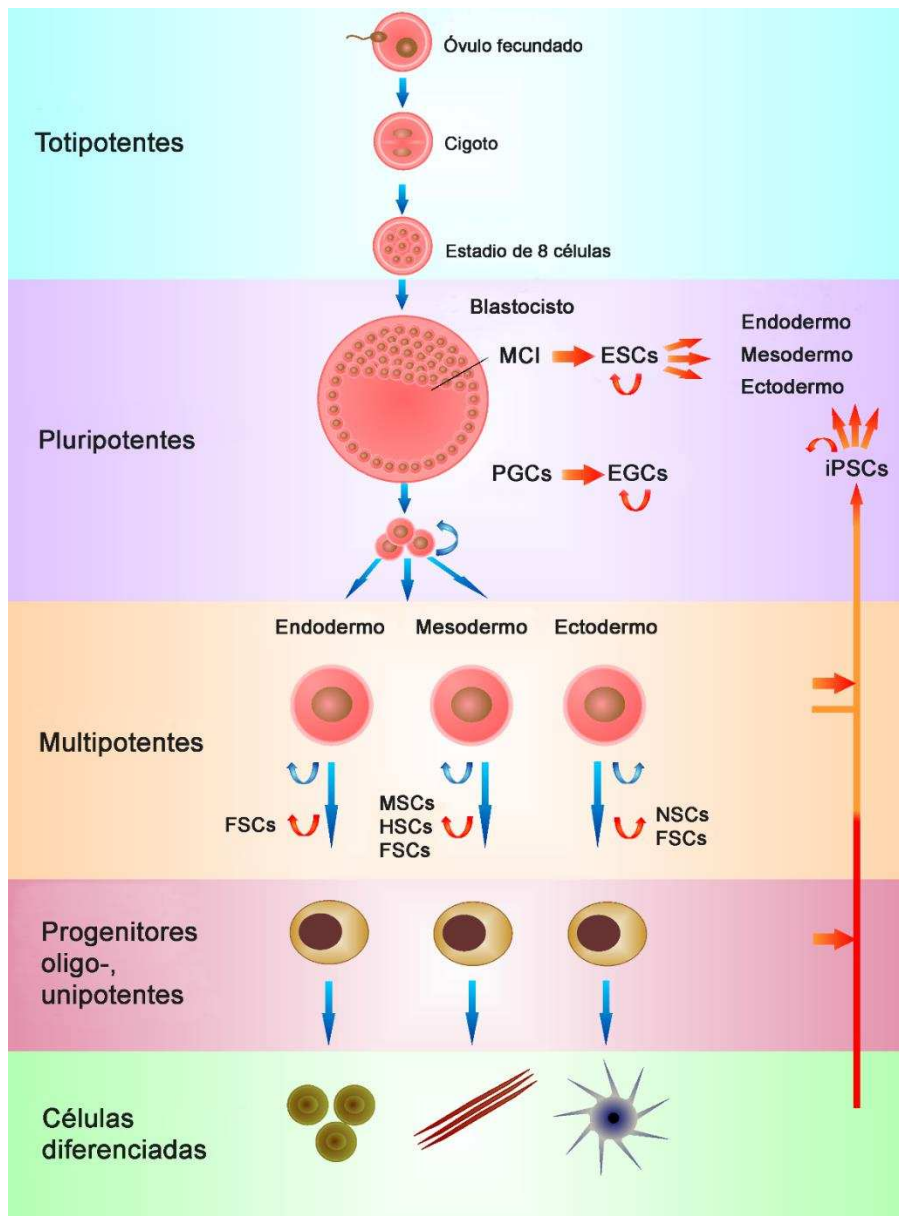


Fig. 2. Jerarquía de las células madre. Las células madre embrionarias (ESCs) derivan de células totipotentes del estadio embrionario temprano de los mamíferos y son capaces de proliferar *in vitro* ilimitadamente, sin diferenciación, pero también manteniendo el potencial para generar un amplio rango de precursores funcionales y células terminalmente diferenciadas. Las ESCs se derivan del macizo celular interno (MCI) del blastocisto. En la figura se indican también algunos ejemplos de células multipotentes de las diferentes capas germinales, donde MSCs significa células madre mesenquimales; HSCs significa células madre hematopoyéticas; FSCs significa células madre fetales; y NSCs indica células madre neuronales. En la imagen también se indica la capacidad que tienen las células pluripotentes de dar origen a las células germinales primordiales (PGCs), que generan las células germinales embrionarias (EGCs) (figura modificada de Forostyak y col., 2016 [2]).

2. CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (HSPCs)

2.1. Propiedades de las HSPCs

Como fue indicado previamente, las células madre adultas son células indiferenciadas que se encuentran en tejidos u órganos maduros, que pueden auto-renovarse o diferenciarse en algunos o todos los tipos de células especializadas de ese órgano o sistema de tejidos. Éstas constituyen un recurso valioso para el tratamiento de numerosos desórdenes médicos. Sin embargo, cabe destacar que presentan capacidad de división celular y diferenciación limitadas, lo que las distingue de las células embrionarias [1].

En cada uno de estos tejidos existe un *nicho* de célula madre, una localización anatómica específica con un microambiente ideal, en el cual residen las células madre adultas y que determina su propagación y diferenciación según las demandas del organismo [1,9].

Las células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPCs) pueden ser definidas como una población de células multipotentes capaces de diferenciarse en los tipos celulares mieloides o linfoides del sistema circulatorio. Durante el desarrollo embrionario temprano de los vertebrados, las HSPCs existen como hemangioblastos extra-embrionarios, que se diferencian tanto en células endoteliales como eritrocitos para dirigir el desarrollo de la vasculatura del saco vitelino. Las que se conocen como HSPCs “adultas” se originan de manera más tardía en el desarrollo y no están relacionadas con los hemangioblastos, aunque se piensa que mecanismos de control transcripcional y señalización similares conducen la formación de las HSPCs tempranas durante la embriogénesis y el desarrollo fetal, e incluso en el adulto [10].

2.1.1. Migración

A lo largo de la vida del individuo, las HSPCs conservan la capacidad de migrar, lo cual es necesario para la homeostasis. Inicialmente, migran desde sitios embrionarios y extra-embrionarios específicos hacia el hígado fetal (otro sitio hematopoyético) a través de la circulación, finalizando su recorrido de desarrollo en la médula ósea, donde es mantenida la mayoría de la hematopoyesis definitiva [11]. Sin embargo, continúan circulando a lo largo de la vida posnatal por razones aún no esclarecidas. Así, las HSPCs circulantes pueden migrar hacia la médula ósea, mediante un proceso llamado “*homing*”, y alojarse en su nicho, lo que permite su supervivencia, auto-renovación y proliferación regulada [12,13]. Inversamente, las HSPCs de médula ósea egresan constitutivamente al torrente sanguíneo.

El trasplante de HSPCs explota este fenómeno natural de migración a través de la liberación forzada de células madre (a lo que se llama “movilización”) mediante

citoquinas como G-CSF y/o quimioterapia, para así facilitar su recolección a partir de sangre periférica (aunque también pueden ser recolectadas de médula ósea). Asimismo, una simple infusión intravenosa de HSPCs puede reconstituir el reservorio hematopoyético de la médula ósea luego de terapia mieloablativa [14]. El proceso de *homing* involucra la activación secuencial de moléculas de adhesión: los progenitores CXCR4⁺ son activados por *Stromal cell-Derived factor- 1* (SDF-1) y *Vascular Cellular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), los cuales facilitan su firme adhesión a las células endoteliales (ECs). Las células circulantes transplantadas interactúan con las ECs “rodando” sobre las selectinas endoteliales (E) y de plaquetas (P) expresadas constitutivamente. SDF-1 detiene a las *stem cells* CXCR4⁺, facilitando su extravasación a través de las barreras de matriz extracelular de la médula, hacia los compartimientos hematopoyéticos. SDF-1, junto con otros factores, activa la unión de las células a fibronectina por medio de la activación de receptores de integrinas, hasta que finalmente alcanzan el nicho, en el cual interactúan con células de soporte, moléculas de adhesión, SDF-1 y factores de crecimiento. A pesar de las condiciones adversas presentes en los nichos de la médula ósea del huésped, las HSPCs infundidas generan progenitores suficientes para repoblar el sistema hematopoyético con células maduras y luego reversionan a un estado latente, de división lenta, para evitar el agotamiento [15].

2.1.2. Características fenotípicas y funcionales de las HSPCs

En el sistema hematopoyético las propiedades de diferenciación, multipotencialidad y auto-renovación fueron demostradas inicialmente a través de experimentos que exponían la capacidad de un subconjunto de células dentro de la médula ósea de formar colonias macroscópicas al ser transplantadas en el bazo de animales receptores letalmente irradiados. Se encontró que estas colonias contenían progenie diferenciada de múltiples linajes de la sangre y que un conjunto de éstas podía formar colonias nuevamente al ser transplantadas en hospederos secundarios. Así, las mismas provenían de progenitores más comprometidos que las células madre hematopoyéticas, lo que indica la existencia de una elevada complejidad en la biología de estas células [16].

Las HSPCs fueron las primeras células madre tejido-específicas en ser aisladas y son las únicas que actualmente se utilizan de manera rutinaria en el ámbito clínico para el tratamiento de una variedad de enfermedades sanguíneas tales como leucemias y desórdenes autoinmunes [16].

Un número importante de descubrimientos experimentales sustentan el éxito de la biología de las HSPCs. Éstos incluyen el desarrollo de sistemas de ensayos *in vitro* e *in vivo* que evalúan el potencial de linajes y la auto-renovación, así como avances

tecnológicos que incluyen FACS (separación celular activada por fluorescencia) y la tecnología de anticuerpos monoclonales, los cuales permiten la discriminación y evaluación funcional de subconjuntos celulares a nivel clonal [16]. La sangre de cordón umbilical, la sangre periférica y la médula ósea son las principales fuentes de HSPCs. Su caracterización y enumeración a partir de estas muestras puede proveer información valiosa para la investigación clínica. Los principales marcadores que se emplean para su evaluación y aislamiento son CD34 y Thy1 y la ausencia de CD38, CD33 y HLA-DR. Adicionalmente, las HSPCs expresan moléculas de adhesión como L-selectina, integrinas y moléculas de adhesión celular asociadas al *homing* (H-CAM) [17]. CD34 fue el primer marcador de superficie celular utilizado y se trata de un ligando transmembrana para L-selectina, expresado por sólo un 0,5-5% de células de la sangre en hígado fetal humano; aproximadamente 0,1-0,4% de células de sangre de cordón umbilical; 1-3% de células de la médula ósea adulta y 0,01-0,1% de células de sangre periférica [18]. Esta proteína es monomérica y se encuentra altamente O-glicosilada. La densidad del antígeno CD34 decrece con la maduración celular y no es expresado en células maduras [19,20]. A pesar de que la mayoría de las células CD34⁺ (90-99%) co-expresan CD38, las células que pueden dar lugar a colonias multi-linaje que contengan tanto células mieloides como linfoides, reside en la fracción CD38^{-low} y en la fracción CD90⁺. Además, las células CD34⁺CD38⁻ y no las CD34⁺CD38⁺ se encuentran enriquecidas en células iniciadoras de cultivo a largo plazo [20]. Sin embargo, las HSPCs pueden ser referidas simplemente como CD34⁺, una población celular heterogénea, en la cual sólo una pequeña fracción son realmente HSCs, en la cual también existen células inmaduras que exhiben un alto grado de potencial proliferativo [21].

2.1.3. Jerarquía y potencialidad

En el sistema hematopoyético las células madre (HSCs) residen en el punto más alto de la jerarquía hematopoyética y dan origen a células efectoras funcionales de al menos nueve tipos diferentes en procesos de diferenciación sucesivos de células progenitoras cada vez más comprometidas [16] (Figura 3).

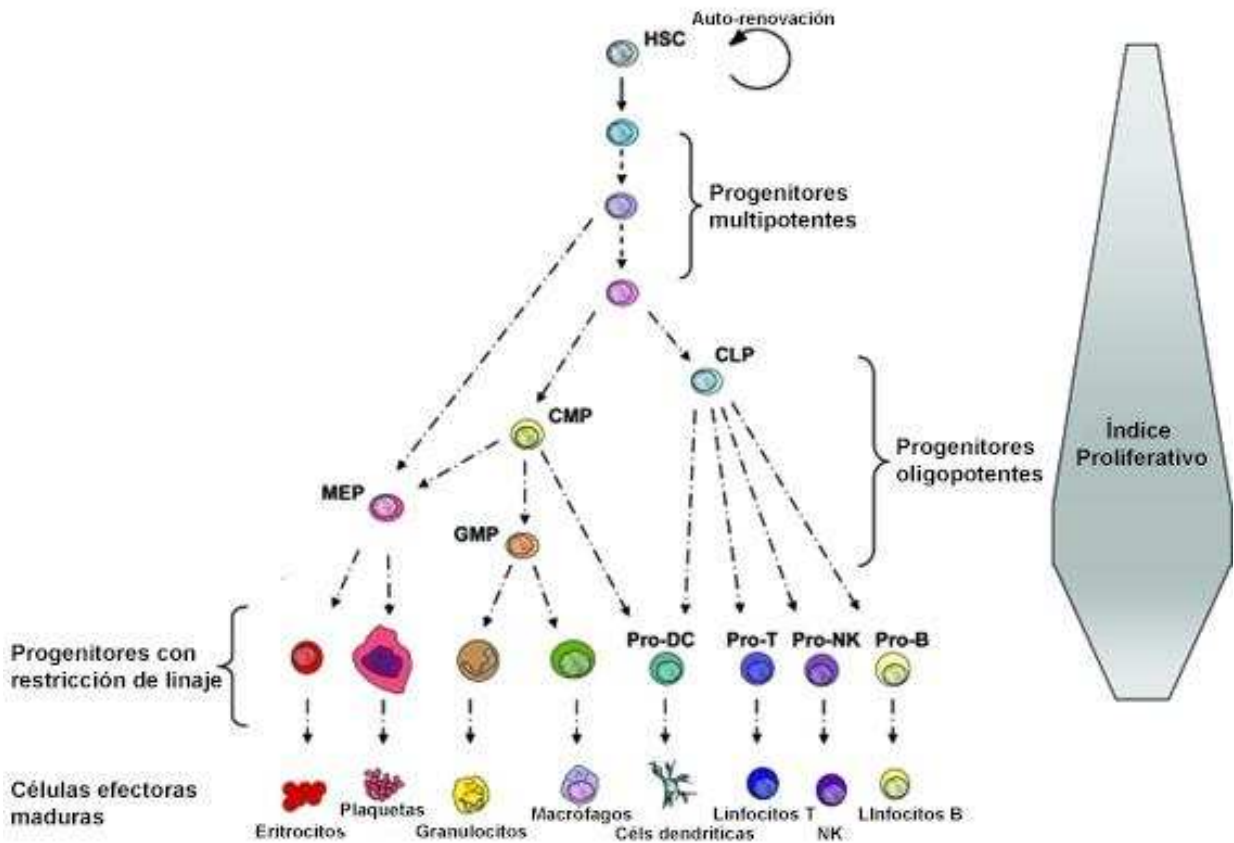


Fig 3. Modelo de la jerarquía de desarrollo hematopoyético. Las HSCs con capacidad de auto-renovación residen en la parte superior de la jerarquía, dando origen a un número de progenitores multipotentes. Éstos dan lugar a progenitores oligopotentes que incluyen los CLP (progenitores comunes linfocitos) y CMP (progenitores comunes mielocitos). Los primeros dan lugar a linfocitos B y T maduros y células *Natural Killer* (NK), mientras que los últimos dan lugar a los progenitores de eritrocitos y megacariocitos (MEP), que se diferencian en megacariocitos/plaquetas y eritrocitos y a los progenitores de granulocitos/macrófagos (GMP), que se diferencian en monocitos/macrófagos y granulocitos. Se ha propuesto que tanto los CMPs como los CLPs dan lugar a las células dendríticas. El desarrollo de los progenitores oligopotentes a células sanguíneas maduras procede a través de un número de progenitores intermedios (no mostrados, se indican algunos como Pro-DC, Pro-T, Pro-B, Pro-NK). El pasaje de HSCs a progenitores multipotentes, oligopotentes y linaje-específicos está generalmente asociado a un incremento en el índice proliferativo aunque esta tendencia no es absoluta (figura modificada de Bryder y col., 2006 [22]).

Debido a que el tiempo de vida de la mayoría de las células efectoras es muy corto, la producción de células maduras de la sangre es un proceso continuo. Y esta elevada tasa de recambio necesita profundos mecanismos de control homeostático, cuyo nivel primario reside en las HSCs [16].

La progenie intermedia está constituida por progenitores multipotentes que retienen potencial de linaje completo pero que tienen una capacidad limitada de auto-renovación. El potencial terapéutico de estos progenitores multipotentes es muy alto, debido a que son significativamente más abundantes que las HSCs [16].

Los progenitores multipotentes dan origen a los oligopotentes, los que poseen un potencial de desarrollo más restringido y son un punto de ramificación en la jerarquía hematopoyética. Éstos son: el progenitor común linfoide (CLP), que origina a las células efectoras linfoides maduras incluidos los linfocitos B, T, las células dendríticas y NK, pero sin potencial para formar células mieloides; y, por otro lado, el subconjunto de progenitores mieloides capaz de dar origen a las células efectoras mielo-eritroides maduras. Los progenitores mieloides carecen de la capacidad de generar progenie linfoide [16] y dan lugar a leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos (que posteriormente dan lugar a los macrófagos), mastocitos, megacariocitos (que originan las plaquetas) y eritroblastos (a partir de los cuales se generan los eritrocitos) [7].

Estos procesos de diferenciación son irreversibles en condiciones fisiológicas normales de estado estacionario y se encuentran ajustados para satisfacer las demandas homeostáticas de un determinado tipo celular efector. Por ejemplo, los progenitores de granulocitos y macrófagos (que tienen un elevado recambio), tienen un alto índice proliferativo, mientras que los CLP tienen menor índice de proliferación, presumiblemente debido a que los linfocitos B y T son capaces ellos mismos de proliferar durante la maduración [16].

Este esquema de diferenciación jerárquica también tiene el efecto de poner muy poca presión de proliferación en las propias HSCs, las cuales entran en ciclo celular muy raramente y se encuentran principalmente en la fase G_0 del mismo. Esta presión de proliferación mínima en las HSCs tiene el beneficio de no exponerlas a los peligros potencialmente mutagénicos de la replicación del ADN y la división celular. Esto contribuiría a la integridad y longevidad requerida de estas células. Adicionalmente, debido a que G_0 es una fase relativamente inactiva a nivel metabólico, se ha sugerido que así también se expondrían a menores niveles de productos secundarios metabólicos dañinos y especies reactivas de oxígeno [16].

Un modo de evaluar la potencialidad celular implica detectar *in vitro* colonias eritroides, megacariocíticas y multilineaje (Figura 4) mediante el ensayo de formación de colonias (CFU, por sus siglas en inglés). En estos ensayos se pone en evidencia que las células clonogénicas iniciales representan etapas intermedias separadas de la diferenciación hematopoyética, debido a que los requerimientos para el crecimiento y las propiedades biológicas son diferentes para cada una de ellas [23].

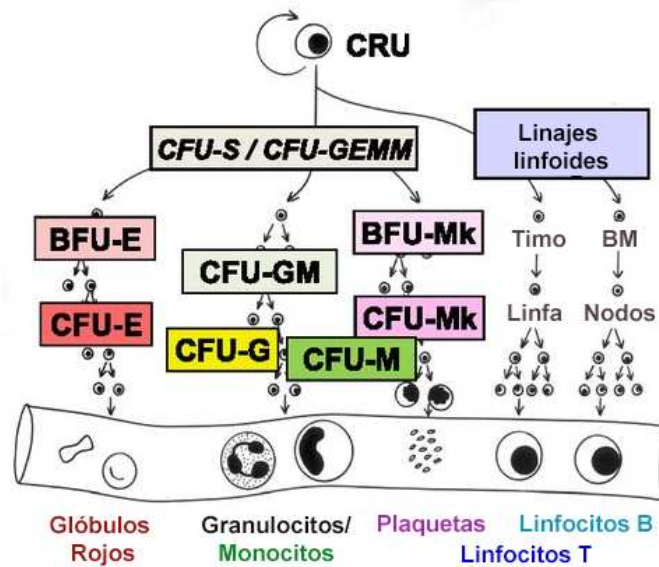


Fig. 4. Modelos jerárquicos de auto-renovación y diferenciación. Intermediarios que se ponen en evidencia en ensayos clonales. Gráfico donde se indica de manera detallada la compartimentalización de subconjuntos de progenitores intermedios restringidos a un linaje, basado en su comportamiento en ensayos de colonias *in vitro* de corto plazo y propiedades que permiten su aislamiento. El ensayo de Unidades Competitivas de Repoblación (CRU) detecta células hematopoyéticas transplantables con capacidad para generar todos los linajes de células sanguíneas. Los estadios intermedios son CFU-S/CFU-GEMM (Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos y Megacariocitos o Unidades formadoras de colonias de bazo, ya que fueron aisladas por primera vez de bazo de ratón), BFU-E (Unidad Formadora de Brotes- Eritroides), CFU-E (Unidad Formadora de Colonias- Eritroides), CFU-GM (Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos y Monocitos), CFU-G (Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos), CFU-M (Unidad Formadora de Colonias de Monocitos), BFU-Mk (Unidad Formadora de Brotes de Megacariocitos), CFU-Mk (Unidad Formadora de Colonias de Megacariocitos), (figura modificada de Eaves, 2015 [23]).

2.1.4. Heterogeneidad dentro de la población de HSCs

A pesar de que es conveniente pensar a las HSCs como una población simple y homogénea, con el comportamiento y potencialidad descritos de manera general en el apartado anterior, existe evidencia reciente que indica que no todas las HSCs son iguales, sino que difieren en sus características físicas así como en el estado del ciclo celular y el fenotipo de sus marcadores de superficie y que además responden a diferentes señales extrínsecas y producen distintos linajes luego de su trasplante. Así, los trasplantes clonales de HSCs y una separación celular más refinada han identificado subtipos de HSCs con diferentes propiedades funcionales, incluyendo diferencias en las cinéticas de repoblación, el estado del ciclo celular, las capacidades de auto-renovación y el resultado de la diferenciación multilínaje. Sin embargo, aún no está claro si estos subtipos de HSCs son programados intrínsecamente durante el desarrollo o si las HSCs inicialmente son idénticas y luego esta heterogeneidad es determinada por factores

extrínsecos presentes durante la migración y colonización de las HSCs en diferentes tejidos y nichos [24].

Así, cuando una HSC es transplantada en ratones receptores adultos irradiados/mielodeficientes, su función principal es la producción de células hematopoyéticas maduras (células mieloides, eritroides, plaquetas/megacariocitos y células linfoides). La medición de la producción de los linajes de las células hematopoyéticas maduras en sangre periférica luego de 4-6 meses, después de trasplantes clonales reveló que las HSCs presentan varios subtipos. Pueden ser clasificadas como “mielo-sesgadas” (también llamadas “linfo-deficientes”), “linfo-sesgadas” (también llamadas “mielo-deficientes”) y linfo-mielo balanceadas, de acuerdo con la medición de los linajes predominantes en la producción total de las HSCs derivadas del donante o según su producción relativa a la población celular mieloide más la linfoide (tanto del donante como del receptor). El último subgrupo predomina en la médula ósea adulta de ratones jóvenes, mientras que en los ratones más viejos predomina una representación mielo-sesgada [24,25].

Otros las han clasificado en HSCs con capacidad de repoblación de largo plazo (LT), plazo intermedio (IT) y corto plazo (ST), de acuerdo con su cinética de reconstitución a lo largo de un periodo de 24 semanas luego del trasplante clonal de HSC en receptores primarios y 20 semanas en receptores secundarios [26]. En estas pruebas, si bien todas las HSCs tuvieron capacidad de repoblación multilinaje, los grados de quimerismo del donante variaron en el linaje mieloide comparado con el linaje linfoide. Las LT-HSCs exhibieron mayor grado de quimerismo de donante en los 5 linajes evaluados, los cuales alcanzaron un umbral a las 4 semanas post-trasplante y mantuvieron ese límite a las 24 semanas en el receptor primario y también luego del trasplante secundario. Las IT-HSCs evidenciaron niveles más bajos de quimerismo en el mismo periodo de tiempo pero comenzaron a perder producción mieloide y eritroide luego del trasplante secundario. Las ST-HSCs no proveyeron un nivel persistente de quimerismo en ninguno de los linajes en el receptor primario a lo largo de las 24 semanas, y los trasplantes secundarios mostraron una producción predominantemente linfoide [24].

La relación entre el sistema de clasificación LT/IT/ST y otras clasificaciones en subtipos de HSCs implica que la mayoría de las LT-HSCs de la médula ósea son mielo-sesgadas, la mayoría de las ST-HSCs son linfo-sesgadas y el subtipo IT-HSC contiene una población mixta de HSCs (balanceada y linaje-sesgada) [24,27].

2.2. El nicho hematopoyético

Los nichos de HSPCs están presentes en diversos tejidos a lo largo del desarrollo, comenzando en la región aorta-gónadas-mesonefros y el saco vitelino, seguido por la placenta, el hígado fetal, el bazo y la médula ósea. En el periodo post-natal, la médula ósea es el sitio primario de mantenimiento de las HSPCs y de la hematopoyesis, pero en respuesta a estrés hematopoyético el nicho puede cambiar a sitios extra-medulares [10].

El sistema circulatorio adulto depende de las células madre que residen dentro de un nicho específico en la médula ósea, en el cual existe una comunicación ajustada entre los nichos endosteal y vascular (arteriolar y sinusoidal), para la constante generación de los diferentes tipos de células de la sangre requeridos a lo largo de la vida [28]. Se cree que las HSCs profundamente quiescentes se localizan alrededor de las arteriolas y más cerca del endostio (en ratones), mientras que las HSCs activadas, más abundantes que las inactivas, residirían en la vecindad de los sinusoides [29].

En la hematopoyesis, se han establecido cuatro actores celulares candidatos: los osteoblastos, las células endoteliales sinusoidales, los adipocitos y las células estromales mesenquimales (un tipo de célula madre presente en la médula que es capaz de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos) [1,30].

El endostio, la región de interfaz entre la médula ósea y el hueso, es infiltrado con células osteoblásticas que secretan numerosas citoquinas, las cuales se cree que dirigen el desarrollo, mantenimiento y comportamiento de las HSPCs a través del *nicho endosteal*. Por ejemplo, se piensa que la trombopoietina (TPO) y la angiopoyetina aumentan la quiescencia de las HSPCs. Los osteoblastos también expresan ligandos unidos a membrana como *Jagged*, N-cadherina y quemoquinas, como SDF-1. Estas moléculas de señalización conducen la auto-renovación de las células madre y la mielopoyesis. SDF-1 regula las propiedades de migración y *homing* de las HSPCs. Adicionalmente, incluso altas concentraciones iónicas endosteales pueden regular el comportamiento de estas células: los niveles elevados de calcio promueven la migración superficial [1]. Sin embargo, es importante re-enfocar la atención en el endostio como región regulatoria y no en los osteoblastos mismos [10]. Así, los progenitores mesenquimales capaces de formar hueso también pueden promover la formación y mantenimiento de los nichos de las HSPCs (por ejemplo reclutando vasculatura a la médula ósea), aunque no tengan un efecto directo. Además, el recambio óseo resulta en concentraciones locales de calcio iónico altas, y el receptor capaz de monitorizar el calcio promueve el injerto de HSPCs [10].

El *nicho vascular* es otro componente clave del ambiente regulatorio. Las células endoteliales expresan factores cruciales como gp130, IL- β y CD130 que promueven la

hematopoyesis. También se ha visto que la localización de las HSPCs en la médula ósea es determinada por el nicho vascular. Las células reticulares CAR (*CXCL-12-abundant Reticular cells*) próximas al endotelio sinusoidal juegan un rol en la localización y migración de las HSPCs, específicamente en la atracción de éstas a través de la secreción de SDF-1 [1]. La proliferación de las HSPCs también se encuentra regulada por otros factores secretados por el linaje celular CAR, como CXCL12 [1], que además es requerida para el mantenimiento y retención de las HSPCs en la médula ósea [10]. También *Stem Cell Factor* (SCF) tiene efectos pro-proliferativos y es secretado por células CAR de esta región [1], células endoteliales y osteoblastos [29]. Particularmente, la forma unida a membrana de SCF es necesaria para el mantenimiento de las HSPCs [10]. Por otro lado, la activación de la señalización de TGF β 1 en megacariocitos de la médula resulta en la quiescencia de las HSCs [29].

Además, independientemente del nicho vascular o endosteal, otras moléculas bioactivas pequeñas, como los eicosanoides y un ambiente hipóxico afectan directamente el comportamiento de las HSPCs. La hipoxia, cuando el oxígeno cae por debajo de ciertos niveles, incrementa la hematopoyesis [1]. Algunos de los elementos que participan en la constitución del nicho hematopoyético se muestran en la Figura 5.

Por otro lado, la conversión adiposa de la médula ósea (esto es, la conversión de la médula “roja” en médula “amarilla”) puede ser vista como un cambio fisiológico en el nicho que afecta la fisiología de las HSPCs en regiones definidas del esqueleto. Esto ocurre cuando regiones como los huesos cortos de las manos y los pies y las epífisis y apófisis de los huesos largos sufren conversión adiposa tempranamente en la vida post-natal. El agotamiento de la hematopoyesis dentro de la médula amarilla implicaría que las HSPCs sean retenidas en un estado quiescente a la vez que la función proliferativa de los progenitores corriente abajo es inhibida, o que las HSPCs mismas sean inhibidas o reducidas. Este proceso transcurre de modo que los adipocitos que reemplazan masivamente a las células reticulares comprimen las paredes sinusoidales. Así, los sinusoides individuales colapsarían y serían excluidos del flujo sanguíneo, pero retendrían una pared endotelial completa intacta. Se da entonces un proceso de corte microvascular reversible. Esta reversión se observa en respuesta a anemia hemolítica o sangrado [30].

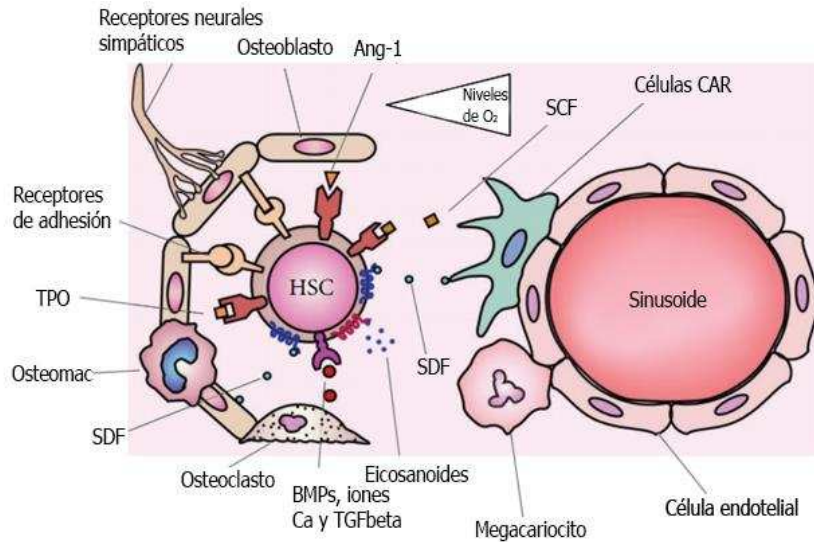


Fig. 5. Relación entre los nichos vascular y endosteal en el control de las células madre hematopoyéticas. Células de los nichos endosteal y vascular se comunican y el balance de moléculas de señalización entre los dos nichos, junto con la señalización derivada de los niveles de oxígeno y las moléculas pequeñas regulan el comportamiento de las HSPCs. En esta figura se indican algunas de las moléculas involucradas: Ang-1 indica Angiopoyetina-1, SCF indica *Stem Cell Factor*, SDF indica *Stromal cell-Derived Factor-1*, BMPs indica *Bone Morphogenetic Proteins*, TGFbeta indica *Transforming Growth Factor Beta*, Osteomacs son macrófagos de tejido óseo y TPO indica trombopoyetina (figura modificada de Lilly y col., 2011 [31]).

2.3. Fuentes

Las HSPCs han sido ampliamente utilizadas durante más de 40 años para tratar enfermedades hematológicas. Pueden ser aisladas a partir de varias fuentes:

- Médula ósea: *in vivo*, en adultos, la médula ósea, que consiste en unas $500-1.000 \times 10^9$ células a una densidad de aproximadamente 10^9 células por mililitro, es responsable predominante de la producción de células sanguíneas: produce 0,1 unidades de glóbulos rojos (GRs) (2×10^{12} GRs/unidad), 2,5 unidades de plaquetas ($5,5 \times 10^{10}$ plaquetas/unidad) y 10 dosis de neutrófilos (2×10^{10} neutrófilos/dosis) cada día. Bajo estrés, esta productividad puede ser incrementada hasta 10 veces [21]. Es la fuente que se ha empleado históricamente como fuente de HSPCs para injertos, pero presenta las desventajas de que las HSPCs tienen un potencial de expansión limitado y su recolección es compleja [32].

- Sangre periférica (SP): la aféresis de sangre periférica no movilizada permite colectar un número promedio de aproximadamente 13×10^6 HSPCs (según los datos comunicados), mientras que es posible obtener hasta 400×10^6 células CD34⁺ a partir de sangre periférica luego de la movilización con G-CSF [32].

La recolección de HSPCs a partir de médula ósea o luego de la movilización está asociada con posible morbilidad del donante y altos costos, lo que restringe estas

prácticas a usos médicos especializados (por ejemplo, al trasplante de células madre luego de terapias anti-cáncer) [21].

- Sangre de cordón umbilical (SCU): si bien el contenido celular de la SCU es limitado, esta fuente es muy rica en HSPCs y tiene una mayor frecuencia de células progenitoras en comparación con la sangre periférica o la médula ósea [33]. Alrededor de $3-4 \times 10^6$ células CD34⁺ pueden ser aisladas a partir de una unidad [32]. Estas células exhiben alta capacidad replicativa comparada con las HSPCs derivadas de organismos adultos [33,34], además de poseer menores restricciones con respecto al pareo de HLA (antígeno leucocitario humano), debido a que una incompatibilidad en uno o dos *loci* es bien tolerada sin un incremento significativo en la posibilidad de padecer enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) o supervivencia afectada.

La sangre de cordón umbilical es recolectada luego del alumbramiento del niño y de la placenta, y por lo tanto no implica riesgos para él o para la madre [35]. Así, se ha establecido una red internacional de bancos de sangre que contiene más de un millón de unidades de sangre de cordón reservadas para injertos, lo que demuestra que su recolección está bien organizada y su disponibilidad está asegurada [32]. En este proceso de recolección las unidades son tipificadas y evaluadas para enfermedades infecciosas previo a su criopreservación, lo que hace que se encuentren rápidamente disponibles [35].

2.4. Aplicaciones

2.4.1. Trasplante

Como fue mencionado, las propiedades de las células CD34⁺ (migración, recolección y *homing*) permiten la utilización del trasplante de médula ósea en el tratamiento de enfermedades hematológicas. Asimismo, las HSPCs derivadas de SCU son utilizadas en el tratamiento de este tipo de enfermedades, pero su empleo se ve limitado a la población pediátrica debido al bajo número de células CD34⁺ que contiene cada unidad [18]. La expansión de estas células fuera del organismo o el trasplante de dos unidades de SCU se evalúan como alternativa para mejorar los resultados del trasplante en adultos y niños mayores [36].

El trasplante de HSPCs es un procedimiento establecido para numerosos desórdenes congénitos y adquiridos del sistema hematopoyético, incluyendo desórdenes del sistema inmune y para reemplazo enzimático en desórdenes metabólicos [37]. Inicialmente fue desarrollado como terapia de rescate para pacientes con cáncer, luego de la exposición a altas dosis de quimioterapia y radiación, así como para la corrección de deficiencias severas del sistema hematopoyético. Actualmente, es el único uso clínico probado de las células madre para:

- Rescate de pacientes con cáncer de los efectos tóxicos de altas dosis de quimioterapia y/o terapia de radiación (trasplantes autólogos o alogénicos).
- Corrección de desórdenes sanguíneos severos congénitos o adquiridos mediante el reemplazo del sistema hematopoyético del paciente por el del donante (trasplantes alogénicos).
- Incremento del control de una enfermedad maligna mediante los mecanismos efectores aloinmunes de la reacción del injerto versus el huésped (trasplantes alogénicos).
- Recomposición del sistema inmune para suprimir la autoinmunidad (trasplantes autólogos o alogénicos) [36].

2.4.2. Terapia génica

Las HSPCs han sido por mucho tiempo blancos preferidos para la terapia génica *ex vivo* ya que la modificación genética de estas células multipotentes con capacidad de auto-renovación aseguraría un suministro continuo de progenie con las correcciones genéticas requeridas. Estas células tienen el potencial de tratar condiciones que se manifiestan cuando los linajes hematopoyéticos maduros fallan en desarrollarse o funcionar correctamente. La corrección genética debe ser introducida de manera estable en la cromatina celular, ya sea por inserción del transgen mediada por vectores o por edición genética *in situ*. La terapia mediada por vectores de primeras generaciones basados en gama-retrovirus presenta riesgos y limitaciones [38].

El desarrollo de vectores con eficacia y seguridad mejoradas en modelos preclínicos, como los vectores lentivirales, ha renovado el interés en este enfoque. Las terapias génicas con HSPCs que incorporan estos nuevos vectores han sido probadas en enfermedades hereditarias severas del sistema inmune (Síndrome de Wiskott-Aldrich e inmunodeficiencia combinada severa asociada al cromosoma X) y de la sangre (β -talasemia), y en enfermedades neurodegenerativas (adrenoleucodistrofia y leucodistrofia metacromática) [38].

El trasplante alogénico de HSPCs implica un riesgo considerable de morbilidad y muerte, particularmente cuando es efectuado entre individuos con diferencias entre sus HLA. Y aún en los casos en los que un donante apropiado pueda ser encontrado, el riesgo de morbilidad continúa siendo sustancial. La terapia génica con HSPCs puede hacer frente a esta necesidad médica no resuelta, especialmente cuando no hay disponibilidad de donantes compatibles [38].

2.4.3. Producción *ex vivo* de células sanguíneas

Por décadas, los suministros de componentes sanguíneos transfundibles han fallado en mantener el balance con una demanda creciente. Esto ha impulsado

esfuerzos para desarrollar sustitutos sanguíneos seguros y efectivos que pueden ser producidos desde fuentes no inmunorreactivas [39].

2.4.3.1. Plaquetas

La transfusión de plaquetas se emplea para proteger a los pacientes, incluso a aquellos tratados con quimioterapia o trasplante de células madre, de trombocitopenia y de los riesgos asociados. Desafortunadamente, uno de cada tres pacientes se hace refractario a la terapia, por lo que requiere transfusiones repetidas de plaquetas. Durante las últimas décadas, un incremento mantenido de la demanda de plaquetas en combinación con su vida útil, han representado un desafío constante para los centros de terapia. Varios estudios han demostrado que las HSPCs de médula ósea, SP y SCU son capaces de producir megacariocitos y plaquetas funcionales *ex vivo* [40,41]. Asimismo, se han desarrollado métodos para su producción a partir de células madre embrionarias, lo cual constituye un paso importante en la generación de suministros de plaquetas a gran escala y sin dependencia de donantes, para su uso clínico [39].

2.4.3.2. Neutrófilos

En contraste con los GRs y las plaquetas, la recolección de rutina de neutrófilos no es realizada comúnmente. A pesar de su potencial uso como soporte para pacientes neutropénicos, la logística complicada de identificación y análisis de donantes, la necesidad de movilizar HSPCs en estos donantes con citoquinas hematopoyéticas y las dificultades para la obtención de números suficientes de neutrófilos aún luego de la movilización han limitado la práctica de la transfusión de neutrófilos a sólo unos pocos especialistas en el mundo. Y así, la neutropenia continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad asociadas a quimioterapia. Si bien existen trabajos que reportan su producción *in vitro* a partir de HSPCs de SP, de SCU y de ESCs, los elevados números de células requeridos generan la necesidad de contar con un bioproceso escalable para poder aspirar a un uso clínico de rutina [21].

2.4.3.3. Glóbulos rojos (GRs) y otras células eritroides

La transfusión de GRs es comúnmente usada en cirugías, traumas y terapias para enfermedades malignas hematológicas y sólidas, y es uno de los principales tratamientos para las anemias hereditarias [42,43]. Además de las limitaciones comunes de esta práctica (compatibilidad, tiempo de preservación, transmisión de patógenos), algunos pacientes sufren desabastecimientos crónicos debido a los polimorfismos de los antígenos de grupos sanguíneos [44]. Por esta razón, la generación de GRs *in vitro* a partir de HSPCs permitiría obtener un sustituto adecuado [45,46].

Numerosos trabajos de investigación han demostrado la factibilidad de la generación *ex vivo* de células eritroides, particularmente GRs a partir de las HSPCs. Este enfoque apunta a generar un suministro seguro y apropiado de GRs en casos de fenotipos raros, hemoglobinopatías y pacientes poli-transfundidos con poli-inmunización [47]. La aloinmunización implica una reacción inmune compleja que resulta en el desarrollo de anticuerpos en contra de los antígenos presentes en los GRs, cuyo riesgo de ocurrencia es mayor en pacientes transfundidos de manera crónica y en pacientes con tipos sanguíneos raros. Puesto que las transfusiones se realizan rutinariamente de acuerdo a los tipos AB0 y Rh-D, los pacientes pueden desarrollar anticuerpos en contra de otros antígenos Rh y grupos sanguíneos menores [48,49]. Además, los anticuerpos anti-GRs se pueden desarrollar durante el embarazo y luego de trasplantes [48,49]. Estos anticuerpos poseen consecuencias graves (hemólisis, falla orgánica e incluso muerte) si el paciente es transfundido con GRs que expresan el antígeno afín. Las transfusiones incompatibles pueden ocurrir cuando los anticuerpos son indetectables. Debido a este riesgo bajo pero consistente, los pacientes aloinmunizados son transfundidos con sangre de donantes identificados a través de programas de reclutamiento dirigido y, a pesar de estos esfuerzos, la sangre para pacientes aloinmunizados frecuentemente no está disponible.

Si bien este principio de producción *ex vivo* ha demostrado ser clínicamente aplicable mediante la administración en un humano de 10^{10} GRs cultivados [50] y se han logrado progresos sustanciales en los procesos biotecnológicos dedicados a la producción de GRs [33,51,52], la rentabilidad continúa siendo un gran desafío para lograr un impacto real en el cuidado médico. Esto es debido a que se requieren más de $2,5 \times 10^{12}$ GRs por transfusión [53]. Es necesario considerar que para la producción de GRs el costo del medio completo es muy elevado, en el cual los factores de crecimiento representan más del 90% del precio, y sólo la eritropoyetina (hEPO) representa un 33% del costo total del medio [21,47]. Por esta razón, los bajos rendimientos de células completamente maduras obtenidos hasta ahora hacen que el proceso sea costoso e ineficiente [47,53,54]. Adicionalmente, la administración *in vivo* de un número elevado de células implica un mayor desafío inmunológico que la inyección de pequeños volúmenes de sangre y es necesario más conocimiento respecto de la transmisión de agentes adventicios y de los riesgos de neoplasias [55].

Mientras tanto, existen otras tres aplicaciones más realistas que pueden ser logradas con los sistemas de cultivo que actualmente se encuentran disponibles: GRs reactivos para la identificación de anticuerpos, el descubrimiento de drogas y la entrega y liberación de drogas en terapias personalizadas [55].

- El uso de GRs reactivos para la identificación de anticuerpos en *kits*/dispositivos diagnósticos requiere bajos números de estas células derivadas de donantes con fenotipos/genotipos de grupos sanguíneos comunes y raros, para así identificar pares de transfusión adecuados e individuos aloinmunizados (tanto pacientes como donantes) y para determinar la especificidad de los anticuerpos detectados [48,49,53,55]. Estos donantes son seleccionados cuidadosamente (y a menudo pagados), pero la extracción de sangre de donantes poco comunes frecuentemente está restringida (por falta de disponibilidad o suspensión temporal o permanente). Aproximadamente sólo 2×10^8 GRs serían suficientes para realizar 100 de estos ensayos. Así, los GRs pueden ser generados *in vitro* a partir de las MNCs que usualmente son descartadas durante los procesos de leucorreducción [48,55].

- Por otro lado, la utilización de células eritroides primarias para el descubrimiento de drogas y su evaluación es apropiado para drogas que tienen como blanco enfermedades con respuestas clínicas variables, que dependen de la edad, el sexo y de polimorfismos genéticos [53]. Por ejemplo, se encuentran bajo consideración ensayos *in vitro* que miden las tasas de proliferación/maduración de eritroblastos para el análisis de inductores de la producción de hemoglobina F en talasemia y anemia de células falciformes [56,57], de terapias celulares anti-malaria (uso de lentivirus para inducir la sobre-expresión de miRNAs para inhibir la proliferación intracelular del parásito) [58,59], de inhibidores de caspasas en la infección por parvovirus B19 [60,61] y de estimuladores de la eritropoyesis para síndromes mielodisplásicos, entre otras aplicaciones [53]. Este tipo de ensayos tiene como objetivo reducir la experimentación animal e incrementar la sensibilidad y robustez de estudios pre-clínicos de toxicología y eficacia.

- Adicionalmente, el potencial de usar GRs como vehículo para la entrega dirigida de drogas ha sido considerada desde hace un tiempo. Las mejoras recientes en tecnología retroviral han abierto la posibilidad de usar GRs derivados de HSPCs genéticamente modificadas como vehículo para proteínas terapéuticas recombinantes. Se ha establecido una prueba de principio para el uso de células eritroides para la entrega sistémica de drogas en un modelo murino de hemofilia, un desorden congénito de la coagulación recesivo asociada al cromosoma X que se da debido a una deficiencia en el factor VIII o IX. En este caso, Chang y col. han demostrado que el factor IX (hFIX) fue producido específicamente por células eritroides modificadas [55,62]. Para ello redirigieron una fracción de la elevada capacidad de síntesis de globina por parte de las células eritroides en maduración a la producción de proteínas secretadas (en este caso, el hFIX). Para ello construyeron vectores lentivirales auto-inactivantes que codifican el

hFIX bajo el control transcripcional del promotor humano de β -globina, *enhancers* y *locus control region*, logrando una restricción de la expresión del transgen a células eritroides tardías. Y así demostraron la factibilidad de dirigir la secreción a largo plazo del hFIX a niveles terapéuticos a partir de células eritroides derivadas de HSCs [62]. Esta clase de enfoques sería particularmente útil cuando se trata de la administración terapéutica de proteínas, especialmente aquellas con vida media corta, como es el caso de los factores de coagulación y sería concebible que la transfusión de GRs expandidos *in vitro* sea una opción factible para alcanzar niveles terapéuticos de factor IX también en pacientes con hemofilia [48]. Asimismo, la entrega de proteínas sería aplicable a un número de desórdenes, que incluyen deficiencias en factores de coagulación, pero también de varias enzimas (en enfermedades de almacenamiento lisosomal, adenosina deaminasa, apolipoproteína E) y de hormonas (hormona paratiroide, eritropoyetina), así como de factores anti-angiogénicos, anticuerpos humanizados y otros agentes anti-tumorales.

Así, se prevé que el progreso en estas aplicaciones intermedias facilite alcanzar el objetivo último de los GRs expandidos *ex vivo*, su empleo en transfusión [48]. Lo explicitado se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Productos alternativos de células eritroides humanas generadas *ex vivo* (tabla modificada de Zeuner y col., 2012 [48]).

PRODUCTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<i>HSPCs generadas en cultivos en fase de expansión de progenitores, como terapia de soporte luego del trasplante de HSCs</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reduce el tiempo de recuperación de GRs luego del trasplante de HSCs. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Criterio de seguridad a ser definido
<i>Eritroblastos generados en cultivos en fase de expansión de eritroblastos, como productos alternativos para transfusiones crónicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dosis terapéuticas pueden ser producidas con la tecnología actual. ▪ Criterio de seguridad similar a aquellos usados para los productos basados en GRs ▪ Establecimiento de bio-repositorios para uso en emergencias 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Comportamiento <i>in vivo</i> aún no definido ▪ Posible genotoxicidad
<i>GRs producidos en cultivos en fase de maduración terminal como:</i> <ul style="list-style-type: none"> ▪ GRs reactivos ▪ Entrega sistémica de drogas ▪ Productos alternativos para transfusiones crónicas y agudas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Criterios de seguridad establecidos similares a aquellos para las unidades de sangre incluidos: ▪ Caracterización funcional <i>in vitro</i> (expresión de antígenos de grupo sanguíneo, deformabilidad, contenido de hemoglobina y curvas de disociación de oxígeno) ▪ Caracterización funcional <i>in vivo</i> en modelos animales mejorados 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Las dosis terapéuticas no pueden ser producidas con la tecnología actual

Adicionalmente, la posibilidad de llevar adelante estas aplicaciones diversas de la producción de células eritroides a partir de HSPCs nos han impulsado a desarrollar estrategias para reducir el uso de factores de crecimiento costosos en el proceso de cultivo y a contribuir a una mejor comprensión y desarrollo de los procesos de producción de células eritroides *in vitro*.

3. DIFERENCIACIÓN ERITROIDE

3.1. La eritropoyesis *in vivo*

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, resulta importante para el desarrollo de este trabajo de tesis comprender la biología de los GRs, particularmente el proceso por el cual se generan naturalmente. La importancia de conocer esto reside en que los procesos destinados a su producción *in vitro* requerirán, en cierto grado, emular dicho proceso natural.

Así, en los adultos los glóbulos rojos son los productos celulares terminalmente diferenciados de una jerarquía compleja de progenitores hematopoyéticos que progresivamente se hacen más restringidos al linaje eritroide. Durante el proceso de diferenciación los progenitores eritroides se expanden enormemente para satisfacer los requerimientos diarios de eritrocitos [63].

El proceso de eritropoyesis incluye diferentes fases: una primera fase de compromiso/proliferación, en la cual las HSPCs son inducidas por factores extrínsecos (factores de crecimiento) e intrínsecos (factores de transcripción) a expandirse y a activar los programas de diferenciación [64]. En esta fase ocurre una diferenciación en progenitores mieloides y linfoides. Las células progenitoras mieloides son multipotentes y a continuación pueden diferenciarse en progenitores bipotenciales que se restringen a las vías eritroide/megacariocítica y granulocítica/macrofágica [65]. A partir de los primeros, se originan los precursores BFU-E (*Burst Forming Units-Erythroid*) de proliferación lenta, que son los primeros progenitores inmaduros con restricción eritroide y se denominan así porque su progenie temprana es móvil, y en ensayos de formación de colonias dan lugar a colonias con múltiples subunidades de células diferenciadas. Estas colonias grandes contienen hasta varios miles de células hemoglobinizadas y su crecimiento es dependiente de SCF, TPO, interleuquinas 3 y 11 (IL-3 e IL-11) y FLT3-L (por *FMS-like tyrosine kinase 3-ligand*). A partir de los BFU-E se originan los CFU-E (*Colony Forming Units-Erythroid*), los cuales en medios con metilcelulosa se pueden observar como pequeñas colonias de 16-125 células [63]. Este estadio se divide rápidamente y en pocos días se diferencia en estadios posteriores [65]. No es posible reconocer progenitores de tipo BFU-E y CFU-E morfológicamente, sino que su detección

se realiza *ex vivo* mediante ensayos de formación de colonias. La adquisición de receptores para EPO ocurre en el estadio medio-tardío de BFU-E y para el momento en que estas células alcanzan la etapa de CFU-E, poseen el máximo número de receptores de EPO en su superficie. Durante este periodo, las células son completamente dependientes de EPO para su supervivencia [66].

La segunda fase es una etapa de maduración, en la cual la primera célula eritroide morfológicamente reconocible (el pro-eritroblasto) se hace incapaz de proliferar y sufre alteraciones citoplasmáticas y nucleares [64]. Esto ocurre naturalmente en las islas eritroblásticas, las cuales son unidades estructurales en la médula ósea consistentes en un macrófago central rodeado por progenitores eritroides que se encuentran en proceso de diferenciación [63], tal como se indica en la Figura 6. El contacto directo con los macrófagos incrementa la proliferación de los eritroblastos [67]. Los pro-eritroblastos sufren cuatro o cinco divisiones mitóticas y pasan por una serie de estadios de maduración llamados eritroblastos basofílicos, eritroblastos policromáticos y, finalmente, eritroblastos ortocromáticos, punto en el cual las células salen del ciclo celular. Para el momento en el que las células alcanzan el estadio de eritroblasto policromático tardío, son independientes de EPO para su supervivencia [66]. En este proceso, la maduración citoplasmática incluye pérdida de mitocondrias, reducción del número de ribosomas y reorganización de la estructura de microfilamentos, mediado por un programa autofágico, una vía proteolítica dependiente de proteosomas desarrollado por células eucariotas. Adicionalmente se acumula hemoglobina y otras proteínas específicas eritroides. Los cambios nucleares incluyen condensación de los cromosomas y pérdida de las uniones citoplasma-núcleo en preparación para la enucleación, lo que representaría un caso extremo de división asimétrica [64].

Una tercera etapa implica la diferenciación terminal que incluye un cambio en la morfología celular y remoción del núcleo o enucleación para producir GRs maduros [65]. Aquí, el núcleo condensado es aislado del citoplasma por un anillo de membranas citoplasmáticas y se mueve hacia un lado de la célula. Entonces, el eritroblasto ortocromático es particionado en dos estructuras hijas, el reticulocito, que contiene la mayoría del citoplasma, y el pirenocito, que contiene el núcleo condensado revestido en una delgada capa citoplasmática. A esto se le denomina extrusión nuclear o enucleación y es favorecida por interacciones entre los eritroblastos y el macrófago central dentro del nicho eritroide. Los pirenocitos son engullidos y degradados por el macrófago [64,66], ya que comienzan a exponer una señal correspondiente a la apoptosis temprana en su superficie, la fosfatidilserina (el mantenimiento de fosfatidilserina exclusivamente en la membrana interna requiere energía, pero el núcleo contiene ATP en muy bajos niveles) [63]. En el paso final de la eritropoyesis, los

reticulocitos multilobulares maduran en eritrocitos discoides, lo cual está acompañado por pérdida de organelas intracelulares, pérdida de área superficial, disminución del volumen celular y reorganización de la membrana y los componentes del citoesqueleto [68].

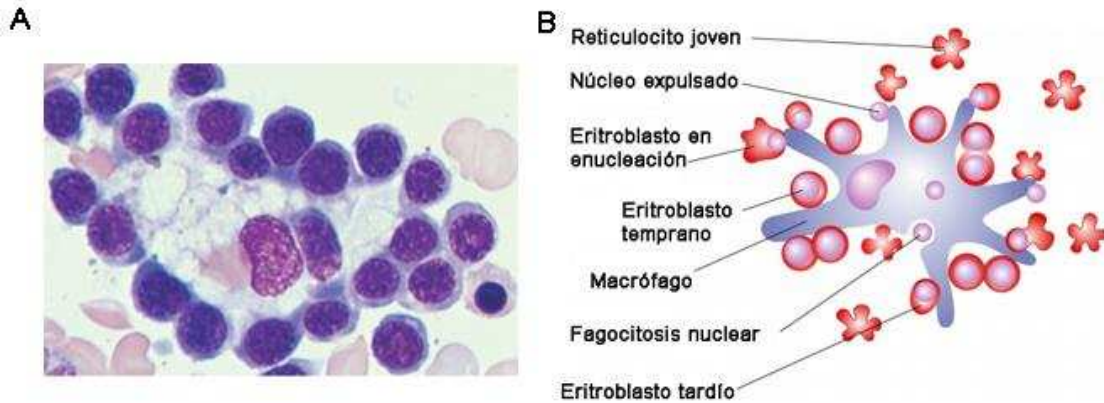


Fig. 6. Las islas eritroblásticas son agregados multi-celulares hallados en la médula ósea para el desarrollo de los glóbulos rojos. A. Isla eritroblástica visualizada en médula ósea teñida por Wright-Giemsa. Se observa el macrófago central rodeado por una cohorte de eritroblastos adjuntos (modificado de Kaushansky y col., 2016 [69]). **B.** Proceso de proliferación y diferenciación dentro del nicho eritroide. Los eritroblastos tempranos son células de mayor tamaño con núcleo localizado centralmente; los eritroblastos más diferenciados son células más pequeñas que contienen núcleo localizado de manera adyacente a la membrana plasmática. Los núcleos expulsados sufren fagocitosis por parte del macrófago central. Los reticulocitos jóvenes multilobulados inicialmente se encuentran unidos a la superficie del macrófago y posteriormente se desunen (modificado de Chasis y Mohandas, 2008. Ilustración por Paulette Dennis [67]).

3.2. Factores de crecimiento involucrados

El linaje celular específico es indicado por señales químicas también conocidas como citoquinas e interleuquinas. Usualmente estas sustancias son glicoproteínas que tienen como blanco estadios celulares específicos [70]. Éstas son producidas por células del microambiente medular, pero también por células inmunes y por órganos por fuera de la médula, particularmente el hígado y el riñón que producen, respectivamente, TPO y EPO [71].

Los principales factores de crecimiento que regulan la eritropoyesis *in vivo* son el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la IL-3, el SCF, las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-4, IL-9, IL-11, el *insulin growth factor* IGF-1 y la EPO [70].

SCF, IL-1, IL-3, IL-6 e IL-11 estimulan a las HSPCs a diferenciar en CFU-GEMM y en progenitores mieloides. Las CFU-GEMM luego se diferencian en CFU específicas para precursores eritroides, de granulocitos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y megacariocitos en presencia de GM-CSF e IL-3 [70].

A partir de aquí, la EPO cumple un rol esencial durante los estadios tardíos de la maduración eritroide. Se trata de una hormona glicoproteica de 30,4 kDa, que es secretada principalmente por las células intersticiales del riñón, las cuales son capaces de sensar el balance entre el oxígeno suministrado por los capilares sanguíneos y el consumo de oxígeno por parte de las células tubulares. En función de este balance ocurre una regulación endócrina riñón-médula ósea por parte de EPO [72,73]. Así, en la médula ósea actúa inicialmente sobre los progenitores eritroides más primitivos que son las BFU-E. Puesto que éstas tienen baja sensibilidad a EPO, requieren de la acción de factores adicionales para su supervivencia y proliferación. Por lo tanto, EPO actúa sinérgicamente con otros factores de crecimiento como SCF, TPO, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9 e IGF-1, para regular la maduración y la proliferación desde el estadio de BFU-E, CFU-E a proeritroblasto, pero ejerce su efecto principalmente sobre las CFU-E induciendo su transformación en proeritroblastos [70].

Cabe aclarar que EPO no determina el desarrollo de BFU-E, no recluta células hacia el linaje eritroide ni especifica el destino celular. En lugar de esto, ejerce un control dinámico sobre la formación de GRs permitiendo el crecimiento, supervivencia y diferenciación de la progenie de los progenitores celulares comprometidos hacia el linaje eritroide [70,74]. El mecanismo primario por el cual la EPO mantiene la eritropoyesis es la prevención de la muerte celular programada o apoptosis [75]. Otros efectos de la unión de EPO a sus receptores (EPOR) en la membrana de los progenitores eritroides son: a) el incremento de la capacidad mitótica a nivel de célula progenitora y b) el inicio y mantenimiento de la maduración a nivel de los precursores mediante un estímulo constante de hemoglobinogénesis [75–78]. Se sabe que la concentración plasmática de EPO es relativamente baja (5-30 mU/ml) y cuando el hematocrito desciende linealmente, se produce un incremento exponencial de este valor [71].

Adicionalmente, SCF retrasa la diferenciación y maduración eritroide, lo que permite la auto-renovación de los progenitores antes de que esto ya no sea posible. C-Kit, el receptor de SCF, se expresa en progenitores CD34⁺ en altos niveles hasta el estadio de CFU-E y luego declina progresivamente hasta desaparecer en eritroblastos poli/ortocromáticos [71].

Así, se ha demostrado que EPO y SCF son absolutamente requeridos para el desarrollo eritroide. Éstos actúan de manera sinérgica para incrementar la eritropoyesis por diversos mecanismos moleculares. SCF hace a las células más sensibles a EPO y, así, el requerimiento de EPO es menor para la supervivencia y proliferación eritroide. Al mismo tiempo, SCF ralentiza la diferenciación eritroide. Mecanísticamente, existe una co-señalización entre c-Kit y EPOR mediante una fosforilación en un dominio citoplasmático de EPOR [71].

Para asegurar una producción constante de GRs se requieren, adicionalmente, varios componentes incluyendo hierro para la síntesis de hemoglobina, ácido fólico y vitamina B12 para la síntesis de ADN. Las hormonas esteroides, a través de sus receptores nucleares, incrementarían la producción de GRs. Similarmente, los glucocorticoides contribuirían a incrementar la producción eritroide durante la eritropoyesis en condición de estrés. También existen evidencias que indican un rol del sistema renina angiotensina en la regulación de la eritropoyesis [71].

Entre las citoquinas que regulan negativamente la eritropoyesis se encuentran: el factor de necrosis tumoral TNF- α , el interferón IFN- γ , el factor de crecimiento tumoral TGF- β 1 y SDF-1 cuando se encuentra en altos niveles [71]. Se sabe que TNF- α inhibe la eritropoyesis mediante clivaje mediado por caspasa del principal factor de transcripción eritroide GATA-1, resultando en apoptosis, o mediante el retardo de la proliferación [67]. Asimismo, TGF- β perturba la eritropoyesis de diversas maneras: inhibiendo la proliferación de eritroblastos por reducción del número de progenitores en ciclo y mediante la aceleración de la diferenciación de progenitores que no se encuentran ciclando; aunque también actúa produciendo reorganización del citoesqueleto de actina, lo cual tendría efecto sobre la estabilidad de la membrana [67].

A partir del conocimiento de los factores involucrados en el proceso *in vivo*, se han desarrollado medios de cultivo para la producción *ex vivo* de células eritroides que, si bien difieren en su composición en cada protocolo, en general contienen SCF, EPO, dexametasona y transferrina, usualmente suplementados con insulina o IGF-1 [63]. En la Tabla 2 se resumen los factores involucrados en el proceso de eritropoyesis *ex vivo* y sus funciones. La variedad de factores descritos en estos procesos indica que el efecto de las citoquinas es dependiente de los diferentes estadios celulares y que, por lo tanto, es necesario definir el conjunto de citoquinas más apropiado para realizar estos cultivos [65]. A esta necesidad responde uno de los objetivos planteados en este trabajo de tesis.

Es necesario destacar que se encuentra bien documentada la capacidad que tienen los precursores eritroides de completar su diferenciación terminal *in vitro* en presencia de EPO, pero sin macrófagos o contactos con la matriz extracelular, lo que demuestra que existe un programa de diferenciación autónomo en los progenitores comprometidos. Sin embargo, el grado de proliferación y diferenciación que ocurre bajo estas condiciones, así como la eficiencia de enucleación, de ningún modo se aproxima a lo que ha sido documentado *in vivo*. Así, este programa autónomo en conjunción con las interacciones de adhesión, los mecanismos de intercomunicación celular, y las vías de retroalimentación regulatoria que tienen lugar en los nichos eritroides son necesarias

para generar 2×10^6 reticulocitos/segundo en un estado estacionario, con capacidad de incrementar esta producción unas 15 a 20 veces bajo condiciones de estrés [67].

Tabla 2. Factores que regulan la eritropoyesis *ex vivo* (tabla modificada de Singh y col., 2016 [65])

Factores	Rol/Efecto en la eritropoyesis <i>ex vivo</i>	Receptor
<i>Factores de crecimiento/citoquinas de origen humano o animal</i>		
<i>EPO</i>	Diferenciación y proliferación de células eritroides	EPOR
<i>IL-3</i>	Diferenciación y proliferación de células progenitoras mieloides	CD123/IL3RA, CD131/IL3RB
<i>GM-CSF</i>	Factor de crecimiento de glóbulos blancos	CD116
<i>G-CSF</i>	Inductor de la movilización de HSCs desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo	CD114
<i>IGF-1</i>	Estimula las CFU-E en ratón	Receptor de IGF-1
<i>SCF</i>	Regula las HSCs en médula ósea	CD117
<i>Moléculas sintéticas</i>		
<i>Dex</i>	Anti-inflamación	
<i>Poloxamero 88</i>	Induce la enucleación de GRs	
<i>Lípidos ricos en colesterol</i>	Induce las tasas de proliferación	
<i>Hidrocortisona</i>	Incrementa la proliferación de células progenitoras eritroides	

3.3. Otras variaciones fenotípicas ocurridas durante la maduración eritroide

Paralelamente con la maduración de HSPCs y su compromiso hacia el linaje eritroide, ocurren en los precursores cambios en sus marcadores de superficie. Las HSCs inicialmente se diferencian en un progenitor multipotente (MPP) y luego un progenitor común mielode (CMP) caracterizado como $CD34^+CD38^+CD36^+$. Una vez que ocurre la restricción hacia el estadio de progenitor eritroide/megacariocítico (MEP), las células se hacen $CD34^+CD38^{low/+}CD36^-$ [79]. En una publicación reciente se analizó el perfil transcripcional de células únicas y se demostró que la fracción celular clasificada como MEP, de acuerdo a su perfil inmunofenotípico, no es una población celular homogénea; por el contrario está compuesta por al menos tres sub-fracciones con expresión génica y capacidad funcional diferenciales: los pre-MEPs (enriquecida en progenitores bipotentes capaces de diferenciación eritroide y megacariocítica y de diferenciación mielode residual) y las fracciones E-MEP y MK-MEP, con capacidades sesgadas hacia la diferenciación eritroide y megacariocítica, respectivamente. Los pre-MEPs presentan fenotipo $CD71^-CD41^-CD34^{high}CD38^{low}CD123^{high}CD45RA^{high}$,

mientras que los E-MEPs presentan fenotipo CD71⁺CD41⁻ y el 90% de las colonias que de ellos derivan son eritroides BFU-E/CFU-E [80].

Continuando en la jerarquía de diferenciación eritroide, la expresión de CD34 es baja en proeritroblastos; del mismo modo que CD38 decrece con la maduración. A la vez, los proeritroblastos expresan CD71 y CD235a (glicoforina A), los cuales se encuentran ausentes en MEPs [81]. El receptor de transferrina CD71 media la incorporación de complejos hierro-transferrina y se encuentra altamente expresado en la superficie de células del linaje eritroide [82]. Sin embargo, los eritroblastos inmaduros presentan fenotipo CD235a^{neg/low}, mientras que los maduros tienen fenotipo CD235a^{high} [55]. *In vitro*, esta expresión se incrementa progresivamente hasta las etapas de eritroblasto policromático-ortocromático [55]. La expresión de hemoglobina A coincide con la aparición de los eritroblastos basofílicos [83].

Del mismo modo, existen diferentes patrones de expresión a medida que progresa la diferenciación de los eritroblastos: el grupo de proteínas que describe un incremento en la expresión incluye a CD235a (o GPA) y GPC, proteínas cuyos dominios citosólicos son punto de anclaje para el citoesqueleto, mientras que los extracelulares permiten la interacción con otras células [84]; Banda 3 (un intercambiador aniónico [84]), que muestra el incremento más dramático y progresivo a lo largo del tiempo; RhAG y RhD (transportadores gaseosos [84]) [68]. Además se sabe que durante la eritropoyesis definitiva, los eritroblastos expresan un arreglo diverso de moléculas de adhesión que sufren una variación dinámica durante la diferenciación. Estas proteínas median interacciones entre eritroblastos, eritroblastos-macrófagos y la unión a los componentes de la matriz extracelular, tales como fibronectina y laminina [67].

Otro grupo muestra un patrón de expresión disminuída, dentro del cual se encuentran moléculas de adhesión como integrina $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 1$, CD44, CD36, CD47, CD59, CD71, CD147 y Kell [68]. Particularmente, el marcador CD36, receptor de trombospondina, es expresado *in vitro* desde el estadio de CFU-E hasta la etapa basofílica y su expresión se pierde progresivamente durante la transición desde los estadios policromatófilicos a ortocromáticos [55]. En la Tabla 3 se indica un breve resumen de los cambios que ocurren en la expresión de estas proteínas a medida que transcurre el proceso de diferenciación. Asimismo, en la Figura 7 se observa un resumen gráfico del proceso de diferenciación y maduración eritroide.

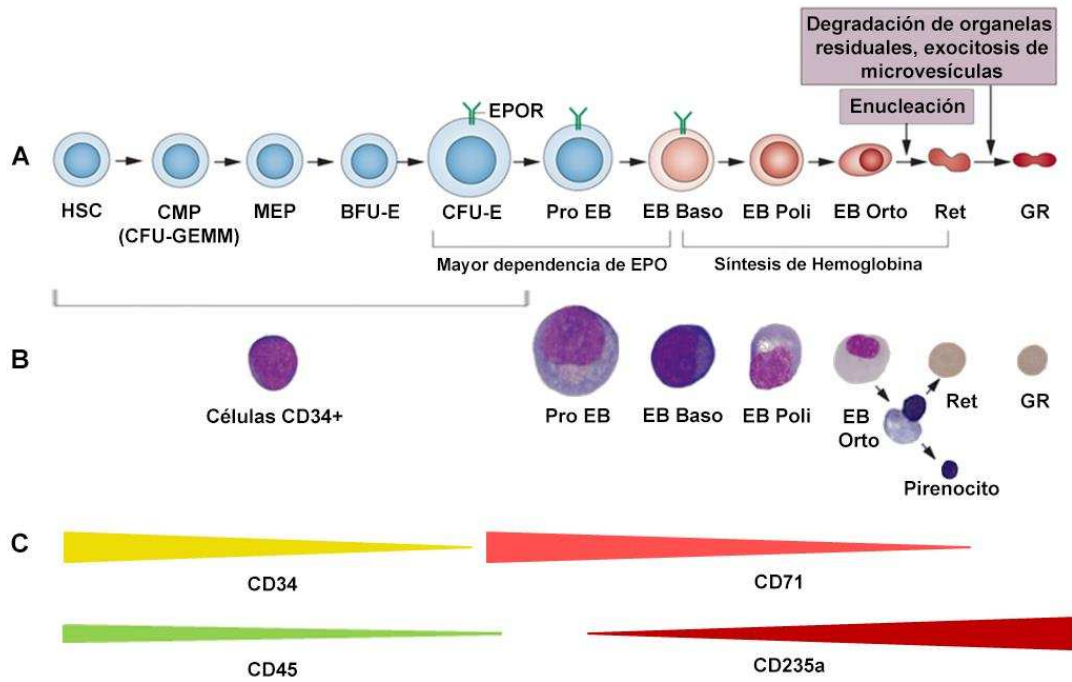


Fig. 7. Progreso morfológico e inmunofenotípico del proceso de diferenciación y maduración del linaje eritroide. **A.** Ilustración de los diferentes estadios del proceso de diferenciación mostrando tamaños relativos y apariencia morfológica conocida o presunta, indicándose algunos procesos clave como la expresión del EPOR, la síntesis de hemoglobina y cambios fundamentales para la maduración como la enucleación y la eliminación de componentes celulares. **B.** Morfología celular característica de cada estadio de diferenciación, obtenida por coloración de May-Grünwald-Giemsa. **C.** Expresión diferencial de marcadores de superficie celular a lo largo de la eritropoyesis. Abreviaciones: Baso, basofílico; BFU-E, unidad formadora de brotes-eritroide; CFU-E, unidad formadora de colonias eritroide; CFU-GEMM, unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos; CMP, progenitor común mieloide; EB, eritroblasto; EPO, eritropoyetina; EPOR, receptor de EPO; HSC, célula madre hematopoyética; MEP, progenitor bipotente megacariocítico-eritroide; Orto, ortocromático; Poli, policromatofílico; GR, glóbulo rojo; Ret, reticulocito (figura modificada de Koury y Haase, 2015 [85] y Kim, 2014 [86]).

Tabla 3. Expresión de antígenos durante las diferentes etapas de eritropoyesis (tabla modificada de Attar, 2014 [81])

	MEP	Proeritroblasto	Eritroblasto basofílico	Eritroblasto policromático	Eritrocito
<i>CD34</i>	++	-/+	-	-	-
<i>CD36</i>	-	++	+++	++	-
<i>CD38</i>	++	+	-/+	-	-
<i>CD45</i>	++	+	-/+	-	-
<i>CD45RA</i>	-	NA	NA	NA	NA
<i>CD71</i>	-	+++	+++	+++	-
<i>CD117</i>	++	++	-	-	-
<i>CD123</i>	-	NA	NA	NA	NA
<i>CD235a</i>	-	+ / ++	+++	+++	+++
<i>HLA-DR</i>	++	++	+	-	-
<i>Hemoglobina</i>	-	-	-/+	+	+++

+++ significa expresión fuerte; ++ significa expresión moderada; + significa expresión débil; +/- significa expresión muy débil; - significa no expresión; NA indica que no hay datos disponibles.

4. ASPECTOS RELEVANTES EN LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS DESTINADOS A LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS ERITROIDES

4.1. Medios de cultivo

Una óptima expansión eritroide *in vitro* se logra cuando las células son inicialmente cultivadas en medio de proliferación y luego transferidas a un medio que favorezca su maduración. Es decir, los procesos de proliferación y maduración de los eritroblastos son favorecidos por condiciones de cultivo mutuamente excluyentes [54,83,87].

Se sabe que entre las condiciones requeridas para la proliferación de los eritroblastos, es necesaria la presencia de receptores funcionales de EPO y de glucocorticoides [88,89]. En ratones, éstos inducen la eritropoyesis de estrés, una fase de producción de GRs acelerada observada en el bazo de estos animales, cuando se recuperan de anemia hemolítica. Esto impulsó el uso en cultivos líquidos de una combinación de glucocorticoides (como dexametasona, un ligando sintético del receptor de glucocorticoides), estradiol y factores de crecimiento para generar un número elevado de eritroblastos [89,90]. Así, un trabajo inicial utilizó condiciones de amplificación eritroide en dos fases: la primera, de expansión, implicó la estimulación con SCF, concentración sub-óptima de IL-3 (para promover la proliferación sin limitar la diferenciación mieloide), EPO, Dexametasona y estradiol; la segunda fase, de maduración, incluyó la estimulación con EPO e insulina [77]. Sin embargo, se dice que estas dos fases son mutuamente excluyentes, ya que se ha comprobado que en presencia de dexametasona se encuentra activada la vía autofágica en los eritroblastos, la cual en este caso no es usada para su maduración y extrusión nuclear, sino que induce muerte mediada por autofagia, a menos que los eritroblastos sean transferidos a medio de maduración con EPO e insulina, pero sin dexametasona. Se ha reportado que tanto la insulina como el IGF-1 sinergizan los efectos de maduración de EPO, promoviendo la condensación nuclear y la enucleación [91]. Por otro lado, se vio que el estradiol es relativamente menos importante en puntos iniciales del cultivo, mientras que tiene un rol crucial en los últimos días, probablemente por prevenir el agotamiento de los telómeros [55]. Estudios posteriores del grupo del Dr. Douay demostraron que los eritroblastos generados en estas condiciones son capaces de madurar en GRs *in vivo*, cuando son transfundidos en ratones inmunocomprometidos [92] e *in vitro*, cuando son co-cultivados con líneas celulares estromales adecuadas [51].

In vivo, la maduración de los eritroblastos ocurre en las islas eritroblásticas donde, como se mencionó previamente, se cree que la interacción macrófagos-eritroblastos promueve la hemoglobinización favoreciendo la incorporación

de hierro y la enucleación. Estas interacciones celulares han sido modeladas incluyendo en el segundo paso de cultivo ya sea macrófagos derivados de células CD34⁺ [93] o células estromales mesenquimales, lo que permitió la observación de tasas de enucleación aproximadamente del 100% [51]. También han sido alcanzadas tasas de enucleación satisfactorias mediante la inducción de un estado competente para la auto-extrusión nuclear en el segundo paso de cultivo con EPO, IGF-2, VEGF y mifepristona [52] o con hormona tiroide (T3), suero humano y el compuesto químico ZK112993 [94]. Tanto mifepristona como ZK112993 son antagonistas de glucocorticoides.

Para potenciar la expansión de los eritroblastos, algunos investigadores han pre-cultivado las células CD34⁺ bajo condiciones diseñadas para promover la expansión de las HSPCs. Este pre-cultivo no utiliza EPO y contiene SCF y FLT3-L y puede o no contener TPO [92,93,95,96]. Las mayores tasas de proliferación (hasta 10⁵-10⁶ veces), sin embargo, hasta ahora han sido obtenidas en cultivos iniciados con células CD34⁺ de sangre de cordón pre-cultivadas con co-cultivo con células estromales [93].

Recientemente, Chaurasia y col. [97] han demostrado que la adición de ácido valproico al pre-cultivo de células CD34⁺ de sangre de cordón estimuladas con SCF, FLT-3L y TPO permite la generación de numerosos eritroblastos. Por otro lado, debido al efecto en la supervivencia, proliferación y/o diferenciación que tienen IGF-2 y VEGF, Miharada y col. los han incluido en el medio de expansión, obteniendo mayores incrementos (en veces) que los observados con la combinación de EPO, SCF e IL-3 solamente [52].

Otros factores que favorecen la proliferación de los eritroblastos son, por un lado, la hipoxia (5-6% O₂) [98] y, por otro, el Poloxamero 188 (Pluronic F68, un polímero con superficie no iónica comúnmente usado durante la administración intravenosa de drogas y en cultivo celular). Se observó que este último sería un material adecuado por inducir buena expansión celular y mejor morfología eritroide [99].

4.2. Fuentes celulares alternativas bajo consideración

Además de las HSPCs, las células madre embrionarias humanas (hESCs) y las iPS también están siendo activamente investigadas como fuente de progenitores eritroides para la expansión *ex vivo* de eritroblastos. Puesto que los GRs no tienen núcleo, las consideraciones de seguridad sugieren que los glóbulos rojos podrían representar el primer producto de terapia celular en ser generado a partir de hESCs e iPS. Las iPS serían generadas a partir de células somáticas maduras de cualquier individuo (fibroblastos, células CD34⁺ y células T) por expresión forzada de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, teniendo así el potencial de generar GRs compatibles. Sin embargo, el

proceso en sí aún no se encuentra adecuadamente controlado y genera líneas de iPS que presentan gran variabilidad en la expansión de eritroblastos [55]. Otra posibilidad que permite la tecnología de reprogramación es reprogramar cualquier célula somática (en este caso fibroblastos) directamente en progenitores eritroides inducidos, evitando el estado de pluripotencia mediante la sobre-expresión de genes adecuados [100]. Algunas ventajas y desventajas de las posibles fuentes celulares se presentan en la Tabla 4.

Finalmente, un enfoque prometedor consiste en la generación de células eritroides maduras a partir de líneas celulares eritroides inmortalizadas. Así como las iPS, éstas pueden ser generadas a partir de fenotipos de grupos sanguíneos específicos y tienen dos ventajas teóricas principales: su facilidad de cultivo y la posibilidad de generar líneas en estadios más sincronizados. La prueba de concepto de esta estrategia fue establecida en 2008 por Hiroyama y col. [101], quienes generaron líneas de progenitores murinos que luego fueron diferenciadas hasta la etapa de enucleación. Luego, dos grupos de investigación [102,103] generaron líneas celulares eritroides humanas, pero con pobre enucleación [32].

Tabla 4. Fuentes de células madre para producir GRs *ex vivo* (tabla modificada de Zeuner y col., 2012 [48]).

PRODUCTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<i>HSPCs de sangre descartada fetal o adulta</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gran potencial de expansión eritroide con la tecnología actual ▪ Productos de transfusión específicos para cada paciente ▪ Criterio de seguridad establecido para la selección de donantes 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cantidades limitadas
<i>Células madre embrionarias descartadas (hESC)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cantidad ilimitada ▪ Teóricamente útil para generar productos de transfusión universales 0 Rh – ▪ Puede someterse a caracterización GMP (Buenas Prácticas de Manufactura, por sus siglas en inglés) (<i>screening</i> viral, cromosómico, proteómico, genético, perfil epigenético, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pobre potencial de expansión eritroide con la tecnología actual ▪ Sólo 3 de las 136 hESCs actualmente disponibles son de grado GMP ▪ El genotipo de las 3 líneas GMP es 0/B Rh+ ▪ Propensión a adquirir anomalías cariotípicas ▪ Restricción ética
<i>iPSCs (con o sin corrección genética)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cantidad ilimitada ▪ Adecuada para producir productos de transfusión donante-específicos incluso GRs de donantes de grupos raros. ▪ Puede someterse a caracterización GMP (<i>screening</i> viral, cromosómico, proteómico, genético, perfil epigenético, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pobre potencial de expansión eritroide con la tecnología actual ▪ Sujeto a adquirir anomalías cariotípicas ▪ Asuntos de propiedad relativos al donante a ser definidos

4.3. Sistemas de cultivo

En el proceso de desarrollo de sistemas biotecnológicos destinados a la producción de células eritroides a partir de HSPCs es necesario tener en cuenta ciertas particularidades que surgen del tipo de producto (celular) y su fuente de producción (cultivo primario de células progenitoras):

- A diferencia de los procesos biotecnológicos estándar, en los cuales el material de partida es una línea celular homogénea o un clon bien caracterizado, aquí la fuente celular, por lo general, es un *pool* de células en diferentes estadios de maduración derivados de varias unidades de SCU (o SP movilizada o médula ósea). Es muy probable que las condiciones óptimas no sean las mismas para cada unidad de sangre y que por esto, requieran adaptación. Adicionalmente, el objetivo final de producción implica el monitoreo de la expansión de células y de su maduración, dos parámetros entre los cuales deberá existir un compromiso [47].

- En los procesos a gran escala, la técnica de perfusión que es la principal estrategia empleada para incrementar la concentración celular, no puede ser directamente transpuesta por razones económicas, ya que el medio de cultivo es demasiado caro, lo que también requeriría hallar otro método para eliminar los productos de desecho conservando las moléculas caras en el medio de cultivo [47].

Los primeros intentos de diferenciación eritroide con elevadas productividades comenzaron cuando, en 2005, se generaron grandes cantidades de GRs a partir de HSPCs de SCU [51]. Sin embargo, este procedimiento tuvo dos grandes desventajas: el uso de un sistema de co-cultivo con células estromales murinas o humanas, lo que implica limitaciones para su escalamiento y, por otro lado, los bajos rendimientos obtenidos. Luego, en 2006, Miharada y col. reemplazaron exitosamente el sistema de co-cultivo por suero, aunque con menores tasas de expansión y enucleación [52]. Finalmente, en 2011, se lograron reemplazar todos los alo-componentes del medio por sus proteínas recombinantes equivalentes, finalizando así esta adaptación, con vistas a su potencial utilidad clínica [34].

Hasta ahora, los cultivos de rutina han sido realizados en condiciones estáticas en placas de cultivo, con concentraciones terminales máximas de alrededor de $2-5 \times 10^6$ células/ml. Recientemente, Baek y col. propusieron un método para incrementar las tasas de enucleación cargando positivamente las placas de cultivo [104].

En cuanto al uso de biorreactores para el cultivo, sólo hay disponibles un número limitado de publicaciones. Sin embargo, se han realizado muchos intentos de escalar el cultivo de HSPCs con el objetivo de incrementar el número de células madre recolectadas para terapia celular y trasplante luego de la quimioterapia. Ha sido probado

un amplio rango de biorreactores: biorreactores *airlift*, frascos *spinner* y biorreactores tanque-agitado, de fibra hueca, reactores de lecho fijo con *microcarriers* y reactores de frascos rodantes [47], obteniéndose los mejores resultados con reactores tanque agitado y de frascos rodantes. En 2011 fue demostrado por primera vez que es posible expandir y diferenciar células en GRs en biorreactores WAVE con los mismos rendimientos que en cultivos estáticos [34], pero los autores mantuvieron la concentración celular baja intencionalmente. Finalmente, concentraciones de 2×10^8 células/ml se obtuvieron en un sistema de fibra hueca modificado de 8 ml, pero la maduración celular no fue evaluada [105,47].

Otra alternativa que han explorado numerosos grupos es la imitación del microambiente medular de modo de inmovilizar las células, lo que favorecería las interacciones célula-célula que modulan el crecimiento y la maduración. Para esto se han usado estructuras naturales o sintéticas (hidrogeles, cerámicas, vidrios, matrices fibrosas o composites), a veces con moléculas biológicas activas para la señalización específica. En general, estas matrices 3D son prometedoras para reducir los volúmenes de cultivo y la dependencia en citoquinas costosas, para así aumentar la longevidad de los cultivos [47].

5. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

5.1. Relevancia del empleo de estrategias de diseño experimental

A pesar de la real necesidad de implementar sistemas alternativos a los sistemas 2D convencionales, es importante destacar que la mayor parte del costo de producción de células eritroides deriva del medio consumido. En particular, de acuerdo a los datos obtenidos por Timmins y Nielsen [21] para la producción de GRs maduros los factores de crecimiento representan el 57,5% del precio del medio completo, mientras que la transferrina y el plasma representan un 36%. El medio en sí mismo no cuesta más del 3% del total, lo que resalta el hecho de que los mayores esfuerzos deberán ser realizados en relación a estas moléculas complementarias [47]; estos datos se indican en la Tabla 5.

Tabla 5. Costo porcentual detallado del medio completo requerido para producir una unidad de GRs a 5×10^7 céls./ml (tabla modificada de Timmins y Nielsen, 2009 [21] y Rousseau y col., 2014 [47]).

Reactivo	Porcentaje (%)
Medio básico	3,5
Transferrina	17
Albúmina de suero humana	19
Insulina	3
EPO	33
IL-3	9
SCF	15,5
TODOS LOS FACTORES DE CRECIMIENTO	57,5
Total	100

Además del elevado costo de los suplementos, cabe recalcar que las mayores tasas de proliferación reportadas han sido obtenidas mediante co-cultivo con células estromales y/o pasos múltiples, en los cuales diferentes factores de crecimiento y concentraciones son utilizados en distintas etapas de cultivo a lo largo de 15-18 días [106]. Es así que cobra particular importancia la optimización de la composición del medio de cultivo, teniendo en cuenta la capacidad de diferenciación de las HSPCs. Este dinamismo celular resulta en la generación de poblaciones heterogéneas con requerimientos diferenciales que deben ser analizados y considerados para aprovechar al máximo la capacidad de replicación y diferenciación celular [107].

Sin embargo, estos métodos tradicionales de dosis-respuesta empleados para estudiar el efecto de dichos factores, variables del “bioproceso”, en los cultivos, proveen sólo una cantidad limitada de información puesto que los parámetros son variados uno a la vez durante el experimento (estrategia OVAT o *One Variable At a Time*, una variable a la vez, por sus siglas en inglés). Así, en general no revelan efectos de la interacción entre las variables y tampoco representan la verdadera naturaleza del proceso *in vitro* y de las respuestas bajo estudio [106]. Adicionalmente, el número de experimentos es importante cuando el número de factores se incrementa y, usualmente, el dominio experimental explorado es más pequeño comparado con aquél examinado con un enfoque multivariado [108].

De este modo, el uso de DoE (Diseño de Experimentos), un método estadístico para estudiar y caracterizar los procesos de cultivos celulares, constituye un modo eficiente para abordar la experimentación que minimiza el número de experimentos requeridos para caracterizar y optimizar de manera sistemática y robusta un dado proceso [106,107]. En el sistema bajo estudio la reducción del número de experimentos es particularmente relevante debido a que, en primer lugar, obtener un número importante de células CD34⁺ a partir de cualquiera de sus fuentes naturales resulta

complejo y costoso. La baja disponibilidad de fuentes de HSPCs apropiadas está vinculada a varias cuestiones: se requieren numerosas muestras libres de agentes adventicios, de volumen y celularidad (es decir, proporción o concentración de células hematopoyéticas, la cual varía según la edad del paciente) apropiados, cuya obtención está sujeta a la existencia de convenios fuertes entre el ámbito académico y nosocomial que aseguren una apropiada disponibilidad de las mismas. Esto es importante dada la baja frecuencia de HSPCs en cualquiera de sus fuentes naturales. Adicionalmente, estos requisitos se vuelven aún más inaccesibles para el caso de las muestras de médula ósea, por el reducido número de donantes y el protocolo invasivo que implica su recolección. En segundo lugar, como ha sido mencionado previamente, el costo asociado a los cultivos para la expansión y diferenciación de HSPCs es, en la actualidad, excesivamente elevado.

Así, el arreglo de diseños DoE permite desarrollar varias tareas, tales como *screening* de factores, caracterización de procesos y optimización [107], mejorando de este modo la eficiencia de la experimentación a través de la aplicación de los tres principios básicos del diseño experimental: aleatorización, replicación y bloqueo [109].

5.2. Diseño de Experimentos (DoE) y Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)

Cuando el o los mecanismos subyacentes a un proceso no son comprendidos completamente y el experimentador debe generar un modelo empírico, dado en general por una función polinómica de primer o segundo orden, este modelo empírico es denominado Modelo de Superficie de Respuesta. Así, la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para desarrollar, mejorar y optimizar procesos. En estos procesos existen medidas de su funcionamiento o de su calidad, denominadas *respuestas*, las cuales se encuentran influenciadas por *variables independientes* o *factores*, sujetos al control del experimentador [110].

La RSM abarca: a) el diseño de un conjunto de experimentos que generará medidas adecuadas y confiables de la(s) respuesta(s) de interés; b) la determinación del modelo matemático que mejor se ajuste a los datos recolectados a partir del diseño escogido, a través de la realización de pruebas de hipótesis apropiadas en relación a los parámetros del modelo; y c) la determinación del ajuste óptimo de los factores experimentales que producen un valor máximo (o mínimo) de la(s) respuesta(s) [111].

5.2.1. La naturaleza secuencial y sistemática de la investigación de superficies de respuesta

Este método científico se caracteriza por la realización de experimentos en etapas (o secuencialmente), utilizando la información adquirida a partir de un conjunto

de experimentos para planear la estrategia siguiente. Para llevar a cabo de manera correcta un diseño experimental, la mayoría de los autores recomienda considerar los siguientes pasos: en primer lugar, determinar el problema y los objetivos de optimización, así como la evaluación del tiempo y el costo de experimentación. Luego, se deberán seleccionar la/s variable/s respuesta, así como los factores y sus niveles. En este sentido, se deben detectar y examinar cuidadosamente todos los factores (cuantitativos y/o cualitativos) que puedan afectar el proceso y, si es necesario, realizar experimentos para determinar cuáles de ellos tienen mayor influencia [108].

A continuación será necesario determinar y aplicar un diseño experimental adecuado para cada etapa. Las estrategias de experimentación comienzan con diseños factoriales, los cuales proveen una herramienta de *selección de factores*. Durante esta fase, los experimentadores buscan descubrir los pocos factores fundamentales que generan efectos estadísticamente significativos de importancia práctica para el objetivo de mejora del proceso. Para ahorrar tiempo y dinero en este estadio temprano, en el cual un número de factores desconocidos debe ser estudiado, la estrategia requiere del uso de análisis de baja resolución, que por lo tanto implican llevar a cabo sólo una fracción de todas las combinaciones posibles. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que recortar el número de corridas experimentales reduce la capacidad del diseño de resolver todos los posibles efectos, específicamente las interacciones de mayor orden, es decir, aquellas que involucran un mayor número de factores [112]. Así, los diseños de *screening* de tipo factorial completo, factorial fraccionado y *Plackett-Burman*, todos ellos a dos niveles por factor, son los más ampliamente utilizados debido a que son económicos y eficientes [108].

Luego de que el sistema ha sido caracterizado y se tiene certeza razonable de que se han identificado los factores importantes, el siguiente objetivo es usualmente la *optimización*, lo que implica encontrar los niveles de estos factores importantes que resultan en valores deseables de la/s respuesta/s [113]. Los diseños más utilizados son los factoriales completos a tres niveles, el central compuesto, *Box-Behnken*, *D-optimal* y *Doehlert*. Todos ellos permiten obtener datos que deben ser generalmente modelados usando polinomios de regresión lineal múltiple para caracterizar una superficie de respuesta. Los datos generados a partir de ella deben ser generalmente modelados a través del ajuste de cuadrados mínimos o, excepcionalmente, a través de redes neuronales artificiales. Cuando un elevado número de respuestas debe ser optimizado (siguiendo un criterio apropiado), la función deseabilidad es la herramienta que se aplica más comúnmente [108].

Una vez que los datos obtenidos en los dos pasos anteriores (*screening* y *optimización*) han sido analizados, el experimentador debe generar conclusiones

prácticas acerca de los resultados y recomendar un curso de acción. También deberán llevarse a cabo *corridas de seguimiento y pruebas de confirmación* para validar las conclusiones experimentales [113].

Los programas de computación son ampliamente utilizados para asistir a los experimentadores en la selección y construcción de diseños experimentales. Estos programas presentan las corridas del diseño experimental en orden aleatorio [113].

5.2.2. Modelado en la etapa de *screening* y de RSM

El enfoque general para el análisis estadístico de diseños de *screening* para cada respuesta a ser analizada implica a) estimar los efectos de los factores y examinar sus signos y magnitudes, b) construir un modelo inicial para la respuesta, c) realizar pruebas estadísticas, d) refinar el modelo eliminando las variables no significativas y e) analizar los residuos para asegurar la adecuación del modelo y sus supuestos. Así, adicionalmente, las variables seleccionadas a partir de cualquier análisis gráfico deberían ser examinadas mediante análisis de varianza (ANOVA) y, si es necesario, el modelo debería ser reducido por remoción de cualquier variable no significativa [108].

Por otro lado, la ecuación del modelo para la RSM usualmente se ajusta mediante la metodología de cuadrados mínimos (LSM), una técnica de regresión múltiple que ajusta un modelo a un conjunto de datos experimentales, hallando los coeficientes que minimizan el término residual. Las redes neuronales artificiales (ANN) representan otra herramienta para el modelado multivariado no-lineal. En cada caso, el modelo ajustado debe ser capaz de describir adecuadamente los datos para realizar predicciones estadísticas [108].

Cuando se aplica LSM, es habitual asumir que los valores esperados de los errores se encuentren cerca de cero, que sean independientes y de varianza constante y, al menos, distribuidos de manera aproximadamente normal. Sin embargo, la respuesta es medida siempre con cierto error, razón por la cual estas suposiciones deberían ser corroboradas. Para minimizar la falta de normalidad o de homocedasticidad de los residuos existen al menos tres metodologías: a) usar métodos no-paramétricos, b) usar modelos lineales generalizados y c) analizar una respuesta transformada que cumpla con el requerimiento de normalidad [108].

Para determinar si el ajuste de la regresión lineal múltiple es significativo se realiza una prueba de ANOVA y el modelo es considerado satisfactorio cuando la regresión es significativa y la falta de ajuste (LoF, por sus siglas en inglés) es no-significativa para el intervalo de confianza seleccionado. Sin embargo, obtener un modelo significativo no implica necesariamente que éste explica correctamente la variación de los datos. Consecuentemente, es necesario evaluar los gráficos de

residuos, el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}), que representa el porcentaje de la varianza que es explicado por el modelo. Además, la evaluación de los residuos externamente studentizados es útil para detectar puntos de los datos que no ajustan adecuadamente al modelo seleccionado (*outliers*) [108].

5.2.3. Optimización de múltiples respuestas

Cuando el procedimiento de optimización involucra más de una respuesta, no es posible optimizar cada una de ellas de manera separada, ya que se obtendría un número de soluciones igual al de variables bajo estudio [108].

En la optimización de un proceso, la solución general debe estar incluida dentro de una región óptima, llevando a un cierto grado de conformidad con los criterios propuestos para cada variable del sistema; es decir que se debe encontrar una solución de compromiso. Para esto se pueden emplear diferentes técnicas [108].

En cuanto a la optimización gráfica, ésta implica la superposición de gráficos de contorno de cada respuesta individual, lo que permite obtener una solución conjunta siempre y cuando el número de respuestas y factores no sea demasiado elevado [108].

Otra opción es el empleo de la función Deseabilidad (Deseabilidad de Derringer), cuyo objetivo es hallar condiciones operacionales (niveles de los factores) que aseguren la conformidad con los criterios de todas las respuestas involucradas y, al mismo tiempo, proveer el mejor valor de compromiso en la respuesta conjunta deseable. Esto se logra convirtiendo las múltiples respuestas en una única. Cuando la Deseabilidad alcanza un valor diferente de cero, todas las variables que están siendo simultáneamente optimizadas se consideran en un valor deseable. El procedimiento de optimización implica maximizar ese valor de Deseabilidad [108].

El paso final en una optimización de múltiples respuestas es predecir los valores que pueden adquirir las diferentes respuestas cuando se aplican las combinaciones óptimas de los factores, usando modelos de ajuste. Luego, se deberían efectuar corridas experimentales para verificar dichas predicciones [108].

6. INGENIERÍA GENÉTICA DE HSPCs

La introducción de genes de manera estable en HSPCs promete curar deficiencias genéticas congénitas y podría proveer terapias potenciales para infección por VIH y cáncer. Las HSPCs son, en este sentido, blancos para estrategias de terapia génica para estas enfermedades, ya que pueden ser genéticamente modificadas *ex vivo*

y luego del trasplante, contribuir a la hematopoyesis por largos periodos de tiempo, posiblemente por toda la vida del receptor [114].

Pero también se debe recalcar que si se crearan líneas celulares que generen grandes números de células eritroides mediante la incorporación de determinadas secuencias génicas, las mismas tendrían varias ventajas, incluyendo una mayor reproducibilidad y la posibilidad de hacer que éstas secreten sus propios factores de crecimiento o proteínas que favorezcan cultivos óptimos [47]. Estas aproximaciones resultan de particular interés para el desarrollo del presente trabajo. Asimismo, varios grupos ya se encuentran intentando implementar tales líneas celulares teniendo como blanco moléculas como HOXB4, para hacer que las líneas se regeneren [115,116].

Para llevar a cabo este tipo de estrategias es necesario utilizar sistemas estables de transferencia de genes, de modo de asegurar cambios genéticos a largo plazo en las células sanguíneas. Es así que el uso de sistemas virales que se integran se presenta como una opción adecuada. Los retrovirus recombinantes se han establecido como las herramientas de elección, con tres géneros diferentes: Υ -retrovirus (o retrovirus tipo C u oncoretrovirus), lentivirus y spumavirus. Otros sistemas virales, como el virus adeno-asociado, han tenido un éxito limitado en el contexto de las HSPCs [117].

- Los vectores Υ -retrovirales han sido usados en modelos de trasplante de pequeños y grandes animales, y aprobados para su uso en más de 40 ensayos clínicos basados en la transducción *ex vivo* de células CD34⁺ autólogas [117].

- Los vectores spumavirales son los más recientes y están comenzando a ser evaluados en HSPCs [117].

- Los vectores lentivirales (LVs) se basan, en general, en el VIH-1 y tienen la capacidad de transducir células que no se encuentran en división (además de aquellas que se encuentran en división) y de acomodar grandes secuencias genómicas necesarias para la regulación efectiva del transgen [117,118].

6.1. Ventajas y estructura de los vectores lentivirales

La habilidad de los vectores lentivirales de transducir células que no se encuentran en división se ha vinculado a varios elementos virales que incrementan la translocación y localización nuclear, los cuales se encuentran presentes en los lentivirus pero no en los Υ -retrovirus. Las señales de localización nuclear han sido encontradas en la proteína de matriz gag de VIH-1, en la proteína regulatoria Vpr y en la integrasa, todos ellos componentes del complejo de pre-integración (que transporta activamente el material genético dentro del núcleo celular a través del complejo del poro nuclear [119]). Vpr es dispensable para la infección de células arrestadas y de células

CD34⁺ quiescentes, por lo que no se la incluye en los sistemas de empaquetamiento de tercera generación. Además de estas proteínas virales, el tracto central de polipurina incrementa la eficiencia de transducción de HSPCs no estimuladas, aparentemente incrementando la importación nuclear del complejo de pre-integración. Sin embargo, a pesar de este comportamiento favorable de los LVs, se ha establecido que las células en G₁ son más propensas a ser transducidas que las células en G₀. Por esta razón, se han refinado varios procedimientos para optimizar la transducción lentiviral en HSPCs: mientras que algunos omiten el procedimiento típico de pre-estimulación que es requerido para la transducción γ -retroviral [120–122], otros aún utilizan la activación celular mediada por citoquinas antes de adicionar el vector [123–125]. El consenso que se ha establecido es que el uso de citoquinas tempranas es benéfico para la transducción y no necesariamente reduce la capacidad de repoblación de las HSPCs; en general se utiliza un cóctel con SCF, TPO y FLT3-L [117].

Se ha establecido que, como los γ -retrovirus, los vectores derivados del VIH-1 tienden a integrarse más cerca de los genes que lo que se esperaría de un proceso aleatorio, pero los LVs no tienen como blanco principal la región 5' del gen, tal como ocurre con su contraparte murina (MLV). Esto sugiere que los LVs son menos propensos a transactivar un oncogen corriente abajo mediante activación transcripcional, aunque serían más propensos a reducir las interacciones *enhancer*-promotor entre el vector y los genes adyacentes [117].

Otras ventajas que poseen estos vectores es que las proteínas virales no se expresan luego de la transducción, que pueden transferir elementos genéticos complejos, tales como secuencias policistrónicas o que contienen intrones y que tienen un sistema relativamente sencillo para la manipulación y producción del vector [126].

Por las razones expuestas los LVs serán de elección para transferir el material genético a las HSPCs de SCU, como parte de uno de los objetivos de este trabajo.

La mayoría de los vectores lentivirales disponibles actualmente se basan en vectores lentivirales de segunda y tercera generación, que han sido mejorados para optimizar su seguridad e infectividad [126]. Los de tercera generación, cuya estructura se muestra en el Figura 8, fueron los empleados en el presente trabajo, y poseen diferentes propiedades:

- Están pseudotipados con la proteína VSV-G (glicoproteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular). Esta proteína es sustancialmente más estable que la glicoproteína de envoltura del VIH-1. Además se sabe que la VSV-G se une al componente ubicuo de membrana fosfatidilserina, permitiendo que estos vectores transduzcan un conjunto de células marcadamente mayor, incluso células no mamíferas [126].

- No poseen las proteínas virales accesorias Vif, Vpu, Vpr o Nef, las cuales son esenciales para una eficiente propagación/virulencia del VIH-1 en células primarias o *in vivo* [126].

- Presentan una delección de la región U3, en las repeticiones terminales (LTR). Estas regiones actúan como promotores/*enhancers* virales y esta delección resulta en una inactivación transcripcional de los genomas virales potencialmente empaquetables en la célula transducida. Por esto se los denomina vectores SIN (*self-inactivating*) [126].

- Son Tat-independientes. A pesar de ser una proteína accesorias, Tat, junto con Rev, es indispensable para la replicación del VIH-1. Además Rev es provista a partir de un plásmido separado. La independencia de Tat es lograda reemplazando la región promotora U3 del LTR 5', la cual es dependiente de Tat, en el vector de transferencia por un promotor viral fuerte como CMV (promotor de citomegalovirus) o RSV (promotor del virus de sarcoma de Rous) [126].

- Se emplean cuatro plásmidos para generar lentivectores de tercera generación:

- a. pMDL/pRRE: esta construcción de empaquetamiento contiene sólo los genes *gag* (poliproteína de cápside) y *pol* (retrotranscriptasa viral);

- b. pREV: este plásmido expresa Rev, la cual posee la capacidad de unirse a las secuencias RRE, presentes en pMDL/pRRE y en pLV, y promover la exportación nuclear hacia el citoplasma.

- c. pVSV-G: codifica la VSV-G; y

- d. pLV: un plásmido de transferencia SIN, dirigido por un promotor fuerte heterólogo.

Puesto que los elementos del vector se encuentran distribuidos en cuatro plásmidos, se requieren al menos tres eventos de recombinación para generar virus similares a VIH-1 con capacidad replicativa. Y si esto ocurriera, las partículas generadas tendrían sólo tres de los nueve genes del VIH-1 [126].

Como se observa en la Figura 9, en el vector de transferencia existen todas las secuencias necesarias para la expresión del transgen de interés, como así también las secuencias *cis*-actuantes requeridas para el correcto ensamblado de la partícula lentiviral que, además de las regiones LTRs modificadas, incluyen:

- Psi (ψ): es una secuencia de empaquetamiento, requerida para la incorporación del ARN genómico a las partículas virales [126].

- RRE (*Rev response element*): se trata de una región que posee la secuencia requerida para la unión de la proteína Rev, la cual promueve la exportación del ARN del núcleo al citoplasma [126].

- cPPT (*central polypurine tract*): es una región rica en purinas que promueve la retrotranscripción viral cuando las partículas lentivirales transducen una célula y estimulan la importación nuclear [127].
- WPRE (*Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*): se trata de una región ubicada corriente abajo del gen de interés que actúa estabilizando el ARN mensajero [127].
- Promotor: tradicionalmente se emplea el promotor constitutivo CMV, pero en el caso de la expresión génica en HSPCs, los promotores son críticos para maximizar y estabilizar la expresión del gen exógeno. Así, un promotor muy empleado en el caso de la expresión de genes en HSPCs es el EF1- α (*Elongation factor 1-alpha*), un promotor constitutivo utilizado para la expresión ectópica en diversos contextos *in vitro* e *in vivo*. Éste es derivado del gen EF1A1, el cual expresa la subunidad *alpha* del factor de elongación 1 eucariota, y permite una expresión robusta, constitutiva y de largo plazo del gen de interés en tipos celulares en los cuales los promotores CMV son frecuentemente silenciados, como es el caso de las HSPCs [128,129].

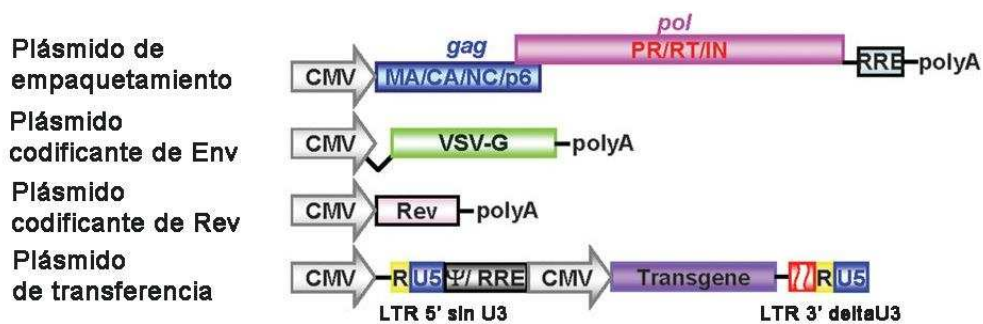


Fig. 8. Vectores lentivirales de tercera generación derivados del HIV-1. Plásmido de empaquetamiento, contiene los genes *gag* y *pol*; pVSV-G, codifica VSV-G; pRev, codifica la proteína Rev. El vector de transferencia contiene el transgen a ser incorporado (figura modificada de Sakuma y col., 2012 [126]).

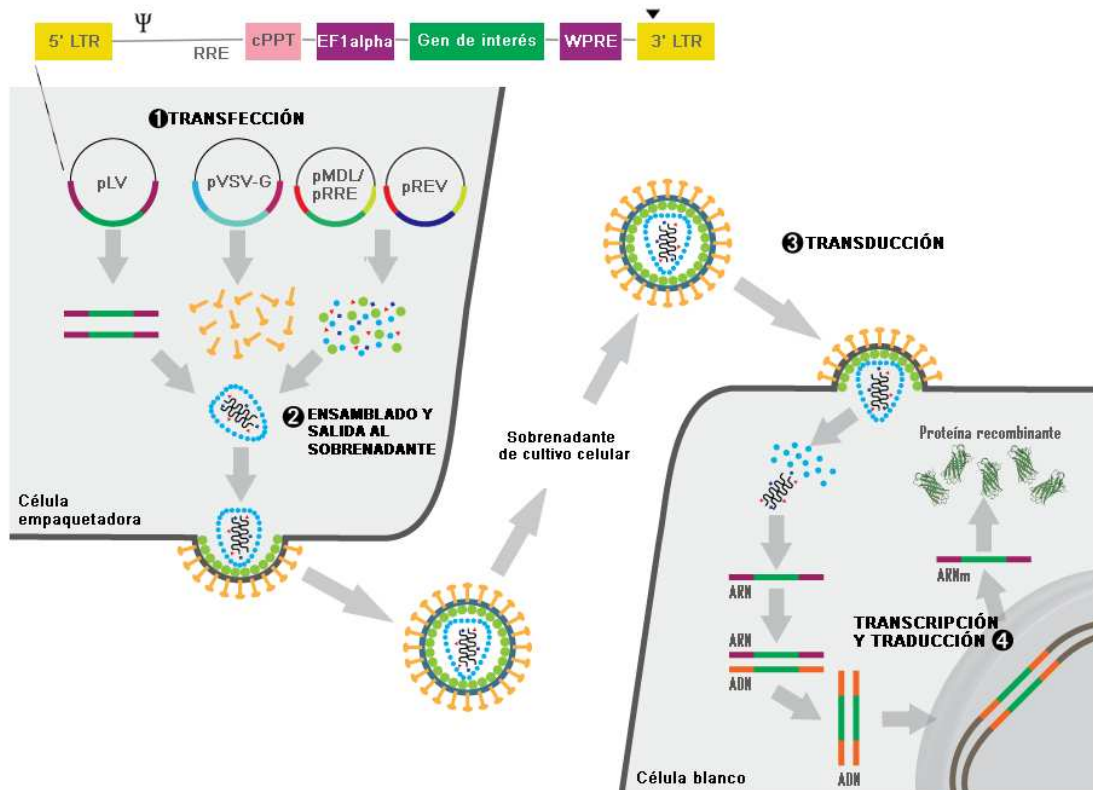


Fig. 9. Resumen de la producción de partículas lentivirales recombinantes a partir del sistema de vectores de tercera generación y de la transducción de células blanco. En el paso **1** se observa que las células productoras (por ejemplo, HEK293T) son transfectadas con 4 plásmidos que codifican la proteína VSV-G, proteínas virales esenciales como gag, pol y rev y el plásmido de transferencia que codifica el gen de interés. Se indica aquí también un detalle del vector lentiviral de transferencia, que posee la secuencia del gen de interés regulado por el promotor EF1 α , una secuencia de regulación post-transcripcional (WPRE), una región de purinas (cPPT), como así también el resto de las secuencias *cis*-actuantes para el ensamblado de las partículas virales. LTR: *long terminal repeats*; RRE: *Rev response element*; ψ : región empaquetadora; ∇ : *self-inactivating mutation* (SIN). En **2** se observa el ensamblado de la partícula viral y su liberación al sobrenadante de cultivo a través de un proceso de brotación con la membrana plasmática de la célula productora, resultando en una envoltura que contiene la VSV-G. El medio que contiene las partículas es recolectado (y almacenado) y posteriormente usado en la **3** transducción de las células blanco. En este proceso las partículas ingresan a las células y las cápsidas son descubiertas, revelando así el genoma a ARN y las enzimas virales. El ARN viral es retrotranscrito en ADN, el cual se integra en el genoma de la célula blanco. **4** Finalmente ocurre la transcripción y traducción del ADN lentiviral, resultando en la producción de la proteína codificada por el gen de interés (figura modificada de <http://www.mirusbio.com> [130] y de Pfeifer y col., 2010 [131])



Objetivos



OBJETIVO GENERAL

A partir de lo expresado en la introducción, se desprende la importancia de continuar avanzando en la comprensión y el desarrollo de los procesos de producción *ex vivo* de células eritroides. Con las tecnologías de cultivo disponibles actualmente, sería posible aplicar estas células con diversos fines: el uso de GRs reactivos para la identificación de anticuerpos en *kits*/dispositivos diagnósticos; la utilización de células eritroides primarias para el descubrimiento de drogas y su evaluación para ciertas patologías, reduciendo así la experimentación animal e incrementando la sensibilidad y robustez de los estudios pre-clínicos; así como también la evaluación de estos candidatos celulares en la entrega dirigida de drogas para el tratamiento de diversas patologías adquiridas o hereditarias. Adicionalmente, los progresos realizados en la producción eritroide con estos fines intermedios también contribuirían a alcanzar el objetivo último de los GRs obtenidos *in vitro*, su empleo en transfusión.

Con estas perspectivas, se plantea como objetivo general de este trabajo el desarrollo de condiciones de cultivo y de nuevas estrategias que permitan obtener células eritroides a partir de HSPCs derivadas de sangre de cordón umbilical, reduciendo el consumo de factores de crecimiento costosos requeridos en el proceso de expansión y diferenciación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

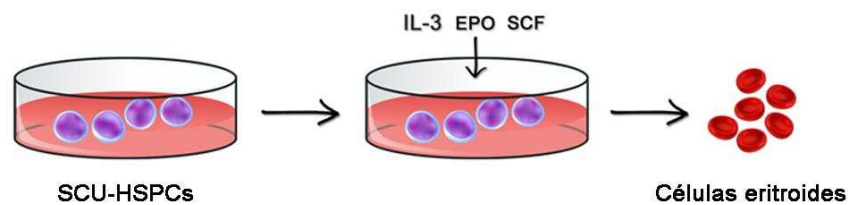
- 1. Purificar HSPCs utilizando como fuente sangre de cordón umbilical**
 - 1.1. Recolectar sangre de cordón umbilical (SCU) y generar un banco celular de trabajo constituido por células mononucleares derivadas de dichas unidades.
 - 1.2. Purificar HSPCs CD34⁺.
 - 1.3. Analizar el rendimiento y eficiencia del proceso de purificación.

- 2. Desarrollar condiciones de cultivo para la producción de células eritroides a partir de HSPCs**
 - 2.1. Seleccionar aquellos suplementos de cultivo que contribuyan más significativamente a la expansión de las HSPCs y optimizar sus concentraciones.
 - 2.2. Cultivar las HSPCs expandidas en condiciones adecuadas para la expansión y maduración de precursores eritroides.
 - 2.3. Evaluar las características inmunofenotípicas de los productos celulares.

3. **Modificar genéticamente las HSPCs con la secuencia de hEPO, de modo que las células secreten la hormona en el medio de cultivo, con el objeto de reducir la suplementación con este factor**
 - 3.1. Ensamblar vectores lentivirales de tercera generación que contengan la secuencia de hEPO, así como vectores que contengan la secuencia de la proteína verde fluorescente GFP (vectores reporteros)
 - 3.2. Desarrollar condiciones para la adecuada transducción de HSPCs utilizando el vector reportero
 - 3.3. Modificar genéticamente las HSPCs empleando el vector con la secuencia de hEPO
 - 3.4. Analizar la producción de hEPO por parte de las células modificadas
 - 3.5. Realizar cultivos comparativos entre HSPCs modificadas cultivadas en ausencia de hormona exógena y HSPCs no modificadas en medio de cultivo suplementado con hEPO. Evaluar la expansión celular y la capacidad de diferenciación eritroide.

La estrategia a desarrollar para cumplir con este objetivo particular se esquematiza en la Figura 10.

A



B

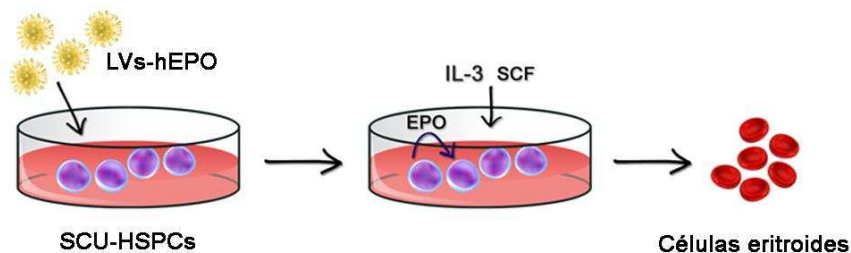


Fig. 10. Análisis de diferenciación eritroide y expansión celular *ex vivo* en diferentes condiciones. A. En cultivos de SCU-HSPCs no modificadas en presencia de factores exógenos, entre ellos hEPO. **B.** En cultivos de SCU-HSPCs modificadas con LVs-hEPO, cultivadas sin hEPO exógena.



Materiales y Métodos



1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Excepto en los casos donde se aclara expresamente, todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultra pura obtenida por ósmosis inversa (resistividad 18,2 M Ω .cm) y filtración (0,22 μ m), empleando un equipo Milli Q^{UF} (Millipore, Estados Unidos).

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Líneas celulares procariontas

- *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, Estados Unidos). Se empleó para el aislamiento y la amplificación de diferentes plásmidos.

2.2. Medios de cultivo para células procariontas

La esterilización de los medios de cultivo para bacterias se realizó en autoclave durante 15 min a 1 atmósfera y 120°C. A continuación se detallan los medios de cultivo empleados:

2.2.1. Medio LB (Luria Bertani)

Se empleó para el crecimiento bacteriano en medio líquido (pH 7,2):

- Triptona 10 g/l (Sigma, Japón)
- extracto de levadura 5 g/l (BD, Estados Unidos)
- NaCl 10 g/l (Sigma)

2.2.2. Medio LB-Antibiótico

Se empleó para el crecimiento de clones bacterianos resistentes a antibiótico:

- Medio LB
- Antibiótico: ampicilina 100 μ g/ml (Bagó, Argentina)

2.2.3. Agar LB

- Medio LB
- Agar 2% (P/V) (Sigma)

2.2.4. Agar LB-Antibiótico

Se empleó para la selección de clones bacterianos:

- Agar LB
- Antibiótico: ampicilina 100 μ g/ml (Bagó)

El antibiótico se suplementó al medio estéril fundido una vez que la temperatura alcanzó aproximadamente los 50°C, ya que el mismo es termolábil. Luego de

homogeneizar, se procedió a adicionar 10 ml del mismo en placas de Petri estériles de 100 mm de diámetro (Greiner Bio-One, Austria).

2.3. Purificación de ADN plasmídico

Los plásmidos fueron purificados a partir de cultivos de bacterias transformadas en medio líquido (Medio LB-Antibiótico). Todos los métodos de purificación se basan en el tamaño relativamente pequeño de los plásmidos y su naturaleza circular cerrada covalentemente.

2.3.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Se utilizó el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega, Estados Unidos) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Previamente se inocularon frascos conteniendo 10 ml de Medio LB-Antibiótico a partir de colonias individuales de cultivos en medio Agar LB-Antibiótico y se cultivaron durante 16-20 h con agitación a 180 rpm y a 37°C.

También se utilizó el protocolo clásico, el cual se describe a continuación:

1. Se centrifugaron a 2.500 *g* durante 10 min 1,5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf. Se descartó el sobrenadante.

2. Se adicionaron 100 μ l de solución de Glucosa (Gibco, Estados Unidos) 1% (P/V), Tris-HCl (Merck, Alemania) pH 8,30 25 mM y EDTA (Merck) 10 mM. Se homogeneizó e incubó 5 min a temperatura ambiente (TA).

3. Se agregaron 200 μ l de solución de lisis [SDS (Sigma) 1% (P/V), NaOH 0,2 N], homogeneizando suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 5 min.

4. Se agregaron 150 μ l de solución de neutralización (acetato de sodio 3 M pH 4,8), homogeneizando por inversión y se incubó en hielo durante 10 min.

5. Se centrifugó 5 min a 13.000 *g*. Se tomó el sobrenadante, se adicionaron 0,5 volúmenes de fenol (Invitrogen) y se homogeneizó por inversión. Luego, se adicionaron 0,5 volúmenes de cloroformo (Cicarelli, Argentina) y se homogeneizó nuevamente. Se centrifugó 10 min a 13.000 *g*.

6. Se tomó la fase acuosa superior y se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto (Merck). Se incubó 20 min a -70°C.

7. Se centrifugó 15 min a 13.000 *g* a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó con 0,2 ml de etanol 70% (V/V), luego se centrifugó 5 min a 13.000 *g* y se descartó el sobrenadante. Se secó por incubación a 37°C en baño seco termostatizado (Labnet, Estados Unidos).

8. Se resuspendió el *pellet* en 20 μ l de agua y se adicionó ARNasa (Promega) 0,5 mg/ml. Se incubó a 37°C durante 30 min.

Por último, se evaluó la integridad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa y su concentración y pureza mediante lectura espectrofotométrica.

2.3.2. Maxipreparación de ADN plasmídico

Con la finalidad de obtener cantidades suficientes de los vectores de expresión y de los vectores empaquetadores, se llevaron adelante preparaciones de ADN plasmídico en gran escala, tal como se describe a continuación:

1. Se inocularon 10 ml de medio de cultivo LB-Antibiótico con una colonia proveniente de medio Agar LB-Antibiótico y se incubó a 37°C a 180 rpm durante 16 h.
2. Se adicionaron a este pre-cultivo 90 ml de LB-Antibiótico y se cultivó durante otras 8 h en las mismas condiciones.
3. Se inocularon 200 ml de LB-Antibiótico con este pre-cultivo y se cultivó durante 16-20 h adicionales en las mismas condiciones.
4. Se centrifugaron los cultivos a 2.500 *g* durante 10 min a 4°C.
5. Se resuspendió el *pellet* en 10 ml de TEG estéril [Tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM; glucosa 1% (P/V); pH 8,3], se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml y se mantuvo en hielo durante 5 min.
6. Se agregaron 20 ml de NaOH 0,2 M, SDS 1% (P/V), y se homogeneizó adecuadamente para lograr la lisis celular en hielo durante 5 min.
7. Se adicionaron 15 ml de Acetato de potasio 5 M (pH 5,2) a 4°C (Solución de Neutralización), se homogeneizó y se incubó en hielo durante 10 min.
8. Se centrifugó 10 min a 4°C a 2.500 *g*.
9. Se filtró el sobrenadante con papel de filtro, en tubos cónicos de 50 ml. Se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol (Baker, Estados Unidos), incubando 15 min a -70°C.
10. Se centrifugó 20 min a 2.500 *g*, a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
11. Se resuspendió el *pellet* en 1 ml de etanol 80% (V/V) en TN (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) y se transfirió a un tubo Eppendorf. Se centrifugó 1 min a 13.000 *g*.
12. Se disolvió el *pellet* obtenido en 1 ml de LiCl (Merck) 2 M con el propósito de precipitar el ARN. Se mantuvo en hielo por 60 min.
13. Se centrifugó la solución obtenida por 2 min a 13.000 *g* y se transfirió el sobrenadante a dos tubos Eppendorf nuevos (mitad de sobrenadante a cada tubo).
14. Se agregaron 250 µl de fenol y luego 250 µl de cloroformo a cada tubo, se agitó y centrifugó la mezcla 2 min a 13.000 *g*. Se tomó la fase acuosa superior de ambos tubos y se juntó en un único tubo.

15. Se precipitó con 1 volumen de isopropanol, se agitó y se mantuvo 15 min a -70°C . Se centrifugó 15 min a 4°C a 13.000 g y se lavó el *pellet* con 50 μl de etanol 80% (V/V) en TN, centrifugando 5 min.

16. Se disolvió el *pellet* en 500 μl de TE (Tris-HCl 25 mM; NaCl 100 mM, pH 8,3) 0,5 X conteniendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de ARNasa A (Promega) y se incubó 60 min a 37°C , para eliminar restos de ARN.

17. Se repitió el paso 14.

18. Se agregaron a la fase acuosa 50 μl de acetato de sodio 3 M (pH 7.0) y 900 μl de isopropanol. Se agitó e incubó 15 min a -70°C , de modo de precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó 15 min a 13.000 g a 4°C y se lavó el *pellet* generado con 50 μl de etanol 80% (V/V) en TN.

19. Se dejó secar a 37°C en baño seco termostatzado.

20. Se disolvió el *pellet* en 300 μl de agua estéril.

Por último, se evaluó la integridad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa y su concentración y pureza mediante lectura espectrofotométrica.

2.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Se midió la absorbancia de las muestras a $\lambda=260\text{ nm}$ (longitud de onda de máxima absorbancia para el ADN) y $\lambda=280\text{ nm}$, en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Healthcare, Estados Unidos) y se calculó la concentración y pureza de los plásmidos, según las siguientes ecuaciones (Ecuaciones 1 y 2) [132].

$$\text{Concentración de ADN}(\mu\text{g. ml}^{-1}) = DO(260\text{ nm}) \times 50 \frac{\mu\text{g. ml}^{-1}\text{ADN}}{DO} \times \frac{1}{\text{Dilución}} \quad (1)$$

Ya que para el ADN doble cadena una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{DO(260\text{ nm})}{DO(280\text{ nm})} \quad (2)$$

El valor de pureza debe estar comprendido en el rango entre 1,8 y 2,0. Por fuera del mismo, la solución no es considerada apta para su uso en transfección de células eucariotas, ya que posee una cantidad considerable de contaminantes (proteínas, reactivos utilizados en la extracción, entre otros) que podrían afectar la eficiencia de la misma.

2.5. Digestiones enzimáticas

Las digestiones con endonucleasas de restricción (Promega) se realizaron respetando los medios y condiciones recomendados por el fabricante. En todos los

casos, la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37°C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada μg de ADN, en un volumen final de 20 μl . Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis y/o purificación.

2.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la preparación del gel:

1. Se pesó 1 g de agarosa (Biodynamics SRL, Argentina) y se disolvió en 100 ml de buffer TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8), calentando en horno microondas.
2. Se dejó enfriar la solución hasta 60°C y se adicionaron 50 μL de SYBR *Safe DNA gel Stain* (Invitrogen).
3. Se dejó solidificar el gel sobre el soporte, a resguardo de la luz, utilizando un peine de tamaño deseado.

Para llevar a cabo la electroforesis:

4. Se prepararon las muestras de ADN con buffer de siembra 10 X [Glicerol (Cicarelli) 30% (V/V); azul de bromofenol (Sigma) 0,25% (P/V)] y se las sembró en sus respectivas calles.
5. Se incluyó un marcador de peso molecular para estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados (*Bench Top 1kpb DNA Ladder*, Promega).
6. Se aplicó un voltaje de 80 V durante 30 min o hasta que el frente de corrida se desplazó la distancia requerida.
7. Se examinó el gel utilizando un transiluminador *Safe Imager* (Invitrogen) y se fotografió.

2.7. Precipitación de ADN

1. Se llevó la muestra a volumen final de 200 μl con agua autoclavada.
2. Se adicionó un volumen de acetato de sodio 3 M equivalente al 10% del volumen y se agitó.
3. Se agregaron entre 2 y 3 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -70°C durante 20 min.
4. Se centrifugó a 13.000 *g* durante 15 min a 4°C y se lavó con 200 μl de etanol 70% (V/V) frío.
5. Se centrifugó nuevamente a 13.000 *g* durante 2 min a 4°C y se secó el *pellet* en baño seco termostatzado a 37°C durante 10 min.
6. Se resuspendió el *pellet* de ADN en 50 μl de agua Milli Q autoclavada.

2.8. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa fueron purificados utilizando el *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe a continuación:

1. Se separó con bisturí la fracción de gel conteniendo la banda de interés y se colocó dentro de un tubo Eppendorf. Se agregaron 3 volúmenes de solución QG por cada volumen de gel (100 mg de gel equivalen aproximadamente a 100 μ l).
2. Se incubó durante 10 min en baño de agua a 50°C, mezclando por inversión cada 2-3 min.
3. Se transfirió la muestra a una columna de purificación (*QIAquick spin column*) dentro de su respectivo tubo colector y se centrifugó durante 1 min a 13.000 *g*.
4. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 0,5 ml de solución QG a la columna, volviendo a centrifugar de la misma manera.
5. Para lavar, se agregaron 0,75 ml de solución PE centrifugando durante 1 min a 13.000 *g*. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó de la misma manera, para descartar toda la solución PE residual.
6. Se transfirió la columna a otro tubo Eppendorf y se eluyó el ADN con 50 μ l de agua Milli Q autoclavada.
7. Se analizó una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa y se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica.

2.9. Reacciones de ligación de ADN

Para las reacciones de ligación se utilizó una determinada relación inserto/plásmido en un volumen de reacción de 20 μ l, utilizando la enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen), según el protocolo indicado por el proveedor. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 4°C. El control de plásmido religado se llevó a cabo reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua autoclavada.

Luego de la reacción de ligación, se utilizó la mezcla de reacción obtenida para transformar células *E. coli* competentes.

2.10. Preparación de células *Escherichia coli* TOP 10 competentes, por el método químico

1. A partir de un banco celular de *E. coli* TOP 10 conservado a -70°C, se realizó una estría sobre una placa de Agar LB y se incubó durante 16-20 h a 37°C.
2. Se escogió una colonia y se inocularon con ella 5 ml de caldo LB (cultivo *starter*), incubando a 37°C durante 18 h con agitación a 180 rpm.

3. Se realizó un subcultivo tomando 500 μ l del cultivo *starter* a 50 ml de medio LB y se cultivó durante 3 h a 37°C y 180 rpm o hasta lograr una DO de 0,6.

4. Se incubó el cultivo en baño de hielo durante 10 min y luego se recuperó por centrifugación a 2.500 *g* por 10 min a 4°C. A partir de este punto todos los procedimientos se efectuaron en baño de hielo.

5. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en 500 μ l de medio LB frío.

6. Se agregaron 2,5 ml de *storage solution* [medio LB conteniendo DMSO 5% (V/V); PEG 10% (P/V) (MW 8.000, Sigma); MgCl₂ 1% (P/V), esterilizado por filtración con membrana de 0,22 μ m] y se mezcló completamente mediante agitación suave.

7. Finalmente, se dispensaron alícuotas de 100 μ l en criotubos (Greiner Bio-One) fríos, y se conservaron inmediatamente a -70°C.

8. Se realizó un control de las células competentes preparadas, para asegurar la continuidad en la esterilidad del cultivo y estimar la eficiencia de transformación. Para esto, se descongelaron 2 criotubos y se los transformó con 100 ng de un vector plasmídico conocido (control positivo) y sin ADN (control negativo). Las células competentes serán utilizadas sólo cuando la placa del control negativo no muestre desarrollo de colonias y cuando se obtenga buena eficiencia de transformación en el control positivo.

2.11. Transformación de células competentes

1. Se retiró un criovial de células competentes del *freezer* y se mantuvo en hielo.
2. Se agregó al tubo la muestra de ADN a ser transformada y se incubó 30 min en baño de hielo.

3. Se transfirió a baño termostatzado a 42°C durante 2 min y se colocó inmediatamente en baño de hielo.

4. Se agregaron 700 μ l de medio LB y se incubó 60 min a 37°C.

5. Luego, se centrifugó a 2.500 *g* durante 5 min.

6. Se descartaron 600 μ l de sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en el volumen remanente de medio de cultivo.

7. Se distribuyó homogéneamente sobre una placa conteniendo Agar-LB-Antibiótico y se incubó durante 16-20 h a 37°C.

2.12. Criopreservación de cepas bacterianas

1. Se cultivaron durante 18 h a 37°C en medio LB-Antibiótico (en el caso de bacterias recombinantes).

2. Posteriormente, se tomaron 800 μl del cultivo fresco y se trasvasaron a un criovial (Greiner Bio-One).

3. Se adicionaron 200 μl de glicerol 50% (V/V) estéril (Cicarelli), homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol.

4. Se conservaron a -70°C .

2.13. Revitalización de cepas bacterianas

1. Se tomó una pequeña porción de material criopreservado con un ansa o *tip* desde la superficie del cultivo celular congelado y se inoculó en medio LB, en caso de bacterias no transformadas, o en medio LB-antibiótico, para bacterias recombinantes.

2. Se incubó a 37°C durante 16 h.

3. Se utilizó el cultivo para el fin necesario [133].

2.14. Estrategia de clonado para la generación de los vectores de expresión

2.14.1. Esquema y descripción del plásmido de expresión eucariota pLV-PLK

El plásmido empleado para expresión en células eucariotas fue el vector lentiviral pLV-PLK (Figura 11). Este vector se caracteriza por poseer:

- un origen de replicación bacteriano (ORI);
- un gen que otorga resistencia a ampicilina;
- un gen de resistencia a puomicina, que codifica el gen de la enzima Puomicina N-acetiltransferasa, dirigido por el promotor SV40;
- el promotor CMV (CMVp), ubicado corriente arriba del sitio de múltiple clonado;
- la presencia de una región RRE, altamente estructurada, que actúa como sitio de unión para la proteína Rev, la cual permite el transporte de los ARNs sin procesar o parcialmente procesados desde el núcleo al citoplasma;
- una región PBS (sitio de unión de cebadores), que actúa como cebador para la transcriptasa reversa, en el momento de iniciar la síntesis de la hebra (-) del ADN viral;
- la secuencia cPPT (segmento polipurina central), que actúa como cebador de la hebra (+) en la síntesis del ADN viral;
- WPRE, un elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota;

- una señal de empaquetamiento (Psi), una secuencia corta y altamente estructurada requerida para la incorporación del ARN genómico en el interior de las partículas virales.

Todas las regiones necesarias para la generación de los vectores lentivirales se encuentran comprendidas entre las repeticiones terminales largas (5' LTR y 3' LTR).

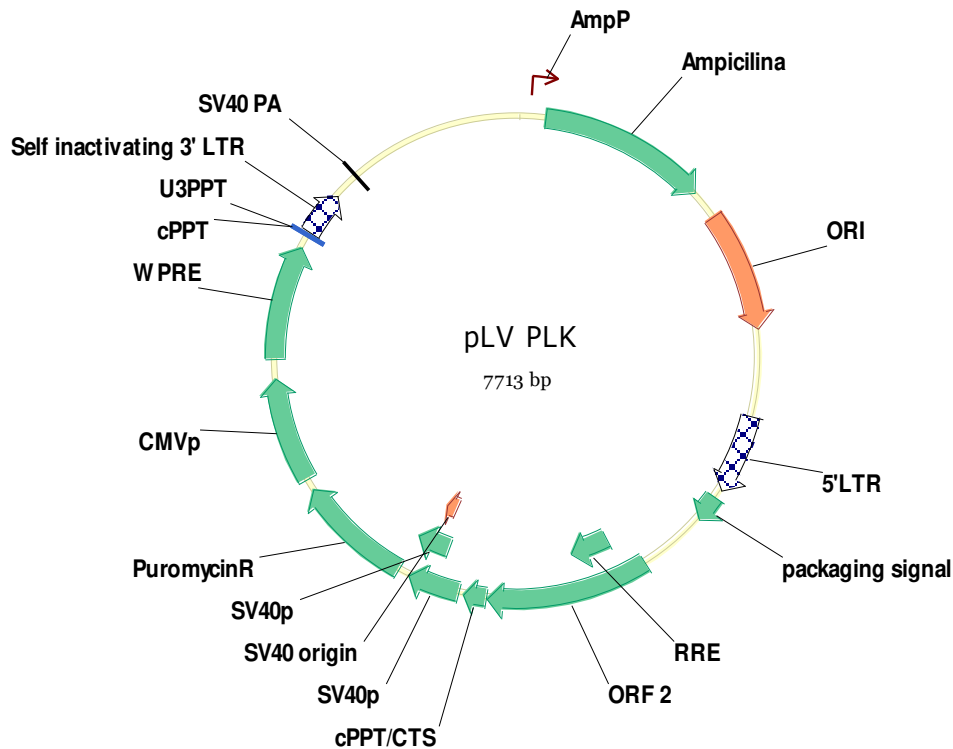


Fig. 11. Representación esquemática del vector lentiviral de transferencia y expresión eucariota pLV-PLK.

2.14.2. Obtención del plásmido pLV-EF1 α -EPO

Para generar el vector de expresión pLV-EF1 α -EPO se empleó el plásmido pLV-CMV-hEPO existente en el laboratorio. Éste fue digerido con las enzimas *NdeI* y *BamHI* (Promega) como se indica en el punto 2.5 de esta sección, con el objetivo de separar la secuencia de ADN del promotor viral CMV del vector pLV-CMV-hEPO. Al mismo tiempo, se digirió el vector pLV-EF1 α con las mismas enzimas para obtener la secuencia del promotor EF1 α . La identidad de los productos de digestión se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 2.6.). A partir de dicho gel, las bandas de ADN digerido se separaron y se purificaron las secuencias correspondientes al vector digerido pLV-hEPO sin el promotor CMV y, por otro lado, la secuencia del promotor EF1 α , siguiendo el protocolo que se detalla en la sección 2.8.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN de interés purificados, se realizó la ligación de los mismos utilizando la enzima T4 DNA Ligasa. Las ligaciones se incubaron

a 16°C durante 18 h. La proporción de vector más inserto (V+I) utilizada en las ligaciones fue de 1:2, respectivamente. También se realizó un control de vector religado (V_R).

Transcurrido dicho tiempo, se utilizó la totalidad de la mezcla de ligación para transformar células competentes *E. coli* Top 10, como se describe en la sección 2.11.

A continuación se tomaron las colonias obtenidas en la placa de V+I y se analizó la presencia del inserto en los mismos mediante reacción de PCR de colonias (apartado 2.15). La presencia del inserto en los clones que resultaron positivos en la PCR se corroboró mediante minipreparación de ADN plasmídico seguida por digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*. En la Figura 12 se muestra un esquema de la construcción de pLV-EF1α-EPO.

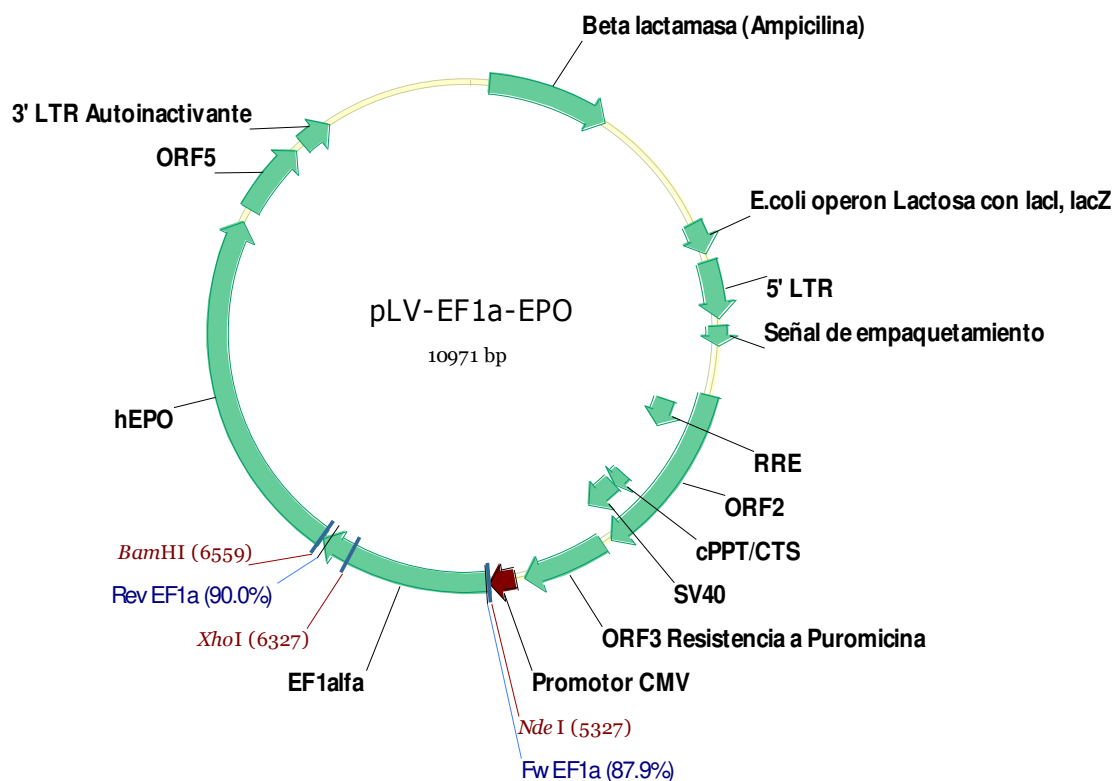


Fig. 12. Representación esquemática del vector lentiviral pLV-EF1α-EPO.

2.14.3. Obtención del plásmido pLV-EF1α-GFP

Para generar el vector de expresión pLV-EF1α-GFP se empleó el plásmido pLV-CMV-GFP existente en el laboratorio. Éste fue digerido con las enzimas *NdeI* y *BamHI* como se indica en el punto 2.5 de esta sección, con el objetivo de separar la secuencia de ADN del promotor viral CMV del vector. Al mismo tiempo, se digirió el vector pLV-EF1α con las mismas enzimas para obtener la secuencia del promotor EF1α. A continuación, se analizó la identidad de los productos de digestión, se purificaron el vector y el inserto, y con ambos se efectuó una reacción de ligación y posterior transformación, tal como se indicó para la obtención del plásmido pLV-EF1α-EPO.

Seguidamente, se seleccionaron colonias individuales de la placa de transformación V+I y se incubó cada una de ellas en 5 ml de medio LB-Ampicilina. Los cultivos se incubaron con agitación a 37°C durante 16-20 h. Luego, se purificó ADN plasmídico de las colonias recombinantes, utilizando la técnica tradicional de minipreparación de ADN (sección 2.3.1.). Las minipreparaciones de los clones seleccionados fueron digeridas con enzimas de restricción (*XhoI* y *NdeI*) para confirmar la presencia del inserto correspondiente. En este caso, la digestión con ambas enzimas permitiría la liberación de un fragmento de 1.000 pb. En la Figura 13 se muestra un esquema de la construcción de pLV-EF1 α -GFP.

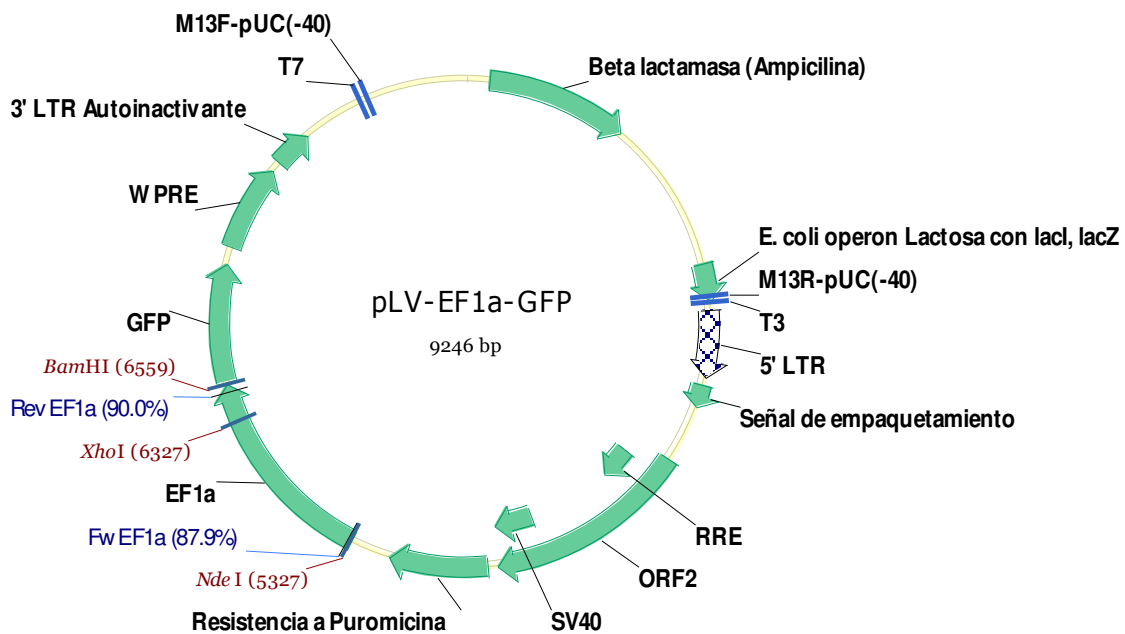


Fig. 13. Representación esquemática del vector lentiviral pLV-EF1 α -GFP.

Una vez caracterizados ambos vectores de expresión, se realizaron purificaciones de ADN plasmídico a gran escala (maxipreparación) descrita en la sección 2.3.2, de forma de obtener los plásmidos de expresión con alto grado de pureza, y en cantidad suficiente para realizar posteriormente la transfección de las células eucariotas y obtener vectores lentivirales.

2.15. PCR de colonias

Con la finalidad de analizar rápidamente un número elevado de clones recombinantes se efectuaron reacciones de PCR a partir de colonias de bacterias transformadas.

Para ello las colonias se picaron y se dispensaron en tubos Eppendorf conteniendo 10 μ l de agua estéril. Luego se las desnaturizó por calentamiento a 95°C

durante 5 min y se analizaron por PCR 5 µl de esta suspensión. La reacción se preparó de la siguiente manera (Tabla 6):

Tabla 6. Preparación de la mezcla de reacción para las PCR de colonias

Reactivo	Concentración final	Volumen (por tubo de reacción)
<i>GoTaq Buffer 5X (Promega)</i>	1X	3,3 µl
<i>dNTPs 10 mM (Promega)</i>	0,3 mM cada uno	0,5 µl
<i>Oligonucleótidos:</i>		
<i>Fw EF1α (10 µM)</i>	0,3 µM	0,5 µl
<i>Rev EF1α (10 µM)</i>	0,3 µM	0,5 µl
<i>Muestra (5 a 200 ng)</i>		5,0 µl
<i>GoTaq Polymerase (Promega)</i>	1-2,5 U	0,2 µl
<i>Agua autoclavada</i>		6,5 µl

Primer Fw EF1α: 5'- CGCATTAATAGATCTGTGCCCGTCAGTGGGCAG-3'

Primer Rev EF1α: 5'- GCGGCTAGCTCACGACACCTGAAATGGAAG-3'

Además, se realizó un control negativo sin el agregado de muestra y un control positivo (pLV-EF1α). La reacción se llevó a cabo en termociclador (Biometra, Alemania) de acuerdo con el siguiente programa:

Paso 1: Desnaturalización inicial:	94°C	1 min
Paso 2: Desnaturalización:	94°C	1 min
Paso 3: <i>Annealing</i>	62°C	0,5 min
Paso 4: Extensión	72°C	1 min
Volver al paso 2:	30 veces	
Paso 5: Extensión	10°C	10 min
Paso 6: Conservación	4°C	

El producto de PCR obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

3.1. Medios de cultivo y suplementos para células animales

Todos los medios de cultivos utilizados para el cultivo de células animales fueron preparados utilizando agua Milli Q y esterilizados por filtración, utilizando dispositivos tipo Steritop (Merck Millipore) con membranas de 0,22 µm de tamaño de poro. Cada medio preparado queda en cuarentena durante 72 h mientras se llevan a cabo los controles microbiológicos y se conservan a 4°C al resguardo de la luz. A continuación se detallan los medios de cultivo empleados:

3.1.1. DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

Este medio se utilizó para el cultivo de células HEK293T, suplementado con SFB 10% (V/V).

- DMEM (Gibco) 13,37 g/l
- NaHCO₃ (Gibco) 1,50 g/l
- Piruvato de sodio (Gibco) 0,11 g/l
- Gentamicina (Gibco) 0,05 g/l

3.1.2. IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)

Este medio altamente enriquecido se empleó para el cultivo de MNCs y HSPCs, con suplementación variable.

- IMDM (Gibco) 17,67 g/l
- NaHCO₃ 3,024 g/l
- Gentamicina 0,05 g/l

3.1.3. RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*)

Este medio fue empleado para el cultivo de la línea celular TF-1, suplementado con SFB 10% (V/V) y GM-CSF (Gema Biotech) 2 ng/ml.

- RPMI 1640 10,4 g/l
- NaHCO₃ 2 g/l
- Gentamicina 0,05 g/l

3.1.4. DMEM/HAM'S F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (Ham)*)

Este medio fue utilizado para el cultivo del clon celular CHO-K1, suplementado con SFB 5% (V/V).

- DMEM/F12 (Gibco) 12 g/l
- NaHCO₃ 2,44 g/l
- Gentamicina 0,05 g/l

3.1.5. Suero fetal bovino (SFB)

Para suplementar los medios de cultivo utilizados en cultivos en adherencia y suspensión se adicionó a cada medio basal la concentración de SFB deseada. Los SFB utilizados (PAA Laboratories, Austria) son de calidad certificada y previo a su uso son descomplementados por incubación en baño de agua termostático a 56°C durante 30 min.

3.1.6. Plasma Fresco Congelado (PFC)

Para suplementar los cultivos en suspensión de HSPCs se adicionó PFC al medio IMDM. El PFC fue preparado en el laboratorio a partir de sangre periférica, como se indica a continuación:

1. Se recolectó SP completa en un tubo cónico conteniendo 500 UI de heparina bovina (Rivero, Argentina). Se homogeneizó suavemente.
2. Se centrifugó la sangre a 1.700 g durante 5 min a 20°C.
3. Se tomó la fase superior correspondiente al plasma rico en plaquetas (PRP) y se centrifugó a 4.800 g durante 5 min a 4°C, para eliminar las plaquetas del plasma.
4. Se incubó en baño de agua a 56°C durante 30 min para lograr la inactivación del complemento.
5. Se almacenó a -20°C hasta su uso, pudiendo mantenerse en estas condiciones hasta 1 año.

3.1.7. Tripsina

- Tripsina (Gibco) 0,05% (P/V).
- EDTA 0,02% (P/V).

Preparado en buffer PBS [KH_2PO_4 (Cicarelli) 0,6 g/l; NaHPO_4 (Cicarelli) 0,78 g/l; NaCl (Cicarelli) 8,8 g/l; pH 7,4].

Se respetó una relación de aproximadamente 50 μl de solución de tripsina-EDTA por cada cm^2 de superficie.

3.1.8. Medio semisólido con metilcelulosa HSC-CFU

Estos medios se emplean para la enumeración de HSPCs como unidades formadoras de colonias (CFU). Los ensayos de HSPCs CFU constituyen una alternativa al co-cultivo con células estromales, ya que el medio semisólido imita la matriz extracelular medular y permite la proliferación y diferenciación *in vitro* de las HSPCs. Las variantes de medio con metilcelulosa empleadas fueron las siguientes:

3.1.8.1. HSC-CFU básico (Miltenyi Biotec, Alemania)

Este medio no contiene citoquinas y por lo tanto permite la adición de factores de crecimiento y citoquinas a elección.

- IMDM
- L-Glutamina 2 mM
- Metilcelulosa 1% (P/V)
- SFB 30% (V/V)
- Albúmina de suero bovina 1% (P/V)
- 2-mercaptoetanol 10^{-4} M

3.1.8.2. HSC-CFU completo con EPO

- IMDM
- L-Glutamina 2 mM
- Metilcelulosa 1% (P/V)
- SFB 30% (V/V)
- Albúmina de suero bovina 1% (P/V)
- 2-mercaptoetanol 10^{-4} M
- SCF 50 ng/ml
- GM-CSF 20 ng/ml
- G-CSF 20 ng/ml
- IL-3 20 ng/ml
- IL-6 20 ng/ml
- Eritropoyetina 3 UI/ml

3.2. Líneas celulares

3.2.1. HEK293T/17 (ATCC, CRL-11268)

Es un clon que deriva de la línea celular HEK293, establecida a partir de riñón de embrión humano por Graham en 1977 [134]. El clon 293T/17 fue modificado para generar la expresión del antígeno T del virus SV40. Durante su cultivo en adherencia se utilizó medio DMEM suplementado con SFB 10% (V/V). Se empleó para el ensamblado de vectores lentivirales.

3.2.2. TF-1

La línea celular TF-1 fue establecida por Kitamura y col. en 1987 [135] a partir de una muestra de médula ósea de un individuo con pancitopenia severa. Esta línea tiene la habilidad de responder a una variedad de citoquinas. Fenotípicamente, las células TF-1 son CD34⁺CD38⁺. Debido a esta expresión constitutiva del marcador de superficie CD34, esta línea celular se empleó para la titulación de anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromo Anti CD34-PE (BD Biosciences) y Anti CD71-APC (BD Biosciences).

3.2.3. CHO-K1

La línea celular CHO-K1 [136] fue obtenida de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC; Pergamino, Argentina). Es un clon de la línea celular CHO derivada de ovario de hámster chino adulto. Se empleó para la titulación de anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromo Anti-CD34-PE y Anti-CD71-APC, como control de células que no expresan dichos marcadores de superficie (control negativo).

3.3. Obtención de células para cultivos primarios

3.3.1. Obtención de células mononucleares (MNCs) a partir de sangre periférica humana (SP) o sangre de cordón umbilical humana (SCU)

El uso de muestras de sangre fue aprobado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, el Comité de Ética en Investigación del Hospital José María Cullen y Comité Provincial de Bioética (Provincia de Santa Fe).

Las muestras de SCU fueron obtenidas por médicos especialistas a partir de partos a término atendidos en el Hospital José María Cullen, en el Sanatorio Mayo y en la Clínica de Ginecología y Maternidad Central (Santa Fe, Argentina), mediante punción de la vena umbilical en condiciones asépticas. Las madres previamente firmaron un consentimiento informado, del mismo modo que los donantes de SP. La recolección se efectuó en bolsas destinadas a tal fin: en el caso de la SCU se emplearon las bolsas simples S-90DB (Rivero) con 35 ml de solución anticoagulante CFDA-1 (ácido cítrico anhidro 0,3 g/l; citrato de sodio dihidratado 2,63 g/l; fosfato monobásico de sodio monohidratado 2,22 g/l; dextrosa monohidratada 31,9 g/l; adenina 0,275 g/l), para hasta 250 ml (265 g) de sangre, que se emplea para la recolección de sangre rica en células madre del cordón umbilical y placenta. Para la recolección de SP se emplearon las bolsas simples S-91 (Rivero) con 63 ml de CFDA-1, para hasta 450 ml (477 g) de sangre o tubos cónicos con heparina, dependiendo del volumen recolectado.

Cuando se preparan HSPCs se puede partir de sangre completa o de células mononucleares (MNCs). Sin embargo, un pre-enriquecimiento de MNCs es altamente recomendado ya que mejora la recuperación de las HSPCs, que son poco frecuentes. Las MNCs pueden ser aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad [33].

En la centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Paque, la sangre tratada con anti-coagulante y diluida es depositada sobre una capa de solución de Ficoll y centrifugada. Durante la centrifugación, los eritrocitos y granulocitos sedimentan a través del Ficoll hacia la capa inferior. Los linfocitos de menor densidad, conjuntamente con otras células de sedimentación lenta como plaquetas y monocitos, son retenidos en la interfase entre el plasma y el Ficoll, desde donde pueden ser recolectadas y lavadas para remover las plaquetas y el Ficoll residual o el plasma [33].

Así, dentro de las 24 h luego de la recolección de sangre, se obtuvieron las MNCs y se criopreservaron. El protocolo empleado para el enriquecimiento en MNCs fue el siguiente:

1. La sangre completa se distribuyó en tubos cónicos de 50 ml y se diluyó $\frac{1}{2}$ con solución fisiológica (NaCl 9 g/l). La dilución se efectuó para reducir la agregación de eritrocitos.

2. Esto se centrifugó a TA durante 20 min. a 200 g con aceleración/desaceleración mínima.

3. Luego, la fase superior, correspondiente al PRP fue descartado y el volumen restante de sangre se diluyó nuevamente $\frac{1}{2}$ con solución fisiológica.

4. El paso 2. de centrifugación se repitió y nuevamente se descartó el PRP.

5. Se tomó la interfase entre el PRP y los GRs (ubicados en el fondo del tubo), denominada *buffy coat*, y se transfirió a nuevos tubos cónicos.

6. Esta fracción se llevó a volumen con solución fisiológica (en caso de ser necesario) y se depositó sobre ficoll (Ficoll-Paque, GE Healthcare), utilizando una proporción sangre:ficoll, 2:1).

7. Esto se centrifugó durante 35 min a 400 g a temperatura de 20°C (está descrito que esta temperatura genera resultados óptimos).

8. Se recogió la capa de células mononucleares, ubicada entre el ficoll y la fase superior de plasma y se llevó a 10 ml con solución fisiológica o PBS.

9. Esta suspensión se centrifugó a 200 g durante 10 min con aceleración/desaceleración mínima, de modo de eliminar la proporción de ficoll que se recogió conjuntamente con la capa de MNCs.

10. Se retiró la solución de lavado y se resuspendieron las células en solución fisiológica o buffer equivalente para efectuar recuento celular.

11. A partir del recuento celular se calculó la recuperación celular como se indica en la Ecuación 3:

$$\text{Recuperación celular (MNCs/ml de sangre)} = \frac{X_v \left(\frac{\text{cél.s.}}{\text{ml}} \right) \times \text{volumen de suspensión celular (ml)}}{\text{volumen de sangre (ml)}} \quad (3)$$

donde X_v es la concentración de células viables

12. Luego del recuento, se repitió el paso 9. de centrifugación.

13. En caso de ser utilizadas inmediatamente, las células se resuspendieron en el medio de cultivo apropiado de acuerdo a la experiencia a efectuar (por lo general, medio IMDM suplementado) o en buffer MACS para realizar purificación inmunomagnética. En caso de ser criopreservadas, se procedió como se indica en el inciso 3.6 de esta sección.

3.3.2. Purificación de HSPCs CD34⁺

El enriquecimiento de HSPCs a partir de MNCs de SP o de SCU se basa en la expresión de ciertos antígenos de superficie, tales como CD34 y CD133, o en la ausencia de expresión de antígenos específicos de linaje. Para determinar la eficiencia de los procesos de enriquecimiento, la recuperación celular se calculó como se indica en la ecuación 4:

$$\text{Recuperación celular} \left(\frac{\text{cél.}}{10^6 \text{MNCs}} \right) = Xv \text{ retenidas} \left(\frac{\text{cél.}}{\text{ml}} \right) \times \frac{\text{volumen de suspensión (ml)} \times 10^6}{\text{número de MNCs viables iniciales}}$$

(4)

3.3.2.1. Aislamiento de HSPCs mediante *sorting* celular por FACS (Clasificación Celular Activada por Fluorescencia)

Existen dos tipos de citometría de flujo, la citometría de clasificación o *sorting* y la citometría no-*sorting*. El tipo no-*sorting* puede interpretar la dispersión de luz y la emisión de fluorescencia, mientras que el tipo *sorting* también permite la clasificación de partículas. Los clasificadores celulares activados por fluorescencia (FACS) son citómetros de flujo que tienen la capacidad de separar células marcadas con fluorescencia a partir de una población celular mixta [137]. Así, las células con características predefinidas (un parámetro único o una combinación de varios parámetros elegidos mediante una computadora) pueden ser capturadas mediante separación electrostática y, una vez recolectadas, pueden ser empleadas para análisis posteriores como microscopía o estudios bioquímicos o funcionales. En esta metodología, las células son inyectadas en una boquilla o *nozzle*, y forman una corriente de gotas regulares mediante la aplicación de vibración en la boquilla. Las gotas pasan a través de uno o más haces láser, son cargadas mediante un electrodo al mismo tiempo y luego son desviadas de acuerdo a las cargas que poseen hacia alguna de las placas de deflexión o, si no poseen cargas, son recolectadas en el contenedor de desecho (Figura 14).

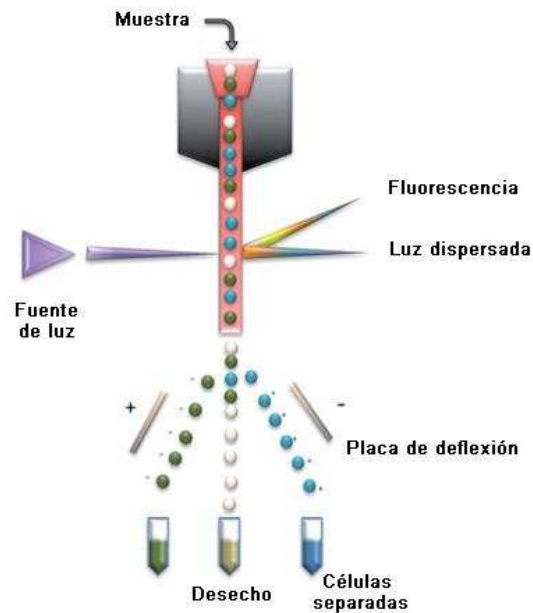


Fig. 14. *Sorting* celular mediante deflexión de gotas (figura modificada de Adan y col., 2017 [137]).

Para la selección celular por FACS, empleando el equipo FACSAria III (BD Biosciences), se partió de muestras de MNCs de SCU. Se efectuaron dos separaciones celulares utilizando MNCs de dos muestras de SCU diferentes. El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Se descongelaron crioviales con MNCs de SCU como se indica en el punto 3.6. de esta sección, sumergiendo los crioviales en agua a 37°C.

2. Se efectuó recuento celular como se indica en el punto 3.5 de esta sección. Las células descongeladas se lavaron en IMDM basal mediante dilución y centrifugación a 300 *g* durante 10 min.

3. El *pellet* celular se resuspendió en un volumen adecuado de IMDM-SFB 10% (V/V) y se incubó ON a 37°C en estufa gaseada.

4. Inicialmente se marcó una proporción de las MNCs descongeladas para realizar el análisis de fluorescencia previo al *sorting* celular. Para ello se tomaron 500.000 células por tinción/control, obteniéndose los siguientes tubos para su análisis por citometría de flujo:

- Control negativo (sin marcar)
- Control de compensación anti hCD45-PE-Cy5
- Control de compensación anti hCD34-FITC
- Anti hCD45-PE-Cy5 + Anti hCD34-FITC

5. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 200 *g* durante 10 min y se resuspendieron en 50 μ l/tubo de *Buffer* de Tinción para Citometría (BTC) que consiste en PBS; BSA 1% (P/V); EDTA 2 mM.

6. Cada suspensión se marcó con 7 μ l del anticuerpo correspondiente (BD Biosciences) mediante incubación a 4°C en oscuridad durante 20 min.

7. Luego de la incubación, los tubos se lavaron con 1 ml de PBS, centrifugando a 200 *g* 10 min y los *pellets* celulares se resuspendieron en 500 μ l de PBS.

8. Las muestras se analizaron en citómetro FACS Aria III para establecer los parámetros de voltaje y compensación adecuados. En el gráfico de puntos de fluorescencia de FITC vs. PE-Cy5, se seleccionaron los cuadrantes correspondientes a las poblaciones CD34⁺CD45^{+/-dim} y CD34⁺CD45⁻, las cuales fueron separadas, *a posteriori*, en los tubos 2 y 1, respectivamente.

9. Marcación fluorescente de la fracción celular remanente para *sorting*:

9.a. La suspensión celular se centrifugó a 200 *g* durante 10 min para eliminar el medio de cultivo y el *pellet* celular se resuspendió en 100 μ l de BTC.

9.b. Se adicionaron 30 μ l de Anti hCD34-FITC y 30 μ l de Anti hCD45-PE-Cy5 y se incubó en oscuridad a 4°C durante 25 min.

9.c. La suspensión se lavó con 1 ml de PBS, centrifugando a 200 *g* 10 min y el *pellet* celular se resuspendió en 10 ml de PBS.

10. Luego de la preparación del equipo para *sorting*, las células se separaron y se recolectaron en 1 ml de IMDM-SFB 10% (P/V) con antibióticos-antimicótico (penicilina-streptomina-anfotericina) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

11. En los casos en los que fue posible, debido a la recuperación de un número suficiente de células en los tubos, se realizó recuento celular y un análisis citométrico post-*sorting* para evaluar la pureza de la fracción recuperada, empleando la misma marcación y configuración del equipo que se empleó para el *sorting*.

3.3.2.2. Aislamiento de HSPCs mediante selección inmunomagnética positiva de células CD34⁺

En este trabajo la purificación se realizó utilizando el *Kit MicroBead CD34* (Miltenyi Biotec, Inc.). Este sistema es un método de separación magnética, que permite aislar células en suspensión de acuerdo con sus antígenos de superficie, puesto que las células de interés se marcan con micro-perlas paramagnéticas que poseen inmovilizados en su superficie anticuerpos específicos (CD34 QBEND/10) para tales antígenos. Una vez marcadas las células, éstas se pasan a través de una columna que se encuentra ubicada junto a un imán (*MACS Separator*, Miltenyi Biotec, Inc.). De este modo, las células marcadas magnéticamente quedan retenidas en la columna y se separan del resto de las células no marcadas, las cuales atraviesan

la columna sin ser retenidas. Posteriormente, la columna se quita del campo magnético y la fracción retenida se eluye en un recipiente apropiado (fracción de células retenidas). De este modo, ambas fracciones (tanto la marcada como la no marcada) pueden ser completamente recuperadas (Figura 15). Para llevar adelante la separación, se llevó a cabo el procedimiento indicado debajo. Cabe aclarar que este procedimiento es el que se encontró más apropiado luego de evaluar diversos protocolos de Separación Inmunomagnética (SI), separación celular mediada por la tecnología FACS o una combinación de ambas tecnologías. Así, se estableció el protocolo más apropiado en función de su capacidad de permitir una recuperación adecuada de fracciones celulares CD34⁺ con elevada pureza (>80%) y buena viabilidad celular:

1. Se descongelaron viales conteniendo células mononucleares, de acuerdo al protocolo indicado más adelante. En este caso el medio de descongelado y lavado de las células fue IMDM-SFB 10% (V/V).

2. En caso de observar agregación celular, se centrifugó la suspensión a 300 g durante 10 min y se resuspendió el pellet en 1 ml de IMDM-SFB 10% (V/V)-Benzonasa (EMD Millipore™ Novagen™) 6,25 UI/ml y la suspensión se incubó a 37°C durante 30 min, hasta observar reducción de la agregación. La Benzonasa es una endonucleasa que degrada tanto ADN como ARN. Ésta se adiciona ya que la agregación celular puede ser problemática cuando se trabaja con células criopreservadas.

3. Luego, se centrifugó la suspensión a 300 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó una vez con PBS estéril pH 7,2, centrifugando en iguales condiciones.

4. El *pellet* se resuspendió en medio IMDM-SFB 10% (V/V), para efectuar recuento celular.

5. En general, la densidad celular se ajustó a aproximadamente 1x10⁶ céls./ml en el mismo medio de cultivo y se incubó la suspensión ON a 37°C en estufa gaseada.

6. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la muestra (hasta 10⁸ células totales) en 300 µl de *Buffer* MACS [PBS; EDTA 2 mM; BSA (Sigma) 0,5% (P/V) pH 7,2 desgasificado frío].

Aclaración: el buffer se desgasificó ya que la presencia de burbujas puede causar la obstrucción de la columna y una concomitante reducción de la eficacia de la separación inmunomagnética. Asimismo se emplearon soluciones frías para evitar la agregación de los anticuerpos, ya que pueden formarse parches (complejos precipitados) de anticuerpos si entre ellos existen reacciones cruzadas. Adicionalmente, esto resultaría en una distribución irregular del anticuerpo en la superficie celular.

7. Se adicionó a esto 100 μl de *FcR Blocking Reagent* (IgG humana, que actúa inhibiendo la unión inespecífica de las microperlas mediada por receptores de Fc) y 100 μl de Microperlas anti-CD34.

Aclaración: en aquéllos casos en los que el número celular total fue superior a 10^8 MNCs, se escalaron los volúmenes de buffer y de reactivos (por ejemplo, para 2×10^8 MNCs se emplearon 600 μl de buffer y 200 μl de cada reactivo de marcación).

8. La suspensión se incubó a 4°C en oscuridad durante 30 min.

9. Se adicionaron 10 ml de *Buffer MACS* y se centrifugó a 300 g durante 10 min. La suspensión se resuspendió en 0,5 ml de *Buffer MACS*

10. Por otro lado, se preparó la columna MACS MS con 0,5 ml de *Buffer MACS* y se colocó la muestra en el reservorio de la columna, evitando que ésta se seque entre paso y paso. La fracción no retenida se recolectó.

Aclaración: las columnas MACS MS poseen una capacidad de hasta 2×10^8 células totales

11. Se lavó 6 veces con 0,5 ml de *buffer MACS*

12. Se efectuó la elución de las células retenidas retirando la columna del magneto y pasando 2 veces 1 ml de *buffer MACS*, realizando presión con el émbolo al agregar *buffer* la segunda vez. Las células retenidas se recogieron en un tubo cónico de 15 ml.

13. Se realizó recuento tanto de la fracción retenida como de la no retenida.

14. Al finalizar los pasos de purificación, ambas fracciones se centrifugaron a 300 g durante 10 min, se eliminó el *buffer* sobrenadante y se resuspendieron las células en medio IMDM suplementado.

El procedimiento se representa en la Figura 15.

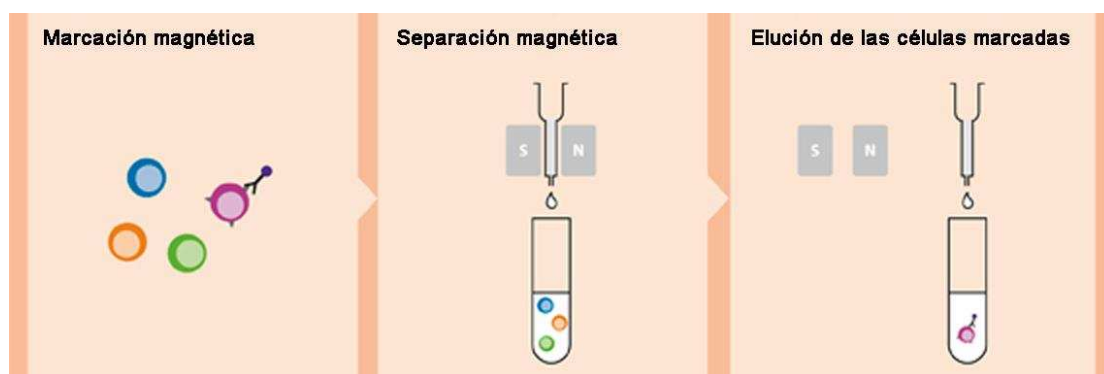


Fig. 15. Procedimiento básico de separación inmunomagnética positiva empleando el *kit* MACS (Miltenyi Biotec, Inc).

3.4. Determinación de la concentración y viabilidad de células

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con azul de tripán, un colorante

supravital [138]. Esta técnica está basada en la permeabilidad de la membrana celular a los colorantes. Las células no viables tienen alterada la permeabilidad de su membrana y por consiguiente permiten el ingreso de ciertos colorantes a su interior. Como resultado se las observa de color celeste o azul; mientras que aquellas células que se encuentran viables, mantienen intacta su membrana celular y no son permeables a dichos colorantes, motivo por el cual se las observa blancas y refringentes al microscopio óptico.

Con este fin, la suspensión celular se incubó con una solución de tripán 0,4% (V/V) en PBS durante aproximadamente 1 min y luego se sembró la misma sobre una cámara de recuento, empleando en cada caso particular la dilución conveniente según la densidad celular de la muestra. Se contaron las células vivas y muertas, contenidas en cada uno de los cuadrantes de los extremos.

La concentración de células (X), (ecuación 5) ya sean vivas o muertas, se determinó según la siguiente ecuación:

$$X \left(\frac{cél}{ml} \right) = N^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{\text{dilución}} \quad (5)$$

La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales (ecuación 6), teniendo en cuenta que la concentración de células totales (X_T) es la suma de la concentración de células muertas (X_M) y vivas (X_V).

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{X_V}{X_T} \times 100 \quad (6)$$

3.5. Criopreservación de células de mamífero

La criopreservación constituye un método eficaz de conservación de células que garantiza el mantenimiento de sus propiedades metabólicas iniciales [139,140]. La conservación en nitrógeno líquido es uno de los métodos usualmente empleado para preservar líneas celulares [141]. El daño celular inducido por la congelación y la descongelación es causado por la formación de cristales de hielo intracelulares y por efectos osmóticos [142]. La adición de un agente crioprotector, como el glicerol o el dimetilsulfóxido (DMSO) [143], y el empleo de una velocidad lenta de enfriamiento, aproximadamente 1°C por min [144], minimizan éstos efectos negativos. La conservación de las líneas y células mononucleares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de -196°C se observaron deterioros celulares mínimos [145].

Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde temperatura ambiente hasta -196°C. Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial o células derivadas de tejido sanguíneo se centrifugaron a 200 g durante 10 min a TA en una centrífuga *Neofuge 15R* (Heal Force, China). Se

descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) en una relación 90:10 (V/V), de manera de obtener una concentración de $1-2 \times 10^6$ céls./ml para el caso de las líneas celular y de $15-30 \times 10^6$ céls./ml para el caso de células de tejido sanguíneo. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 a 1,5 ml por criotubo (Greiner Bio-One), los que luego fueron guardados en un contenedor apropiado, *MrFrosty*[®] (Nalgene[®], Estados Unidos), y llevados a *freezer* de -70°C por 24 h. Este dispositivo contiene alcohol isopropílico, permitiendo que en el interior del mismo la temperatura disminuya a razón de 1°C por minuto, de manera de lograr un enfriamiento gradual de las células, que luego permita una correcta revitalización de las mismas. Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de N_2 líquido a -196°C .

3.6. Revitalización de células de mamífero

La descongelación rápida de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de N_2 líquido y se lo sumergió rápidamente en un baño de agua a 37°C . La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico que contenía 20 a 30 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 200 *g* durante 10 min a TA. Esta etapa se realizó con el objeto de diluir rápidamente el DMSO y luego eliminarlo, ya que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en un volumen de medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

3.7. Sistemas de cultivos de células

Todas las líneas celulares eucariotas se cultivaron en una incubadora a 37°C , con atmósfera de CO_2 al 5% saturada de humedad (Nuair, Estados Unidos). Según la etapa de trabajo, se utilizaron cultivos en adherencia, suspensión o medio semisólido.

3.7.1. Cultivos en adherencia y suspensión en pequeña escala

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno (Greiner Bio-One o Jet Biofil, China) de 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 1,9; 3,8 y 9,6 cm^2 por pozo, respectivamente.
- Frascos T (Greiner Bio-One o Jet Biofil) de 25, 75 y 175 cm^2 de superficie.

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm^2 de superficie, según lo establecido por Freshney [146].

Las células que presentan un crecimiento en adherencia a un sustrato, esto es, las líneas CHO-K1 y HEK293T/17, forman una monocapa. Para su propagación es necesario liberarlas del sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Cuando los

cultivos alcanzaron la confluencia, es decir, crecieron formando una monocapa en la totalidad de la superficie de los frascos o placas sobre los cuales estaban multiplicándose, se procedió a retirar el sobrenadante y lavar la monocapa celular con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina 0,05% (P/V) y EDTA 0,02% (P/V) en PBS durante 15 s a TA con el objetivo de neutralizar los factores antitripsina presentes en el SFB. Se respetó una relación de aproximadamente 50 μ l de solución de tripsina-EDTA por cada cm^2 de superficie. Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción de la solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar el tiempo necesario para cada línea celular empleada, que permita el desprendimiento completo de las células adheridas a la superficie. A continuación, se agregó el medio de cultivo correspondiente, suplementado con SFB, para neutralizar la tripsina y homogeneizar la suspensión celular de tal forma de obtener las células en suspensión.

Por otro lado, las células capaces de crecer en suspensión, es decir, las MNCs y HSPCs y la línea celular TF-1, fueron propagadas mediante dilución de la suspensión original en un mayor volumen del medio de cultivo correspondiente.

3.7.2. Cultivos en medios semisólidos en pequeña escala

Los ensayos de formación de colonias son ensayos funcionales *in vitro* para enumerar HSPCs multipotentes y comprometidas obtenidas a partir de diferentes fuentes. Las HSPCs individuales proliferan y se diferencian para producir colonias de células sanguíneas maduras, pero dichas colonias difieren en su tamaño, morfología y composición celular de acuerdo al linaje y estadio de maduración de las células que les dieron origen. Por las características metodológicas del ensayo, cada colonia deriva de un único progenitor CFU y su número provee una medida del número de CFUs funcionales y viables en la muestra (1 colonia= 1 CFU). De este modo, permite la enumeración de todos los tipos de células progenitoras mieloides y/o eritroides: eritroides (CFU-E y BFU-E), granulocitos/macrófagos (CFU-GM, CFU-G y CFU-M) y progenitores multilinaje (CFU-GEMM). Para el cultivo en este tipo de medio, la metodología empleada se indica a continuación:

1. Se descongelaron los tubos conteniendo el medio semisólido (básico o completo con EPO) a temperatura ambiente.
2. Se agitaron vigorosamente los viales de modo de homogeneizar la concentración de componentes en el mismo, y luego se dejaron los tubos en reposo durante 10 min para permitir que asciendan las burbujas de aire.
3. Se adicionaron las citoquinas en los tubos correspondientes.

4. Empleando IMDM-SFB 2% (V/V) se ajustó la concentración celular de las muestras a una concentración 10 veces mayor que aquella recomendada para el plaqueo, en general:

- MNCs de SCU: 5000- 20000 células/ 1,1 ml.
- CD34⁺ o CD133⁺: 500- 1000 células/ 1,1 ml.

5. Se adicionó el volumen de suspensión al volumen deseado de medio HSC-CFU inmediatamente previo al uso.

6. Se homogenizó vigorosamente el tubo con vórtex hasta que las células quedaron adecuadamente resuspendidas y se dejaron los tubos en reposo por 5 min para permitir que las burbujas de aire asciendan.

7. Las suspensiones se cultivaron en placas con diferente superficie según el experimento, rotando las placas gentilmente para distribuir la suspensión. Se adicionó agua Milli Q estéril en los pozos libres para evitar la deshidratación del medio.

8. Los cultivos se incubaron durante 8 a 14 d en estufa gaseada a 37°C.

4. METODOLOGÍAS PARA LA CARACTERIZACIÓN CELULAR

4.1. Inmunofenotipificación por citometría de flujo

La metodología de citometría de flujo permite la medición de características ópticas y fluorescentes de células únicas u otras partículas en una corriente de fluido, cuando ésta atraviesa una fuente de luz [137,147]. De este modo, es posible determinar el tamaño, la granulosis y las características fluorescentes de las células, las cuales pueden derivar de anticuerpos unidos o de colorantes, y así analizar y diferenciar poblaciones celulares [137,148].

La citometría de flujo tiene la capacidad de permitir análisis rápidos, cuantitativos y multi-paramétricos de poblaciones celulares heterogéneas. La inmunofenotipificación es el análisis de poblaciones heterogéneas con el propósito de identificar la presencia y proporciones de varias poblaciones de interés. Para esto se emplean anticuerpos que detectan antígenos específicos expresados por estas células, conocidos como marcadores. Estos marcadores son, en general, proteínas de membrana involucradas en la comunicación, adhesión o metabolismo celular. Sin embargo, los mismos se encuentran a menudo expresados en más de un tipo celular, por lo cual se suelen emplear estrategias que emplean dos o más anticuerpos simultáneamente. Así, la inmunofenotipificación empleando citometría de flujo se ha convertido en el método de elección para identificar y separar células dentro de poblaciones celulares complejas, mediante la evaluación de repertorios de marcadores celulares empleando varios anticuerpos acoplados con fluorocromos diferentes.

Debido a la heterogeneidad que caracteriza a las muestras de MNCs y a los cultivos celulares derivados de células multipotentes, esta metodología resulta particularmente importante para llevar adelante los análisis de eficiencia de purificación de HSPCs y de diferenciación celular realizados en el presente trabajo.

Se efectuó inmunofenotipificación de las células presentes en los cultivos en suspensión, siempre empleando un control de células sin marcar. Los anticuerpos monoclonales de ratón empleados fueron los siguientes: anti hCD34-APC/ anti hCD34-FITC/ anti hCD34-PE, anti hCD45-PE-Cy5/ anti hCD45-FITC, anti hCD71-APC y anti-hCD235a-PE/anti hCD235a-PE-Cy7 (BD Biosciences). El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Luego de realizar recuento celular, se tomó un volumen apropiado de cultivo (en general, 30.000-50.000 células totales por marcación) y se centrifugó a 300 *g* durante 10 min para eliminar el medio de cultivo.

2. El *pellet* celular se resuspendió en 50 μ l de BTC por muestra [PBS; BSA 1% (P/V); EDTA 2 mM] o Buffer de Bloqueo (BBC) [PBS; BSA 1% (P/V); suero humano 20% (V/V)] según se indique.

3. Se adicionó un volumen adecuado del anticuerpo correspondiente, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, a resultados previos o según los resultados obtenidos en el protocolo de titulación de los mismos (apartado 4.1.1).

4. Se incubaron las muestras en oscuridad a 4°C durante 20 min.

5. Luego de este tiempo, se lavaron las suspensiones con 1 ml de PBS, centrifugando a 300 *g* durante 10 min. De este modo fue posible eliminar las moléculas de anticuerpo que no se unieron a la superficie celular.

6. El *pellet* celular se resuspendió en 0,5 ml de PBS y se analizó por citometría de flujo.

Para realizar los controles de compensación, en algunos de los análisis citométricos efectuados se empleó el *kit* de compensación *Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control Compensation Particles Set* (BD Biosciences), ya que la realización de estos controles consume un elevado número de células, si los mismos no se efectúan con el *kit*. Para utilizarlo se siguieron las instrucciones del fabricante, empleando volúmenes equivalentes para la marcación de las perlas y de las células.

Por otro lado, la factibilidad de transducción y la puesta a punto de las condiciones de transducción implicó el análisis de GFP intracelular producida luego del tratamiento con partículas lentivirales. En este caso se procedió de la siguiente manera:

1. Luego de realizar recuento celular, se tomó un volumen apropiado de las suspensiones celulares modificadas con los LVs EF1 α -GFP, así como de células no expuestas a partículas lentivirales.

2. Las suspensiones se centrifugaron a 300 *g* durante 10 min.

3. El *pellet* celular se resuspendió en 0,5 ml de PBS y se analizó por citometría de flujo.

Se utilizaron citómetros de flujo:

- *Guava EasyCyte* (Guava), el cual tiene la posibilidad de adquirir muestras presentes en una placa de 96 pozos, y los datos fueron analizados con el software *GUAVA Express Plus*.

- BD FACSAria III (BD Biosciences). Los datos obtenidos fueron analizados con los programas BD FACSDiva 6.1.2 (BD Biosciences) y FlowJo X 10 (Tree Star Inc., Estados Unidos).

4.1.1. Titulación de anticuerpos monoclonales para citometría de flujo

La unión inespecífica de anticuerpos puede ser eliminada optimizando la cantidad y concentración del anticuerpo. De este modo, se deben aplicar protocolos de titulación para determinar la cantidad y concentración de los anticuerpos que resultan en la mayor señal de la población positiva y la menor señal de la población negativa. Estos protocolos de titulación permiten, así, realizar un uso racional de estos reactivos.

- BD Anti hCD34 de ratón-PE. Clon 8G12, concentración 25 μ g/ml, isotipo IgG1, κ .

1. Se preparó una suspensión celular mixta constituida por un 90% de células TF-1 (que expresan los marcadores de superficie CD34 y CD71) y un 10% de células CHO-K1.

2. Se centrifugó la suspensión mixta a 300 *g* durante 10 min y se eliminó el medio de cultivo. El *pellet* celular se resuspendió en un volumen adecuado de BTC.

3. Se tomaron 50.000 céls. (40 μ l) por muestra a ensayar.

4. Se prepararon 10 μ l de cada dilución a evaluar del anticuerpo, para lograr diluciones finales de: 2/25; 1/25; 1/125; 1/250; 1/1.250; 1/2.500.

5. Se adicionaron las diluciones de anticuerpo a las suspensiones celulares, mezclando suavemente.

6. Se incubó a 4°C en oscuridad durante 20 min.

7. Al finalizar la incubación, se lavaron las suspensiones con 1 ml de PBS, centrifugando a 300 *g* durante 10 min.

8. Se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS.

9. Se analizaron las células por citometría de flujo (FACSAria III).

10. Luego del análisis, se calculó el Índice de Tinción según la ecuación 7 y éste se graficó en función de la concentración del anticuerpo:

$$\text{Índice de Tinción (IT)} = \frac{(\text{mediana}_{pos} - \text{mediana}_{neg}) \times 0,995}{84\%_{neg} - \text{mediana}_{neg}} \quad (7)$$

- BD Anti hCD71 de ratón-APC. Concentración 1,5 µg/ml, isotipo IgG2a, κ.

Se llevó a cabo el mismo protocolo que para la titulación del anticuerpo anti hCD34- PE.

- BD Anti hCD45 de ratón-FITC. Concentración 6,25 µg/ml, isotipo IgG1, κ.

1. Se separó la fracción de MNCs a partir de una muestra de 6 ml de SP heparinizada, como se indicó en el apartado 3.3.1.

2. Luego de la separación, y el lavado con PBS, se realizó recuento en cámara de Neubauer.

3. A partir de la fracción de MNCs, se preparó una suspensión mixta de MNCs (90%) y células TF-1 (10%).

4. Se centrifugó la suspensión mixta a 300 g durante 10 min y se eliminó el medio de cultivo. El *pellet* celular se resuspendió en un volumen adecuado de BTC.

5. Se tomaron 50.000 céls. (40 µl) por muestra a ensayar.

6. Se prepararon 10 µl de cada dilución a evaluar del anticuerpo, para lograr diluciones finales de: 2/25; 1/25; 1/50; 1/100; 1/200; 1/400.

7. Se repitieron los pasos 5 a 10 realizados en el caso de la titulación del anticuerpo anti hCD34-PE.

- BD Anti hCD235a de ratón-PE-Cy7. Concentración 3 µg/ml, isotipo IgG2b, κ.

1. A partir de la misma muestra de SP, luego de la separación por ficoll, se eliminaron las capas de plasma, ficoll, MNCs y se tomó una pequeña alícuota (400 µl) de GRs.

2. Se lavó esta alícuota con PBS, centrifugando a 300 g durante 10 min. Las células se resuspendieron en 12 ml de PBS y se realizó recuento en cámara de Neubauer, en 5 campos del cuadrante central, destinado al recuento de GRs.

3. Se tomó una alícuota de esta suspensión de GRs, para generar una suspensión mixta constituida en un 90% por GRs y un 10% por MNCs (población negativa para el marcador CD235a).

4. Repetir los pasos 4 a 7 realizados en la titulación de Anti hCD45-FITC.

4.2. Tinción de May-Grünwald-Giemsa

De modo similar a otros métodos histológicos, éste se basa en las interacciones electrostáticas entre los colorantes y las moléculas blanco. Las soluciones de tinción

contienen Azul de Metileno (un colorante básico), azules relacionados (también colorantes básicos) y eosina (un colorante ácido). Los colorantes básicos tienen carga neta positiva, y consecuentemente tiñen núcleos (debido a las cargas negativas de los grupos fosfato de las moléculas de ADN y ARN), gránulos de granulocitos basófilos y moléculas de ARN en el citoplasma de células blancas. Por esta razón, estas estructuras aparecen en azul.

La eosina tiene carga neta negativa y tiñe GRs y gránulos de granulocitos eosinófilos. Así, se observan en color rojo.

Las tinciones se realizaron de la siguiente manera:

1. A partir de cada cultivo se tomaron unas 200.000- 300.000 céls. totales y se centrifugaron a 300 g durante 5 min.
2. Las mismas se resuspendieron en un volumen reducido del mismo medio de cultivo y se depositaron en portaobjetos, extendiendo el volumen de suspensión en la superficie.
3. Una vez que se observó seca la superficie del portaobjetos, las células se fijaron por calor.
4. Para la tinción, los portaobjetos se cubrieron gentilmente con solución May-Grünwald (Biopack, Argentina) durante 3 min (0,5 ml por portaobjeto)
5. Se agregó sobre el portaobjetos igual cantidad de agua, mezclando suavemente y se incubó durante 3 a 5 min.
6. Los vidrios se lavaron con agua y se cubrieron con solución de Giemsa (Biopack), incubando durante 12 min, y se lavaron nuevamente. Se dejó secar.
7. Se realizó análisis morfológico a través de la clasificación de células en campos aleatorios no superpuestos en microscopio invertido *Nikon Eclipse Ti-S inverted microscope* (Nikon, Japón).

4.3. Cuantificación de hemoglobina (HGB) y determinación de índices de glóbulos rojos

Las suspensiones celulares derivadas de cultivos de HSPCs en medios de producción eritroide (MePE) fueron evaluadas con el objetivo de conocer los valores de parámetros característicos de GRs. La determinación de estos índices empleados en el área Bioquímica, en los conteos sanguíneos completos de rutina, nos permitiría corroborar la presencia o ausencia de células eritroides en los cultivos (ya sea GRs maduros o precursores con menor grado de maduración). También constituiría una herramienta para inferir la eficiencia del proceso de diferenciación y podría correlacionarse con la funcionalidad de las células obtenidas, es decir, con su capacidad de transporte de oxígeno.

4.3.1. Análisis automatizado

Inicialmente se empleó un contador hematológico Sysmex KX-21N (Sysmex Corporation, Japón). El mismo emplea el método de detección por corriente directa (CD) para leucocitos, hematíes y plaquetas, mientras que para la determinación de hemoglobina emplea el método SLS, que usa laurilsulfato sódico, sin cianuro. Este reactivo es un surfactante que hemoliza los eritrocitos y los leucocitos de la muestra. La reacción química comienza alterando la globina y, a continuación, oxidando el grupo hemo. Ahora los grupos hidrófilos del SLS pueden fijarse al grupo hemo y formar un complejo estable coloreado (SLS-HGB), que se analiza con un método fotométrico. El complejo obedece la ley de Beer-Lambert, con una absorbancia máxima a 539 nm [149]. Por otro lado, para la determinación del hematocrito en las muestras utiliza un método directo por acumulación de la altura de pulsos.

Sin embargo debido a que los cultivos presentaban una densidad celular mucho menor a la correspondiente a muestras de sangre, se debió concentrar la suspensión celular aproximadamente 540 veces mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 10 min y posterior resuspensión en PBS, para así lograr que las variables a medir se encuentren dentro de los rangos de detección y cuantificación del equipo.

De esta manera se determinaron: la concentración de hemoglobina, el hematocrito y, a partir de esto, se calcularon el volumen celular medio (VCM), la hemoglobina celular media (HCM) y la concentración de hemoglobina celular media (CHCM), empleando las fórmulas que se encuentran a continuación (Ecuaciones 8, 9 y 10):

$$HCM \left(\frac{pg}{cél.} \right) = \frac{HGB \left(\frac{g}{dl} \right) \times 10}{GR \left(\frac{\times 10^{12}}{l} \right)} \quad (8)$$

$$VCM (fl) = \frac{Hematocrito (\%) \times 10}{GR \left(\frac{\times 10^{12}}{l} \right)} \quad (9)$$

$$CHCM \left(\frac{g}{dl} \right) = \frac{HGB \left(\frac{g}{dl} \right) \times 100}{Hematocrito (\%)} \quad (10)$$

4.3.2. Cuantificación de HGB por el método manual de cianometahemoglobina modificado

Este método también se empleó para la cuantificación de HGB por poseer mayor sensibilidad que el método que utilizan los contadores hematológicos, además de ser el método de referencia internacional, que posee elevada exactitud y reproducibilidad (con baja desviación estándar y coeficiente de variación).

Este método de la cianometahemoglobina se basa en que la hemoglobina total a pH alcalino es rápidamente convertida en este cianoderivado [150] y la absorbancia del mismo es determinada a 540 nm (530-550 nm). El método fue simplificado por

combinación de reactivos separados, ferricianuro alcalino y cianuro de potasio, en un único reactivo denominado Reactivo de Drabkin [151]. Así, este procedimiento se basa en la oxidación la hemoglobina y sus derivados (excepto la sulfohemoglobina) a metahemoglobina en presencia de ferricianuro de potasio alcalino. La metahemoglobina reacciona con el cianuro de potasio para formar cianometahemoglobina, la cual tiene la mencionada absorbancia máxima a 540 nm y obedece estrictamente la ley de Beer-Lambert.

En el método estandarizado de cianometahemoglobina 20 µl de sangre completa son diluidos en 5 ml de Reactivo de Drabkin. Sin embargo, en este trabajo se realizaron ligeras modificaciones de volumen para poder evaluar la absorbancia en un lector de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific). El procedimiento para la cuantificación fue el siguiente:

1. Se preparó una curva estándar a partir de una muestra de sangre cuya concentración de HGB era conocida (10,5 g/dl). Luego de homogeneizar apropiadamente se prepararon las siguientes diluciones en tubos Eppendorf (Tabla 7):

Tabla 7. Preparación de la curva estándar de HGB empleada en el ensayo de cuantificación de HGB en cultivos derivados de HSPCs.

Tubo de estándar número	Muestra de sangre (concentración de HGB 10,5 g/dl) (µl)	Solución fisiológica (µl)	Hemoglobina (g/dl)
1 (1/10)	100	900	1,050
2 (1/20)	100 del tubo #1	100	0,525
3 (1/50)	40 del tubo #1	160	0,210
4 (1/100)	20 del tubo #1	180	0,105
5 (1/150)	15 del tubo #1	135	0,070

2. Se sembraron por duplicado 20 µl de cada tubo estándar en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Jet Biofil), así como 20 µl (también por duplicado) de cada una de las muestras de interés puras y 20 µl de solución fisiológica (blancos de reactivo).

3. A cada uno de los pozos se adicionaron 200 µl de reactivo de Drabkin.

4. La placa se incubó 10 min a TA en agitación suave.

5. Se leyó la absorbancia a 540 nm en lector de placas *Multiskan FC*.

6. Cuantificación: Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de HGB. En la zona de linealidad, se calculó la ecuación de la recta empleando el programa OriginLab (OriginLab Corporation, Estados Unidos). La concentración de las muestras se determinó reemplazando el valor de absorbancia correspondiente a cada una de ellas en la ecuación calculada.

5. DESARROLLO DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS ERITROIDES A PARTIR DE HSPCs

5.1. Cultivo de HSPCs en Medio de Producción Eritroide de Referencia (MePERef)

Con el objetivo de conocer el comportamiento de las HSPCs al ser cultivadas en MePERef, es decir, la factibilidad y capacidad de expansión y diferenciación eritroide en este medio de cultivo adaptado a partir del estudio publicado por Giarratana y col. en [50], se llevó adelante el siguiente procedimiento:

1. Se descongelaron crioviales que contienen MNCs de dos muestras de SCU a partir de termo de N₂ líquido, tal como se indicó en el apartado 3.6 de esta sección.

2. Se efectuó recuento celular y determinación de la viabilidad de las células descongeladas (apartado 3.4).

3. Se purificaron las HSPCs CD34⁺ por selección inmunomagnética positiva de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado 3.3.2.2. Al finalizar la separación celular, se efectuó recuento y determinación de la viabilidad en cámara de Neubauer.

4. Las células R se cultivaron ON en estufa gaseada en medio IMDM- PFC 2% (V/V)-Heparina 2 UI/ml-Glutamina 2 mM, mientras que las células NR se mantuvieron en IMDM-SFB 10% (V/V).

5. A partir de las suspensiones celulares (R y NR) obtenidas se tomaron 20.000 células totales con el objetivo de realizar un *screening* por citometría de flujo de la eficiencia de purificación, evaluando el marcador CD34, y de este modo determinar la necesidad de realizar o no un segundo paso de SI. Este análisis inicial se llevó adelante en el citómetro de flujo *Guava EasyCyte* y la marcación celular se realizó de acuerdo a lo indicado en el apartado 4.1, empleando como buffer para la tinción el BBC y el anticuerpo monoclonal de ratón Anti hCD34-PE (BD Biosciences) empleando una dilución 4/25.

6. Procedimiento de cultivo: los cultivos en medio MePERef se llevaron adelante en 3 etapas y en cada una de ellas el medio MePERef se suplementó de manera diferencial de acuerdo a las necesidades de expansión, compromiso y diferenciación para lograr la producción de células eritroides.

ETAPA 1 (días 0-7):

- Medio de cultivo **MePERef 0-7**, composición:

Medio basal: IMDM (Gibco)

hEPO comercial (EPOc) 3 UI/ml (Actividad biológica específica de 132.772 UI/ml) (Zelltek, S.A.)

hIL-3 5 ng/ml (Miltenyi Biotec, Inc.)

hSCF 100 ng/ml (Miltenyi Biotec, Inc.)

hInsulina 10 µg/ml (Sigma)

Glutamina 2 mM (Gibco)

Holo-transferrina humana 330 µg/ml (Sigma)

Heparina 2 UI/ml (Rivero)

PFC 5% (V/V)

Hidrocortisona 10^{-6} M (Sigma)

- Concentración inicial de células CD34⁺: 30.000 céls./ml. Se efectuaron 4 cultivos en idénticas condiciones

- En el día 4 de cultivo se efectuó una dilución 2/3 de los cultivos

ETAPA 2 (días 7-11)

El día 7, luego de realizar recuento de los cultivos, las células se centrifugaron a 200 g durante 10 min para retirar el MePERef 0-7 y resuspender en el medio de cultivo correspondiente a esta etapa que, a diferencia del medio de la Etapa 1, no contiene hidrocortisona ni hIL-3.

- Medio de cultivo **MePERef 7-11**, composición:

Medio basal: IMDM

rhEPO comercial 3 UI/ml

hSCF 100 ng/ml

rhInsulina 10 µg/ml

Glutamina 2 mM (Gibco)

Holo-transferrina humana 330 µg/ml

Heparina 2 UI/ml

PFC 5% (V/V)

- Densidad celular inicial en esta etapa: se resuspendieron los *pellets* celulares en un volumen tal que permitió lograr en cada cultivo una densidad de 350.000 céls. totales/ml.

ETAPA 3 (días 11-34)

El día 11, luego de realizar recuento de los cultivos, las células se centrifugaron a 200 g durante 10 min para retirar el MePERef 7-11 y resuspender en el medio de cultivo correspondiente a esta etapa que, a diferencia del medio de la Etapa 2, no contiene hSCF.

- Medio de cultivo **MePERef 11-34**, composición:

Medio basal: IMDM

rhEPO comercial 3 UI/ml

rhInsulina 10 µg/ml

Glutamina 2 mM

Holo-transferrina humana 330 µg/ml

Heparina 2 UI/ml

PFC 5% (V/V)

- Densidad celular inicial en esta etapa: se resuspendieron los *pellets* celulares en un volumen tal que permitió lograr en cada cultivo una densidad de 650.000 céls. totales/ml.

- En el día 20 de cultivo se efectuó una dilución 2/3 de los cultivos

7. Caracterización inmunofenotípica: Una vez obtenida la fracción celular R con una pureza adecuada, se evaluaron las características inmunofenotípicas de la misma por citometría de flujo multiparamétrica. La misma se efectuó en el citómetro FACSaria III (BD Biosciences), en las siguientes condiciones:

- Días de evaluación de las poblaciones celulares presentes en cultivo: 0, 7, 11, 18 y 25.

- Número de células totales por marcación: 30.000-50.000

- Buffer de tinción: BBC

- Anticuerpos: monoclonales de ratón Anti hCD34-PE (dilución 4/25), Anti hCD45-FITC (dilución 1/25 hasta día 11, en que fue necesario realizar una dilución menor, de 2/25, por reducción en la intensidad de fluorocromo), Anti hCD71-APC (dilución 4/25) y Anti hCD235a-PE-Cy7 (dilución 1/50) (BD Biosciences)

- Controles de compensación: *kit* de compensación *Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set* (BD Biosciences)

8. Determinación del potencial clonogénico de la suspensión celular: Se evaluó la capacidad clonogénica de las HSPCs purificadas por separación inmunomagnética que constituye la población de partida presente en los cultivos que se efectuarán en MePERef. Para ello se llevaron adelante cultivos por duplicado o triplicado en medio semisólido con metilcelulosa MACS HSC-CFU completo con EPO, que permite la enumeración de todos los tipos de células progenitoras mieloides y/o eritroides: eritroides (CFU-E y BFU-E), granulocitos/macrófagos (CFU-GM, CFU-G y CFU-M) y progenitores multilinaje (CFU-GEMM). Los cultivos se prepararon a partir de las poblaciones celulares presentes en los cultivos en medio líquido MePERef en los días 0, 4, 7, 11 y 18 como se indicó en el apartado 3.7.2. Se iniciaron con una concentración celular de 750 células/1,1 ml en un volumen final de 0,8 ml (cultivo en placas de 12 pozos). La enumeración y clasificación de colonias presentes en el medio se evaluó luego de 12 días de cultivo en condiciones estándar.

9. Evaluación morfológica por tinción de May-Grünwald-Giemsa: A partir de 200.000 células totales se realizó una tinción de May-Grünwald-Giemsa de acuerdo al procedimiento detallado en el apartado 4.2. Esta evaluación se efectuó sobre las poblaciones presentes en los días 0 y 28 de cultivo.

10. Cuantificación de HGB y determinación de índices de GRs: Estas mediciones se efectuaron al finalizar el cultivo en MePERef, luego de 34 días, según lo indicado en los apartados 4.3, 4.3.1. y 4.3.2.

5.2. Desarrollo de un medio de producción eritroide mediante diseño experimental (DoE)

Como fue mencionado previamente, se consideró relevante realizar esfuerzos para optimizar el consumo de las moléculas complementarias utilizadas en el medio de cultivo. Así, se decidió llevar adelante una secuencia de diseños DoE (*screening* o selección de factores, seguido por optimización de factores y finalmente confirmación del modelo), para obtener de manera más eficiente una nueva formulación del medio de expansión de HSPCs (a la que se denominó MePEOpt 0-7). La experiencia previa obtenida en el desarrollo de este trabajo sugiere que la adecuada progresión de esta etapa es definitoria de las características que presentarán las poblaciones al final del cultivo. Por lo tanto, una apropiada expansión y una diferenciación selectiva hacia el linaje eritroide de las HSPCs durante la primera semana de cultivo, permitirían obtener buenas cantidades de productos celulares fenotípicamente más homogéneos y diferenciados al final del proceso. Es por estas razones que se pretende lograr en esta primera etapa de cultivo una máxima expansión de los progenitores CD34⁺: estas células son las que presentan el mayor potencial de proliferación y así se espera que una mayor amplificación de las mismas luego permita la generación de un gran número de precursores y, finalmente, de células maduras.

5.2.1. Selección de suplementos de cultivo significativos para la expansión de las HSPCs

- Diseño Experimental inicial: *Plackett-Burman* para 11 factores con 3 puntos centrales
 - Número de niveles por factor: 2 (-1, 1)
 - Tipo de estudio: factorial
 - Modelo: de efectos principales
 - 15 corridas experimentales (tres puntos centrales)
 - Respuestas a evaluar:
 - R1: Células CD34⁺ luego de 7 días de cultivo (%)
 - R2: Expansión de células viables CD34⁺ luego de 7 días de cultivo (veces)
 - Factores evaluados: la elección de los factores a evaluar en este ensayo de *screening* fue realizada teniendo en cuenta la experiencia previa en la expansión de HSPCs, así como la bibliografía sobre el tema. Brevemente, se evaluaron:

a. EPOc: su rol en la eritropoyesis fue extensamente descrito en la introducción de este trabajo.

b. hIL-3: este factor de crecimiento, al igual que hSCF, estimula a las HSPCs a diferenciarse en CFU-GEMM y progenitores mieloides. Sin embargo, también tiene un rol en la diferenciación de estos progenitores en precursores más comprometidos [70].

c. hSCFH y hSCF: se analizaron dos variantes de SCF, la primera es una variante altamente glicosilada, expresada en células HEK293/T17 y purificada a través del *tag* de Histidinas que posee en su extremo C-terminal [152]; mientras que la segunda es la variante comercial producida en *E. coli*, que por lo tanto carece de glicosilaciones. De este modo se pretende ver si alguno de ellos tiene un efecto más importante sobre el crecimiento de estos cultivos primarios.

d. GM-CSF: también es un regulador de la eritropoyesis *in vivo*, participa en la diferenciación de las CFU-GEMM en CFU específicas para precursores eritroides, de granulocitos, monocitos, macrófagos y megacariocitos [70].

e. hInsulina: se encuentra reportado que, en combinación con otros factores de crecimiento como SCF y TPO, incrementa la expansión de HSPCs significativamente [29].

f. Hidrocortisona: está descrito que los glucocorticoides son inductores de la proliferación de precursores, pero inhiben la maduración [34].

g. PFC: se encuentra reportado su uso en publicaciones como [50], debido a los numerosos compuestos citoprotectores y otros factores que contiene.

h. Holotransferrina: es necesaria para el metabolismo celular del hierro y el transporte de oxígeno (es requerido para la síntesis de citocromos, enzimas, mioglobina y hemoglobina).

i. BSA: se evalúa con el objetivo de reducir el porcentaje de plasma en los cultivos, ya que su composición es variable y su uso no es escalable.

j. β -mercaptoetanol: está descrito que es requerido por algunas líneas celulares más sensibles a las ROS (especies reactivas de oxígeno), por ejemplo los cultivos primarios. Para evitar el estrés oxidativo causado por los elevados niveles de oxígeno en que se realizan los cultivos estándar, la mayoría de las células amplifican sus defensas antioxidantes, pero ciertos tipos celulares son incapaces de hacer esto. En estos casos el agregado de β -mercaptoetanol puede ayudar a mantener un ambiente reductor. Se ha indicado que actúa incrementando el número de colonias eritroides e incrementa la sensibilidad a dosis no-saturantes de EPO [153].

El programa informático empleado para la creación y análisis de los resultados del DoE fue *Stat-Ease Design Expert 7.0.0 Software* (Stat Ease, Inc., Estados Unidos). Las corridas experimentales que se obtuvieron fueron las que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Corridas experimentales sugeridas por el *software Design Expert 7.0.0*. Se indican el orden estándar y de corrida y las concentraciones a evaluar de cada factor.

		F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9	F 10	F 11
Ord Est	Ord corrida	EPO	hIL-3	hSCFH	hSCF	GM-CSF	Ins	Hidroc	PFC	Holo-transf	BSA	β-ME
		UI/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ug/ml	10 ⁻⁴ M	% (V/V)	ug/ml	% (M/V)	10 ⁻⁴ M
2	1	1	12	100	20	100	20	2,0	2	50	0,4	2,0
4	2	1	12	20	100	100	4	2,0	10	400	0,4	0,2
7	3	5	2	20	20	100	4	2,0	10	50	2,0	2,0
1	4	5	12	20	100	100	20	0,4	2	50	2,0	0,2
12	5	1	2	20	20	20	4	0,4	2	50	0,4	0,2
14	6	3	7	60	60	60	12	1,2	6	225	1,2	1,1
9	7	5	12	100	20	20	4	2,0	2	400	2,0	0,2
5	8	1	2	100	20	100	20	0,4	10	400	2,0	0,2
13	9	3	7	60	60	60	12	1,2	6	225	1,2	1,1
15	10	3	7	60	60	60	12	1,2	6	225	1,2	1,1
6	11	1	2	20	100	20	20	2,0	2	400	2,0	2,0
10	12	1	12	100	100	20	4	0,4	10	50	2,0	2,0
11	13	5	2	100	100	100	4	0,4	2	400	0,4	2,0
8	14	5	12	20	20	20	20	0,4	10	400	0,4	2,0
3	15	5	2	100	100	20	20	2,0	10	50	0,4	0,2

F: Factor; Ord. Est.: Orden Estándar; Ord. Corrida: orden de corrida; Ins: insulina humana recombinante; Hidroc.: hidrocortisona; Holo-transf: holo-transferrina; β-ME: β-mercaptoetanol.

Adicionalmente se efectuó un control de expansión en medio IMDM basal (sin suplementación). Asimismo, para estudiar la existencia de potenciales interacciones entre los factores que resulten significativas en las respuestas evaluadas, se efectuó también un análisis por redes neuronales con el programa MatLab (Mathworks, Estados Unidos), utilizando el Algoritmo Genético (AG).

El procedimiento experimental llevado adelante fue el siguiente:

1. En primer lugar, se separaron MNCs de una muestra de SCU, tal como se indicó en el apartado 3.3.1 de esta sección.

2. Se efectuó recuento celular y determinación de la viabilidad de las células separadas y lavadas (apartado 3.4).

3. Se purificaron las HSPCs CD34⁺ por selección inmunomagnética positiva de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado 3.3.2.2. Al finalizar la separación celular, se efectuó recuento y determinación de la viabilidad en cámara de Neubauer.

4. Las células R se cultivaron ON en estufa gaseada en medio IMDM-PFC 2% (V/V)-Heparina 2 UI/ml-Glutamina 2 mM, mientras que las células NR se mantuvieron en IMDM-SFB 10% (V/V).

5. A partir de las suspensiones celulares (R y NR) obtenidas se tomaron 50.000 células totales con el objetivo de realizar un *screening* por citometría de flujo de la eficiencia de purificación, evaluando el marcador CD34, y de este modo determinar la necesidad de realizar o no un segundo paso de separación inmunomagnética. Este análisis inicial se llevó adelante en el citómetro de flujo *Guava EasyCyte* (Guava) y la marcación celular se realizó de acuerdo a lo indicado en el apartado 4.1, empleando como buffer para la tinción el BTC y el anticuerpo monoclonal de ratón Anti hCD34-PE en una dilución 1/25.

6. Una vez obtenida la fracción celular R con una pureza adecuada, se procedió a iniciar los cultivos con suplementación variable de acuerdo a las corridas experimentales requeridas por el DoE. Para ello se determinó la concentración de células CD34⁺ y el número total. La suspensión se centrifugó a 300 *g* durante 10 min.

7. El pellet se resuspendió en un volumen de IMDM basal de 4,2 ml (16 corridas x 250 μ l) y se homogeneizó adecuadamente. Se distribuyeron 250 μ l/pozo en una placa de 48 pozos, numerando cada uno de ellos según el Número de corrida.

8. Se prepararon en tubos Eppendorf 300 μ l de medio suplementado con los factores indicados en la Tabla 8 para cada corrida, pero en una concentración 2X respecto de la indicada en la tabla.

9. A cada pozo se le agregaron 250 μ l del medio 2X suplementado adecuadamente según el número de corrida. Se homogeneizó cada pozo.

10. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar durante 7 d.

11. Luego de este tiempo de cultivo se evaluaron las respuestas: se efectuó recuento en cámara de Neubauer a partir de cada uno de los pozos y se evaluó el porcentaje de células CD34⁺ mediante citometría de flujo, del mismo modo que se hizo para el día 0.

12. A partir de las respuestas obtenidas se efectuó el análisis correspondiente con los programas informáticos mencionados y, de este modo, se definieron los factores significativos para continuar con los pasos siguientes de la optimización, a la vez que se establecieron las concentraciones en las cuales se mantendrán los demás factores no significativos estadísticamente, de acuerdo a la generación de efectos positivos o negativos en las respuesta analizadas.

5.2.2. Optimización de los niveles de factores influyentes en la etapa de expansión de HSPCs

Para diseñar y llevar a cabo la optimización de factores influyentes detectados en la etapa de *screening*, se empleó también el programa *Stat-Ease Design Expert 7.0.0 Software* que, del mismo modo, sugiere una serie de corridas experimentales ordenadas

de manera aleatoria para evaluar las respuestas de interés. Para esto, los diseños más utilizados son los factoriales completos a tres niveles, el central compuesto, *Box-Behnken*, *D-optimal* y Doehlert.

Igual que en la etapa anterior, es necesario obtener una población de células con una pureza considerable (es decir, células mayoritariamente CD34⁺) a partir de MNCs de SCU. Luego de esto es necesario realizar las corridas en las condiciones de cultivo sugeridas por el *software* durante 7 d y, finalmente evaluar las respuestas de interés [en este caso, la expansión de células viables CD34⁺ (veces) y las células CD34⁺ (%)].

Una vez generados los datos experimentales, se debe llevar a cabo el análisis de los mismos, mediante modelado usando polinomios de regresión lineal múltiple para caracterizar una superficie de respuesta. Luego, las respuestas deben ser optimizadas (siguiendo un criterio apropiado y asegurando que se cumplan los supuestos estadísticos necesarios), y para ello la función deseabilidad es la herramienta que se aplica más comúnmente. Pueden hallarse una o varias condiciones óptimas.

Finalmente, las condiciones óptimas encontradas deberán ponerse a prueba, al igual que los modelos obtenidos. Así, es adecuado que se efectúen varios experimentos de cultivo con la suplementación propuesta como la óptima y, luego del periodo de tiempo en cuestión, se analicen las respuestas de interés para controlar que las mismas se encuentren en el intervalo de confianza predicho por el modelo.

6. DESARROLLO DE CULTIVOS DE CÉLULAS RECOMBINANTES

6.1. Transfección de células animales. Generación de vectores lentivirales

Los vectores lentivirales de tercera generación pseudotipados con la Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) fueron generados por transfección transiente de células de la línea HEK293T con cuatro plásmidos: pREV, pVSV-G, pMDL [154,155] y los vectores de transferencia pLV-EF1 α -EPO y pLV-EF1 α -GFP.

Para la transfección transiente se utilizó la técnica de lipofección o transfección mediada por lípidos policatiónicos [156], en este caso, el LipofectamineTM (Invitrogen) [157].

Las condiciones óptimas de transfección fueron puestas a punto previamente en el laboratorio, analizando las eficiencias de transfección de diferentes lípidos catiónicos comerciales en distintas proporciones lípido:ADN. En este caso, se utilizó el lípido LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), para el cual se estableció una relación óptima lípido:ADN de 2:1 [158]. El protocolo empleado se describe a continuación:

1. Las células HEK293T/17 se cultivaron a una densidad de 4×10^5 céls./ml en placas de 100 mm de diámetro (Greiner Bio-One), empleando medio DMEM para HEK293 suplementado con SFB 10% (V/V).

2. Luego de 24 h de incubación a 37°C, CO₂ 5%, se llevó adelante el procedimiento de lipofección. Para ello se prepararon, por cada vector de transferencia diferente, 2,5 ml de medio DMEM para HEK-293T sin SFB conteniendo 2,5 µg de pREV; 3,6 µg de pVSV-G; 6,5 µg pMDL; 10 µg del plásmido de transferencia. Por otro lado, en otro tubo cónico de 15 ml, se mezclaron 2,5 ml de medio DMEM para HEK-293T sin SFB con 50 µl de Lipofectamine™2000 1 mg/ml. Esta última mezcla se incubó 5 min a TA, luego de agitar vigorosamente.

3. El contenido de ambos tubos cónicos se mezcló gota a gota para favorecer la formación homogénea de los complejos lípido-ADN y se incubó a TA durante 20 min.

4. Se retiró el sobrenadante de las placas de cultivo conteniendo las células HEK293T y se adicionó el volumen de 5 ml de la mezcla lípido-ADN. Esto se incubó en las mismas condiciones de cultivo durante al menos 4 h.

5. Al cabo de este tiempo, el cultivo se suplementó con 5 ml de medio DMEM para HEK293T SFB 20% (V/V), de modo que la concentración final de suero sea 10% (V/V).

6. 48 h después de la transfección se cosechó el sobrenadante del cultivo conteniendo los vectores lentivirales, se centrifugó a 200 g durante 8 min a TA para eliminar las células que pudieran haberse desprendido de la monocapa al retirar el medio.

7. Se filtró el sobrenadante utilizando un filtro para jeringa con membrana de 0,45 µm de tamaño de poro.

8. El sobrenadante se almacenó a -70°C hasta efectuar el paso de concentración de las partículas por centrifugación o su titulación.

6.2. Concentración de partículas lentivirales mediante ultracentrifugación

La capacidad de transducir células difíciles de infectar, tales como células hematopoyéticas primarias, células *stem* hematopoyéticas y células neuronales con vectores lentivirales depende de la posibilidad de producir *stocks* de partículas con elevados títulos virales.

La ultracentrifugación es uno de los métodos que se pueden usar para concentrar sobrenadantes que contengan vectores lentivirales o retrovirales pseudotipados con la VSV-G. En contraste con las proteínas de envoltura endógenas, la VSV-G es una glicoproteína robusta que puede soportar el estrés prolongado de la ultracentrifugación [159].

Las partículas lentivirales que contienen la secuencia de hEPO fueron ultracentrifugadas como se describe a continuación:

1. El sobrenadante filtrado se colocó en tubos para ultracentrífuga Beckman Coulter (Estados Unidos), controlando que el peso del tubo con sobrenadante quede equilibrado con el de un tubo con PBS.

2. Los tubos se centrifugaron a 65.000 *g* durante 3 h a 4°C con desaceleración mínima, empleando el rotor JA 30.50.

3. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación, se eliminó el sobrenadante por volcado, dejando el tubo invertido para retirar completamente el mismo.

4. Para resuspender completamente el *pellet* de partículas lentivirales, el tubo se incubó ON con 500 μ l de medio de cultivo IMDM-10% SFB a 4°C.

6.3. Determinación del título de partículas lentivirales

Para estimar el número de unidades transduccionales es necesario titular los sobrenadantes cosechados en el apartado 6.1 y 6.2.

Para tal fin, se empleó el *kit* de titulación *QuickTiter™ LentivirusTiter Kit (Lentivirus-Associated HIV p24)* (Cell Biolabs, Estados Unidos). Este *kit* fue diseñado para detectar únicamente la proteína p24 del virus del VIH que se encuentra asociada a partículas, y no aquella libre. El *kit* constituye un inmunoensayo en el que sólo la proteína p24 asociada al *core* viral forma complejos con el reactivo ViraBind™, pudiendo separarse así de la proteína libre por centrifugación a alta velocidad. El *kit* presenta una sensibilidad de 1 ng/ml de proteína p24.

Para la titulación se empleó el protocolo que se indica a continuación, de acuerdo con lo establecido por el fabricante:

1. 1 ml del *stock* lentiviral (LVs-EPO, LVs-GFP) y 1 ml de medio de cultivo DMEM para HEK293T con SFB 10% (V/V) condicionado (control negativo) se acondicionaron e inactivaron mediante el agregado de 10 μ l de ViraBind™ reactivo A, mezclando por inversión y adición inmediata de 10 μ l de ViraBind™ reactivo B, mezclando nuevamente por inversión.

2. Las muestras tratadas se incubaron durante 30 min a 37°C y se centrifugaron 5 min a 13.000 *g* a TA.

3. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se disolvió en 250 μ l de Diluyente de Muestra. Se mezcló por agitación y se incubó por 30 min más a 37°C para inactivar los virus.

4. Paralelamente se preparó la curva de estándar de proteína p24, como se indica a continuación (Tabla 9):

Tabla 9. Preparación de la curva estándar de proteína p24 empleada en el ensayo de titulación de partículas lentivirales.

Tubo de estándar número	Estándar de proteína p24 recombinante (µl)	Diluyente de muestra (µl)	Proteína p24 (ng/ml)
1	10	990	100,00
2	500 del tubo #1	500	50,00
3	500 del tubo #2	500	25,00
4	500 del tubo #3	500	12,50
5	500 del tubo #4	500	6,25
6	500 del tubo #5	500	3,12
7	500 del tubo #6	500	1,56
8	0	500	0

5. Los tubos con las diferentes concentraciones del estándar también se incubaron a 37°C durante 30 min.

6. 100 µl de las muestras tratadas, el estándar de proteína p24, el blanco y el control negativo (medio condicionado) fueron adicionadas a la placa previamente sensibilizada con anticuerpo anti-p24 provista por el *kit*.

7. La placa se cubrió y se incubó a 4°C durante 16 h.

8. Los pozos se vaciaron, se lavaron 3 veces con 250 µl de Solución de Lavado y al finalizar el lavado, se eliminó el exceso de Solución realizando golpes ligeros de la placa invertida sobre papel absorbente.

9. Se adicionaron 100 µl por pozo de anticuerpo monoclonal anti-p24 conjugado a FITC diluido 1/1.000. La placa cubierta se incubó durante 1 h a TA en agitador orbital.

10. Se repitió el lavado del paso 8.

11. Se agregaron 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-FITC conjugado a Peroxidasa de rábano picante (HRP) diluido 1/1.000. La placa cubierta se incubó durante 1 h a TA en agitador orbital.

12. Se repitió el lavado del paso 8.

13. Se atemperó la solución de sustrato a temperatura ambiente y se agregaron 100 µl de la misma en cada pozo. La placa se incubó a TA en agitador orbital durante 2 a 30 min, de acuerdo con la velocidad de desarrollo de color, evitando la saturación.

14. La reacción enzimática se detuvo a través del agregado de 100 µl de Solución de Detención (H₂SO₄ 0,5 N) en cada pozo.

15. Se leyó inmediatamente la absorbancia en lector de placas *Multiskan* (Thermo Scientific, Estados Unidos) a una longitud de onda de 450 nm.

Para la determinación del título lentiviral en las muestras se calculó la concentración de proteína p24 a partir de la absorbancia y de la fórmula de regresión lineal correspondiente a la curva de absorbancia del estándar de proteína p24. Luego se emplearon las siguientes fórmulas (Ecuaciones 11, 12, 13 y 14):

$$\text{Título de p24 (asociada a virus, } \frac{ng}{ml}) = p24 \left(\frac{ng}{ml} \right) \times \text{factor de dilución} \times \frac{0,25 ml}{1,0 ml} \quad (11)$$

Dado que hay aproximadamente 2.000 moléculas de proteína p24 por partícula lentiviral (LP), entonces 1 LP contiene:

$$\frac{2000 \times 24 \times 10^3}{6 \times 10^{23}} g \text{ de p24} = 8 \times 10^{-5} pg \text{ de p24} \quad (12)$$

$$\text{o } 1 ng \text{ de p24} = 1,25 \times 10^7 LPs \quad (13)$$

Para vectores lentivirales adecuadamente empaquetados, 1 unidad de transducción (UT) equivale de 100 a 1.000 LP, por lo que:

$$10^6 \frac{UT}{ml} = 10^{8-9} \frac{LP}{ml} = 8 \text{ a } 80 \frac{ng}{ml} p24 \quad (14)$$

6.4. Optimización del protocolo de transducción de HSPCs con LPs

De acuerdo a las condiciones experimentales, tales como el protocolo de transducción empleado, el número de eventos de exposición a los vectores, o la preparación y secuencia del vector empleado, las partículas lentivirales pueden transducir un porcentaje variable de células e integrar un número variable de copias de ADN en el genoma de las células blanco. Adicionalmente, existen factores celulares intrínsecos que pueden afectar los niveles de expresión de un transgen, particularmente en HSPCs, las cuales se sabe que tienen la capacidad de limitar la eficiencia de transducción lentiviral.

Por estas razones se hizo necesario encontrar condiciones de transducción adecuadas. Con este fin se empleó el vector pLV-EF1 α -GFP, el cual contiene la secuencia de la proteína verde fluorescente, como sustituto del vector que contiene la secuencia de hEPO. De este modo los niveles de expresión y la proporción de HSPCs modificadas pueden ser fácilmente determinados por citometría de flujo/microscopía de fluorescencia.

■ Suplementación del medio de transducción (MT)

En primer lugar se generó un diseño experimental con el objeto de encontrar las concentraciones de citoquinas en el medio que favorezcan la transducción lentiviral y, adicionalmente, permitan mantener la viabilidad celular.

Dada la experiencia previa y limitaciones de costo, se eligió realizar un diseño *D-optimal*, en el cual los factores analizados fueron la concentración de hSCF y la concentración de hIL-3. Las respuestas analizadas fueron: % de células GFP⁺ (R1), intensidad de fluorescencia media de GFP (R2) y número de células viables (R3).

El diseño *D-optimal* es un diseño generado por computadora que permite plantear experimentos a partir de “borradores”, en los cuales el usuario indica un

modelo, un número de muestras, un grupo de puntos candidatos, rangos de las variables y otras posibles restricciones [110]. Estas restricciones, en general, surgen cuando el número de corridas que se pueden llevar a cabo o el tiempo destinado al experimento son reducidos, o bien cuando el espacio experimental incluye niveles de los factores que no son factibles o son imposibles de ejecutar.

En este caso se plantearon las siguientes restricciones para la generación del diseño de experimento:

- Diseño inicial: *D-optimal* con intercambio de puntos (*Point Exchange*), sin bloques
- Modelo: cuadrático
- $5 \text{ ng/ml} < [\text{hSCF}] + [\text{hIL3}] < 50 \text{ ng/ml}$
- $0 \text{ ng/ml} < [\text{hIL3}] < 20 \text{ ng/ml}$
- $0 \text{ ng/ml} < [\text{hSCF}] < 50 \text{ ng/ml}$
- Número de niveles por factor: 2 (-1, 1)
- Tipo de estudio: superficie de respuesta
- 11 corridas experimentales (con un punto central)

El programa informático empleado para la creación del DoE fue *Stat-Ease Design Expert 7.0.0 Software*. Las corridas experimentales que se obtuvieron fueron las que se muestran en la Tabla 10. Adicionalmente se decidió efectuar dos controles de corrida (que no fueron incluidos al analizar las respuestas para la obtención de la superficie de respuesta):

a. Control sin citoquinas, en el que las células fueron transducidas en las mismas condiciones experimentales que el resto de las corridas del DoE, sólo que no se suplementó el medio de transducción con citoquinas.

b. Control sin LVs, en el cual el sobrenadante lentiviral fue reemplazado por IMDM basal. El medio de transducción se decidió suplementar con hSCF 20 ng/ml.

Tabla 10. Corridas experimentales sugeridas por el *software Stat-Ease Design Expert 7.0.0*. Se indican el orden estándar, orden de corrida, tipo de punto y concentraciones a evaluar de cada uno de los factores.

			Factor 1	Factor 2
<i>Orden estándar</i>	<i>Orden de corrida</i>	Tipo	hSCF (ng/ml)	hIL-3 (ng/ml)
5	1	Vértice	50,0	0,0
8	2	Interior	16,0	14,5
3	3	Vértice	0,0	5,0
6	4	Vértice	30,0	20,0
4	5	Vértice	0,0	20,0
1	6	Tercer borde	20,0	0,0
2	7	Interior	28,5	9,5
7	8	Borde Cent	0,0	12,5
9	9	Tercer borde	43,3	6,7
10	10	Centro	17,0	9,0
11	11	Vértice	30,0	20,0
-	Sin LVs	Sin LVs	20,0	0,0
-	Sin citoquinas	Sin citoquinas	0,0	0,0

El procedimiento experimental fue el siguiente:

1. Se purificaron las células CD34⁺ según el apartado 3.3.2.2, previa descongelación de un criotubo con MNCs.

2. Las células no retenidas (NR) se cultivaron en IMDM-SFB 10% (V/V)-hIL3 5 ng/ml-hSCF 50 ng/ml y las células retenidas (R) se cultivaron en IMDM-PFC 5% (V/V)- Glutamina 2 mM- Heparina 2 UI/ml- hIL3 5 ng/ml- hSCF 50 ng/ml (medio de pre-incubación). Los cultivos se efectuaron a 37°C en estufa gaseada durante 4 d, para incrementar el número celular y favorecer la integración de las secuencias lentivirales al genoma celular.

3. Se tomó un volumen de la suspensión de células NR y R para determinar la eficiencia de purificación, evaluando los marcadores de superficie CD34, de acuerdo al protocolo indicado en el punto 4.1.

4. Luego de los 4 días de pre-incubación, se realizó recuento celular en cámara de Neubauer.

5. Se tomó la suspensión celular y se centrifugó a 300 g durante 10 min.

6. El *pellet* se resuspendió en 0,975 ml de IMDM basal (0,075 ml x 13 corridas).

7. Se fraccionó el volumen total de suspensión celular en 13 tubos Eppendorf con 75 µl de suspensión cada uno.

8. A cada uno de los tubos se adicionó 75 µl de medio semisólido básico MACS HSC CFU (sin citoquinas).

9. Se suplementó cada corrida según lo indicado en la Tabla 10.

10. A cada tubo Eppendorf se le adicionó 150 µl de partículas lentivirales LVs EF1α-GFP (MOI resultante de 5 UT/cél.) y esto se cultivó en placa de 24 pozos

(aproximadamente 300 μ l por pozo). La proporción resultante de LVs:IMDM basal:medio semisólido básico fue 2:1:1

11. Se incubó a 37°C en estufa gaseada durante 72 h.
12. Luego de este periodo, el contenido de cada pozo se retiró y se lavó con 1 ml de IMDM basal. La suspensión se centrifugó a 300 *g* durante 10 min.
13. El medio de cultivo se retiró y las células se resuspendieron en 250 μ l de IMDM basal.
14. A partir de estas suspensiones se realizó recuento celular en cámara de Neubauer.
15. El resto de la suspensión celular se empleó para realizar un análisis por citometría de flujo y así determinar el porcentaje de células GFP⁺ y la intensidad media de fluorescencia (*X-mean* GFP).
16. Los resultados obtenidos se analizaron en el software *Design Expert 7.0.0*.

■ Multiplicidad de infección (MOI)

A continuación se evaluaron dos MOI diferentes para la transducción de HSPCs. El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

1. Se descongelaron crioviales con MNCs, a partir de las cuales se purificaron las células CD34⁺ mediante SI positiva (apartado 3.3.2.2).
2. Luego de la separación, las células se cultivaron durante 4 d en medio de pre-incubación.
3. Se tomó una fracción de la suspensión celular para analizar la eficiencia de purificación de células CD34⁺ mediante citometría de flujo.
4. El día de las transducciones, las células se contaron en cámara de Neubauer y, según esto, se determinó el volumen de sobrenadante lentiviral titulado de LVs EF1 α -GFP que debía utilizarse para lograr una MOI de 4 UT/cél. y 10 UT/cél.
5. Se procedió a la transducción lentiviral, empleando las siguientes condiciones:
 - Control negativo: en éste el volumen de sobrenadante lentiviral necesario fue reemplazado por IMDM basal.
 - Medio de transducción: proporción LVs:IMDM basal:medio semisólido básico de 2:1:1.
 - Suplementación con citoquinas del medio de transducción: hIL3 17 ng/ml y hSCF 33 ng/ml
 - MOI: volumen de LVs necesario para lograr MOI=4 UT/cél. y MOI=10 UT/cél.
6. Las células se cultivaron en placas multipozo durante 72 h en estufa gaseada.

7. Al cabo de este lapso, se diluyeron los cultivos en IMDM basal y se centrifugaron a 300 *g* durante 10 min.

8. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 μ l de IMDM basal.

9. Se realizaron recuentos en cámara de Neubauer y se analizaron las muestras en citómetro de flujo FACSAria III.

6.5. Cultivos comparativos de células modificadas (eHSPCs) y células no modificadas (nmHSPCs)

En esta etapa se evaluó la capacidad de expansión y diferenciación eritroide de dos líneas: eHSPCs (transducidas con LVs EF1 α -EPO) y nmHSPCs (no modificadas con partículas LVs), mediadas por la acción de hEPO, tanto exógena como secretada por las propias células. Paralelamente a cada ensayo de transducción de HSPCs con los LVs EF1 α -EPO, se realizaron transducciones de estas células con LVs EF1 α -GFP, para determinar la factibilidad de transducción en cada evento de exposición a un dado lote de lentivirus y para una determinada muestra de HSPCs.

Las HSPCs fueron cultivadas en medio semisólido MACS HSC-CFU con metilcelulosa, básico y en MePERef, adaptado de un estudio publicado [50].

6.5.1. Ensayo preliminar en medio semisólido

Inicialmente, se realizaron cultivos en medio semisólido MACS HSC-CFU empleando HSPCs de SP.

1. Las células fueron pre-estimuladas en MePERef suplementado con hidrocortisona 10^{-6} M, hSCF 100 ng/ml, hIL3 5 ng/ml y EPOc 3 UI/ml (22,6 ng/ml) durante 7 d.

2. A continuación, las células fueron transducidas con vectores LVs EF1 α -EPO. Se mantuvo un control de nmHSPCs.

3. Los cultivos de nmHSPCs y de eHSPCs se llevaron a cabo durante 8 d en medio semisólido con metilcelulosa básico (*MACS HSC-CFU basic*) suplementado con hSCF 50 ng/ml y hIL3 10 ng/ml, tanto en presencia como en ausencia de EPOc 3 UI/ml. Los cultivos se prepararon como se indica en el punto 3.7.2 de esta sección.

4. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%.

5. Luego del cultivo, se evaluó el porcentaje de colonias eritroides (CFU-E y BFU-E), el número de colonias totales y la concentración de hEPO en sobrenadantes de cultivos.

6.5.2. Cultivos en suspensión

1. Se preparó un *pool* de células progenitoras a partir de tres muestras de SCU. Se analizó la pureza de dicho *pool* por citometría de flujo (según el apartado 4.1).

2. El *pool* se pre-estimuló en IMDM suplementado con PFC 5% (V/V); glutamina 2 mM; heparina 2 UI/ml; hSCF 50 ng/ml; hIL3 5 ng/ml durante 5 d para la posterior transducción lentiviral.

3. La transducción se realizó de la siguiente manera, en las condiciones resultantes del proceso de optimización:

- 3 transducciones independientes con LVs EF1 α -EPO (eHSPCs)
- 3 transducciones independientes con LVs EF1 α -GFP (gfpHSPCs)
- 3 cultivos independientes de células no expuestas a LVs (nmHSPCs).

4. Luego del paso de transgénesis lentiviral, se procedió al cultivo diferencial para cada línea celular:

a. Cultivos de nmHSPCs en MePERef con EPOc, denominados nmHSPCs-EPOc (+):

• Etapa 1 (días 0 a 7): 7,5x10⁴ nmHPSCs/ml fueron cultivadas en MePERef suplementado con:

- hEPO comercial (EPOc) 3 UI/ml
- hIL-3 5 ng/ml (Miltenyi Biotec, Inc.)
- hSCF 50 ng/ml (Miltenyi Biotec, Inc.)
- hInsulina 10 μ g/ml (Sigma)
- Glutamina 2 mM (Gibco)
- Holo-transferrina humana 330 μ g/ml (Sigma)
- Heparina 2 UI/ml (Rivero)
- PFC 5% (V/V)
- Hidrocortisona 10⁻⁶ M (Sigma)

• Etapa 2 (días 7 a 18): los cultivos fueron diluidos de modo tal de lograr una densidad celular de 4,5x10⁵ céls./ml y 7,5x10⁵ céls./ml en los días 7 y 11, respectivamente, en MePERef con EPOc, sin hidrocortisona, hSCF ni hIL-3.

b. Cultivos de nmHSPCs en MePERef sin EPOc, denominados nmHSPCs-EPOc (-):

Adicionalmente, como control, las nmHSPCs fueron cultivadas, respetando el mismo protocolo de dos etapas, en medio MePERef sin el agregado de EPOc en ninguna de ellas.

c. Cultivos de eHSPCs en MePERef sin EPOc, denominados eHSPCs-EPOc (-):

El protocolo de cultivo fue un protocolo de dos etapas, idéntico para nmHSPCs y eHSPCs, sólo que a los cultivos de eHSPCs no se adicionó EPOc en el medio de cultivo en ninguno de los pasos.

5. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C en atmósfera de CO₂ 5%.

6. Se tomaron muestras de los diferentes cultivos en los días 0, 7, 11, 15 y 18 post-transducción para análisis morfológico mediante tinción de May-Grünwald-Giemsa (apartado 4.2), recuento de células en cámara de Neubauer (apartado 3.4) y análisis inmunofenotípico por citometría de flujo (apartado 4.1).

6.6. Análisis de la hEPO producida por los progenitores/precursores modificados obtenidos en 6.5.2

6.6.1. Cuantificación de la producción celular de hEPO mediante la técnica de ELISA sándwich amplificado

Para la cuantificación de rhEPO presente en los sobrenadantes de cultivo de las eHSPCs-EPOc (-) se empleó la técnica de ELISA (enzimoinmuno ensayo) sándwich. Se evaluó la concentración de la hormona en sobrenadante de cultivos recogidos en los días 0, 7, 11, 15 y 18 post-transducción.

El ELISA empleado para determinar la concentración de EPO en los sobrenadantes de cultivo se basa en un sistema de detección estreptavidina-biotina, de modo de incrementar la sensibilidad y el límite de detección del ensayo. La técnica implica la captura del antígeno proteico presente en los sobrenadantes mediante un anticuerpo policlonal desarrollado en el Laboratorio de Cultivos Celulares (FBCB-UNL) (anti-rhEPO C1 purificado por proteína A), el cual es inmovilizado en placas de poliestireno. Posteriormente, la hEPO es detectada con el mismo anticuerpo policlonal biotinilado. El anticuerpo luego es conjugado a estreptavidina-peroxidasa y el revelado de la reacción se efectúa con el sustrato enzimático y un cromógeno. El ensayo fue desarrollado como se indica a continuación [160]:

1. Sensibilización: Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner Bio-One) con 100 μ l del anticuerpo policlonal de conejo anti-rhEPO C1 purificado por proteína A en una concentración de 0,509 μ g/ml (100 ng por pozo) diluido en solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37°C y 16 h a 4°C.

2. Bloqueo: El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ l por pozo de BSA 1% (P/V) en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37°C.

3. Primera incubación: Se agregaron 100 μ l de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de hEPO desde 10 ng/ml hasta 0,078 ng/ml, o de las muestras a analizar, en solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 (USB Corporation, Estados Unidos) 0,05% (V/V) (solución diluyente). Las muestras se ensayaron realizando diluciones de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Se incubó durante 1 h a 37°C.

4. Segunda incubación: Se adicionaron 100 μ l de anticuerpo policlonal de conejo anti-rhEPO biotinilado en una concentración de 0,2545 μ g/ml. Se incubó durante 1 h a 37°C.

5. Conjugado: Se adicionaron 100 μ l por pozo de solución AMDEX (estreptavidina-peroxidasa) (GE Healthcare) en una concentración de 0,125 μ g/ml. Se incubó a 37°C durante 1 h.

6. Reacción reveladora: el revelado se realizó mediante reacción enzimática empleando como sustrato H_2O_2 0,015 volúmenes diluida en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM (pH 5,3), con el agregado de *o*-fenilendiamina (OPD, Sigma) en una concentración de 0,5 mg/ml (solución de revelado). Se agregaron 100 μ l de solución de revelado por pozo y, luego de 15 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μ l de H_2SO_4 2 N. La lectura del color generado se efectuó a una $\lambda=492$ nm en lector de placas LabSystems Multiskan MCC/340 (Thermo Scientific).

7. Cuantificación: Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de hEPO y de las diluciones en escala logarítmica para el estándar y las muestras, respectivamente. La concentración de las muestras se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas [161]. El estándar de rhEPO consistió en un estándar interno del laboratorio (rhEPOM25) contrastado previamente frente al estándar internacional BRP indicado por la Farmacopea Europea.

8. Control: Se efectuó un control de muestra utilizando sobrenadante de nmHPSCs-EPOc (-).

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de PBS-Tween 20 0,05% (V/V).

6.6.2. Determinación del patrón de isoformas de hEPO mediante isoelectroenfocado (IEF)

6.6.2.1. Desalado y concentración de sobrenadantes de cultivo

Para lograr una óptima *performance* de las corridas de isoelectroenfoco las muestras deben encontrarse en concentración suficiente y en un entorno de muy bajo contenido de sales, ya que una fuerza iónica elevada altera el perfil de corrida [162].

Por lo tanto, debe elegirse un sistema de purificación en un paso que permita la recuperación de todas las isoformas presentes originalmente en el medio de cultivo, libres de sales y en una concentración adecuada.

Para la purificación y concentración de las muestras de sobrenadante de cultivo se empleó un sistema de centrifugación. Los filtros *Ultrafree-MC* con membrana microporosa (Merck Millipore) son utilizados para concentrar y purificar fluidos biológicos

y soluciones acuosas en volúmenes de hasta 0,5 ml. El límite de corte nominal de estos filtros es de 10 kDa. El protocolo seguido para concentrar muestras de sobrenadante de células eHSPCs se indica a continuación:

1. Acondicionamiento previo al uso del filtro: Se realizó un lavado con agua ultrapura durante 5 min a 4.700 *g* para eliminar el glicerol presente en trazas en la membrana. Se descartó el volumen retenido y el permeado.

2. Concentración por ultrafiltración: Se colocaron 0,5 ml de la muestra de sobrenadante de cultivo en el filtro y se centrifugó por 20 min a 4.700 *g* a 4°C. Una vez finalizado el tiempo de centrifugación se retiró el permeado acuoso concentrado en sales. El paso de centrifugación se repitió hasta lograr el volumen final de concentrado requerido (aproximadamente 100 µl).

3. Desalado: para mejorar la eliminación de sales, se adicionaron 0,35 ml de agua ultrapura al reservorio del filtro que contenía la muestra concentrada y se centrifugó nuevamente durante 20 min a 4.700 *g*. Este paso se repitió una vez más, hasta obtener un volumen final de aproximadamente 80 µl de muestra.

4. Al finalizar, el volumen retenido fue cuidadosamente homogeneizado con micropipeta, evitando que se genere espuma, para resuspender las proteínas que se hubieran depositado sobre la membrana de filtración. El retenido se retiró y colocó en tubo Eppendorf, conservándose a -20°C hasta su utilización.

6.6.2.2. Isoelectroenfocado (IEF)

El estudio de la composición de isoformas de hEPO puede realizarse mediante la técnica de focalización isoelectrónica o isoelectroenfocado. Para esto se utilizó la cuba electroforética Multiphor II, el baño refrigerante Multitemp III y una fuente de voltaje EPS3500XL (GE Healthcare).

- Muestras: las muestras empleadas corresponden a un *pool* de sobrenadantes de cultivo de eHSPCs, previamente desalados y concentrados (apartado 6.6.2.1) y a un control de EPOc (Zelltek S.A.).

- Gel: el gel utilizado en el isoelectroenfoco consistió en una mezcla de acrilamida/bisacrilamida en una concentración del 8% (P/V), urea (Invitrogen) 7 M, sacarosa (Merck) 7,5% (P/V), 1,5 ml de anfolitos de rangos de pH 3-5 (Fluka, Estados Unidos), 0,5 ml de anfolitos de rango 5-7 (Sigma), APS (BioRad, Estados Unidos) 0,1% (P/V), TEMED (Baker) 0,1% (V/V) con el fin de obtener un gel en el cual se estableciera posteriormente un gradiente de pH comprendido entre 3,5 y 5,5 aproximadamente.

- Protocolo:

1. El gel se depositó sobre *Gel Bond® Film* (Lonza, Suiza) y éste sobre la cuba.

2. Se ubicaron tanto en la región del ánodo como del cátodo, tiras de papel de electrodo (GE Healthcare), embebidos con la correspondiente solución de anolito:

- *Solución de anolito:* Ácido glutámico (Merck) 0,018 g/l, ácido aspártico (Sigma) 0,017 g/l, pH entre 2,8 y 3,8.

- *Solución de catolito:* Glicina (Invitrogen) 2 g/l.

3. Sobre el papel de electrodo se colocaron los electrodos de platino.

4. Una vez preparado el soporte, se procedió al pre-enfocado de los anfolitos durante 30 min a 250 V, 50 mA, 30 W, 8°C, con el objeto de generar el gradiente de pH.

5. Posteriormente, se sembraron las muestras de sobrenadante acondicionado de cultivo y el control de proteína comercial, en un volumen máximo de 20 µl.

6. Se procedió al enfocado de las muestras durante 90 min, a 30 W, 2.000 V, 50 mA, 8°C.

6.6.2.3. Electrotransferencia a membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF)

El sistema de transferencia utilizado fue el denominado *sistema seco*, en el cual la membrana y los papeles de filtro grado 1F (GE Healthcare) empleados se encuentran embebidos en solución de electrotransferencia [Glicina 192 mM, metanol (Merck) 20% (V/V), Tris 25 mM, pH 8,3] y el proceso se realiza sobre un soporte seco.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) empleando el equipo de GE Healthcare descrito. La transferencia se llevó a cabo durante 60 min a TA, a 2.000 V y 10 W, y usando la relación 0,8 mA/cm² de superficie de membrana.

6.6.2.4. Western Blot

La proteína adsorbida sobre la membrana de PVDF se reveló mediante reacción inmunológica. El protocolo seguido se detalla a continuación:

1. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica de la membrana sumergiéndola en solución de bloqueo [TBS (Tris 0,05 M; NaCl 0,015 M, pH 7,5)-leche descremada 5% (P/V)] ON a 4°C.

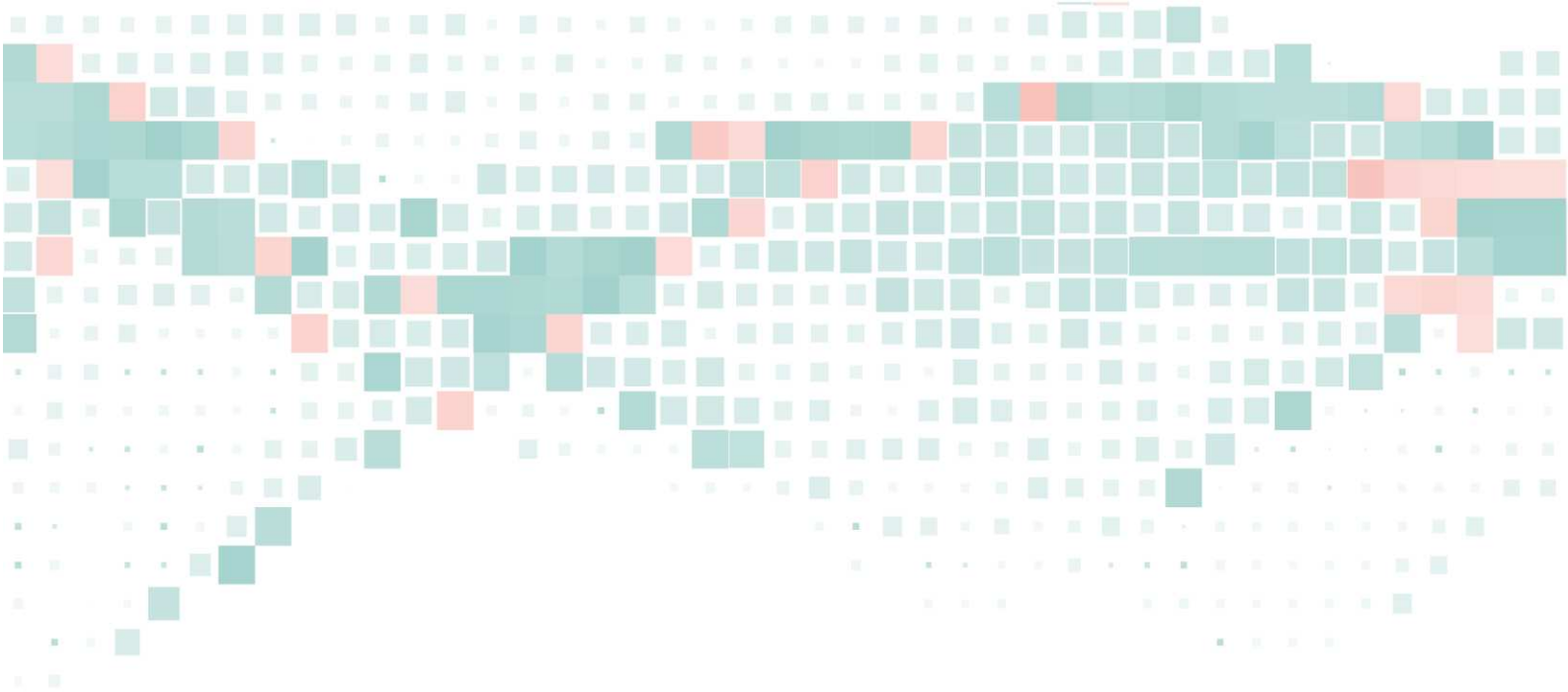
2. Se lavó la membrana durante 5 min en solución de lavado [Tween 20 0,05% (V/V) en TBS] con agitación. Esto se repitió 3 veces.

3. Se incubó con una dilución 1/1.000 de anticuerpo primario (Anticuerpo policlonal de conejo anti-hEPO), durante 1 h a TA con agitación.

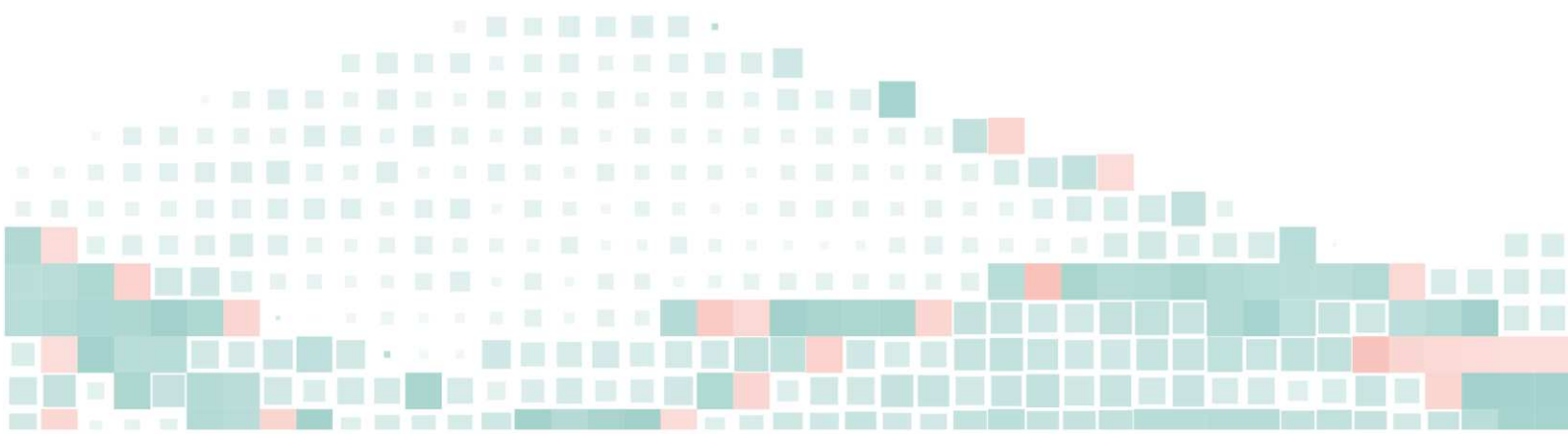
4. Se repitió el paso 2.

5. Se incubó con una solución de anticuerpo secundario (inmunoglobulinas de cabra anti-Igs de conejo conjugadas a la enzima HRP, P0448, Dako, Estados Unidos), en una dilución 1/2.000 durante 1 h a TA con agitación.

6. Se repitió el paso 2.
7. Se incubó durante 1 min con solución de revelado (kit de quimioluminiscencia, *Pierce Ecc Western Blotting Substrate*) y se escurrió el exceso.
8. Se colocó en un soporte de *nylon* y se expuso la membrana a una película fotográfica (*Kodak Biomax XAR Film*, Kodak) en cuarto oscuro. Se evaluaron diferentes tiempos de exposición para lograr la máxima resolución con buen contraste entre la señal quimioluminiscente y el fondo.
9. Se reveló por método convencional utilizando soluciones de revelado (Kodak) y fijación (Fijador gráfico LITH, AGFA).



Resultados



**Purificación de HSPCs
utilizando como fuente sangre
de cordón umbilical**

1. **PURIFICACIÓN DE HSPCs UTILIZANDO COMO FUENTE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL**
- 1.1. **GENERACIÓN DE UN BANCO CELULAR DE TRABAJO CONSTITUIDO POR CÉLULAS MONONUCLEARES (MNCs) DERIVADAS DE UNIDADES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL (SCU)**
- 1.1.1. **Recolección de sangre de cordón umbilical (SCU)**

A lo largo del desarrollo de este trabajo se recibieron muestras de SCU recolectadas en el Hospital José María Cullen, el Sanatorio Mayo y la Clínica de Ginecología y Maternidad Central (Santa Fe, Argentina) en bolsas con 35 ml de solución anticoagulante CFDA-1. Previo a la separación de MNCs se determinó el volumen de sangre recolectado. Se recibió y procesó un total de 50 muestras de SCU.

Sin embargo, teniendo en cuenta que se ha demostrado que la frecuencia de células CD34⁺ en SCU es de entre 0,33 y 1,98% sobre el total de células blancas nucleadas y en SP es de 0,03 a 0,09% [163], es que consideramos relevante establecer la manera de recolección más adecuada. Una inadecuada anticoagulación de la muestra puede llevar a la formación de agregados celulares y consecuentemente a una reducción en la recuperación de MNCs a partir de la sangre recolectada. Para esto evaluamos dos posibilidades: recolección en tubos cónicos empleando 500 U de heparina o recolección con CFDA-1 (suponiendo un factor de dilución de la sangre con anticoagulante en la bolsa de 1/2).

De este modo, se recolectaron 4 muestras de SP de 20 ml. Cada muestra se dividió en 2 tubos cónicos (10 ml en cada tubo) en las condiciones antes mencionadas. Las suspensiones se homogeneizaron por inversión suave y se efectuó separación por ficoll según lo descrito en el apartado 3.3.1 de *Materiales y Métodos*. Al finalizar la separación por gradiente de densidad, se efectuó recuento de las suspensiones celulares resultantes y se determinó la recuperación celular, según la Ecuación 3. Para determinar si el uso de los diferentes anticoagulantes influye de manera significativa en la recuperación celular, se empleó la prueba no paramétrica de Medianas de Mood sobre el conjunto de datos ($n_1=4$, $n_2=4$; $\alpha=0,05$). De este modo los parámetros estadísticos de interés para cada grupo se muestran en la Tabla 11 y fueron:

Tabla 11. Parámetros estadísticos (mediana, rango intercuartílico y mediana general) y p-valor obtenido en la prueba de Medianas de Mood ($n_1=4$, $n_2=4$; $\alpha=0,05$) para comparar la recuperación celular obtenida a partir de SP tratada con dos anticoagulantes.

Anticoagulante	Mediana	Q ₃ -Q ₁	Mediana general	p-valor
CFDA-1	2.812.500	3.375.000	1.743.750	0,157
Heparina	1.500.000	853.125		

De este modo, el p-valor obtenido ($p>0,05$) indica que se debe aceptar la hipótesis nula de igualdad de medianas, es decir que el anticoagulante empleado no

afecta significativamente la recuperación de MNCs. Este resultado también puede corroborarse al realizar un análisis por gráfico de cajas (Figura 16), el cual muestra superposición de las mismas, así como una mayor dispersión en los valores de recuperación obtenidos con el anticoagulante CFDA-1.

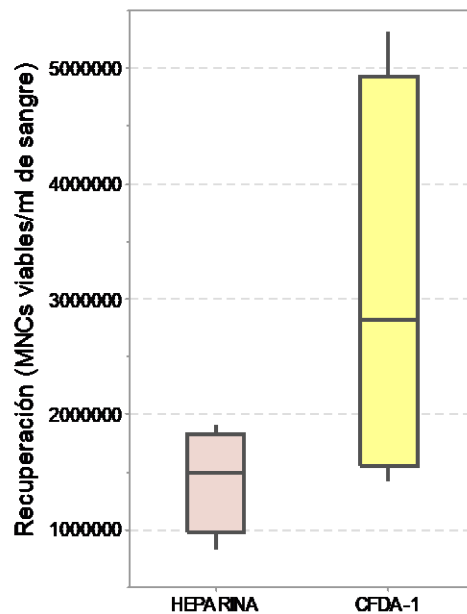


Fig. 16. Recuperación de MNCs de SP tratada con diferentes anticoagulantes. En el gráfico se muestra la recuperación celular a partir de SP (MNCs viables/ml de sangre) en función del anticoagulante empleado (Heparina vs. CFDA-1). La superposición de cajas de rango intercuartil es un indicador de que no existen diferencias significativas entre las medianas de ambos grupos tratamiento. No se observan valores atípicos.

Puesto que las pruebas preliminares realizadas con SP indicaron que el tipo de anticoagulante no afecta significativamente la recuperación de MNCs, se optó por realizar la recolección de SCU en bolsas destinadas específicamente a tal fin. Las mismas contienen CFDA-1 y presentan mayor comodidad para su manipulación por parte del personal médico. Asimismo, la recolección de volúmenes reducidos de SP se realizó empleando tubos cónicos con heparina.

1.1.2. Obtención de MNCs a partir de SCU y posterior generación de un banco celular de trabajo

Con el objetivo de separar la fracción de MNCs a partir de la SCU completa se empleó la metodología de centrifugación en gradiente de densidad empleando una solución de Ficoll (la metodología se encuentra descrita en el apartado 3.3.1 de la sección *Materiales y Métodos*). Para esto se procesaron 50 muestras de SCU. Inicialmente se determinó el volumen de cada muestra y, al finalizar el procedimiento, se evaluó la concentración celular de la suspensión resultante mediante recuento en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células no viables por el método de

exclusión con azul de tripán (apartado 3.4 de Materiales y Métodos). Asimismo, a partir del número total de células viables y el volumen inicial de sangre se determinó la recuperación de MNCs (MNCs viables/ml de SCU). Para estimar adecuadamente los parámetros estadísticos correspondientes se realizaron inicialmente pruebas de normalidad para todas las variables estudiadas ($n=50$, $\alpha=0,05$) empleando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Frente a la falta de normalidad en cada colección de datos, los estadísticos descriptivos empleados fueron la mediana, el rango intercuartílico y el rango (Tabla 12). Se muestran además los gráficos de caja en los cuales se representan la distribución de las variables de interés, los estadísticos descriptivos y valores atípicos (Figura 17). En todos los casos las cajas son asimétricas, lo que indica distribuciones no-normales de los conjuntos de datos.

Tabla 12. Parámetros estadísticos para las diferentes variables de interés en el aislamiento de MNCs (volumen inicial, recuperación de MNCs y viabilidad).

	Normalidad	Mediana	Q₃-Q₁	Rango
<i>Volumen inicial de SCU (ml)</i>	NO ($p<0,01$)	50,0	71,2-39,2	10,0-150,0
<i>Recuperación de MNCs (10⁶ MNCs viables/ml de SCU)</i>	NO ($p<0,01$)	2,2	3,7-1,4	0,5-43,5
<i>Viabilidad (%)</i>	NO ($p<0,01$)	99,0	99,6-97,5	84,8-100,0

Cabe destacar que generalmente el aislamiento de fracciones puras de MNCs a partir de SCU presenta dificultad ya que, en la centrifugación en gradiente de densidad empleando Ficoll, no necesariamente sedimentan todas las células eritroides en la capa inferior como se esperaría. Por el contrario, algunas células eritroides quedan retenidas en la interfase plasma-Ficoll. Estas células son progenitores nucleados que no son fácilmente eliminados y pueden obstaculizar la selección subsecuente de la población de células madre. Adicionalmente, los eritrocitos pueden formar agregados y adherirse a los linfocitos, causando de este modo una sedimentación inusual de linfocitos en la capa inferior [33]. Esta contaminación notoria de la interfase plasma-Ficoll con precursores eritroides y/o agregados eritrocitarios ocurrió en 10 de las 50 muestras procesadas. Asimismo, 4 de los 5 puntos outliers indicados en el gráfico de cajas de Recuperación celular presentaron esta dificultad a la hora de separar la capa de MNCs, lo que pone en evidencia el efecto negativo de este comportamiento sobre la recuperación de MNCs.

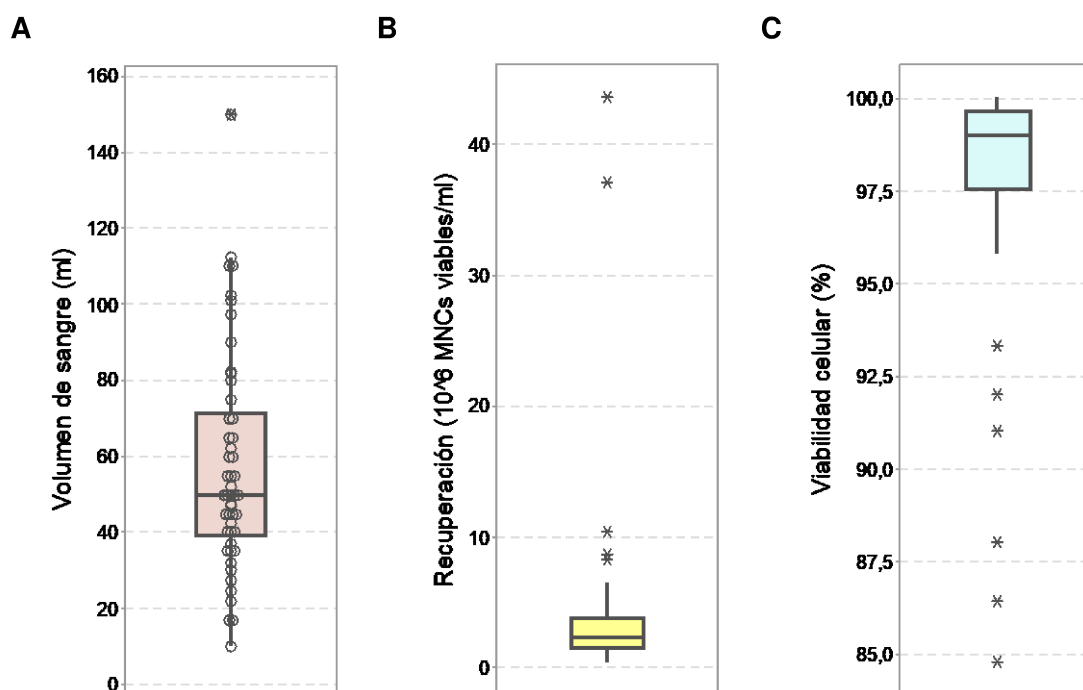


Fig. 17. Separación celular a partir de SCU. Los gráficos de caja muestran los parámetros correspondientes a todas las muestras de SCU procesadas: **A.** Volumen de sangre (ml). Se indica la mediana (50), valores individuales (círculos vacíos) y valores atípicos (asteriscos), **B.** Recuperación celular (10^6 MNCs viables/ml) luego del enriquecimiento empleando Ficoll. Se muestra la mediana (2,21) y los valores atípicos y **C.** Viabilidad celular (%) luego del paso de centrifugación en gradiente de densidad. También se muestra el valor de mediana (99) y los valores atípicos.

A partir de las fracciones de MNCs obtenidas de las 50 muestras de SCU se generó un banco celular de trabajo. Al finalizar el lavado de las MNCs luego de cada paso de enriquecimiento, las mismas fueron resuspendidas en un volumen adecuado de solución de criopreservación (10% DMSO en SFB) de modo tal de almacenar 1 a 1,5 ml de suspensión celular con un total de hasta 3×10^7 MNCs viables por criovial. Posteriormente los viales fueron sometidos a una reducción gradual de temperatura desde TA hasta -196°C , almacenándose en termo de N_2 líquido (tal como se describe en el apartado 3.5 de *Materiales y Métodos*).

1.2. PURIFICACIÓN DE HSPCs CD34⁺

1.2.1. Selección de un protocolo de aislamiento de células CD34⁺

La reducida frecuencia y las características morfológicas que tienen las HSPCs, que no son particulares o especiales, hacen que sea muy compleja su cuantificación precisa y su aislamiento. Es por esta razón que se consideró necesario evaluar diversas estrategias de separación celular. Para determinar la eficiencia de las mismas se evaluaron dos aspectos principales de las poblaciones celulares obtenidas: porcentaje (%) de células CD34⁺ (evaluado por citometría de flujo) y recuperación

celular (número de células retenidas viables/ 10^6 MNCs viables, ambos valores determinados por recuento en cámara de Neubauer). Además se tuvo en cuenta el tiempo empleado por la metodología para obtener la fracción celular final, un aspecto también relevante.

1.2.1.1. Clasificación celular por tecnología FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting* o Clasificación Celular Activada por Fluorescencia)

Para la selección celular por FACS, empleando el equipo FACSAria III, se partió de muestras de MNCs de SCU. Se efectuaron dos separaciones celulares utilizando MNCs de dos muestras de SCU diferentes, las cuales fueron descongeladas y marcadas con anticuerpos anti hCD34-FITC y anti hCD45-PE-Cy5. Luego de la inmunomarcación, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron en el equipo de FACS para establecer los parámetros de voltaje y compensación apropiados. A continuación se determinaron las poblaciones de interés, en este caso la población $CD34^+CD45^{+/dim}$ y se procedió a su separación de acuerdo a la fluorescencia emitida por las células marcadas. La recolección de las células se efectuó en 1 ml de IMDM con SFB (10%) o PFC (5%) con antibióticos-antimicóticos.

Para la primera muestra (Prueba 1), el porcentaje inicial de células $CD34^+CD45^{+/dim}$ fue de 2,82% y, luego del procedimiento se *sorting* se obtuvo un 35% de células $CD34^+CD45^+$ (Figura 18) y una recuperación de 749 céls. viables/ 10^6 MNCs viables (25.000 céls. viables), mientras que en el caso de la segunda muestra (Prueba 2) el porcentaje inicial de células $CD34^+CD45^+$ fue 2,81 y el porcentaje final fue 58,3 (Figura 18). La recuperación fue de 350 céls viables/ 10^6 MNCs viables (15.000 céls. viables).

Asimismo, se realizaron dos pruebas adicionales de *sorting* en las cuales la recuperación celular fue muy reducida, de modo tal que no fue posible continuar con el análisis de pureza y cultivo posteriores a la separación.

Así, las recuperaciones celulares obtenidas por esta metodología son muy bajas por varias razones: estas células se presentan en una frecuencia muy reducida en las muestras de partida, lo que dificulta que el equipo seleccione apropiadamente las poblaciones de interés. Además, el proceso de selección de una población muy poco frecuente, requiere el procesamiento de un número muy elevado de células, lo que implica un tiempo muy prolongado de procesamiento (de 8 a 10 horas), en el cual las mismas se encuentran sometidas a condiciones que difieren de las óptimas para su mantenimiento (temperatura ambiente, pH desregulado), sufren estrés mecánico y se encuentran en un ambiente no aséptico, lo que incrementa la posibilidad de que se

produzcan contaminaciones. Todos estos factores dificultan la posterior aplicación en cultivos celulares.

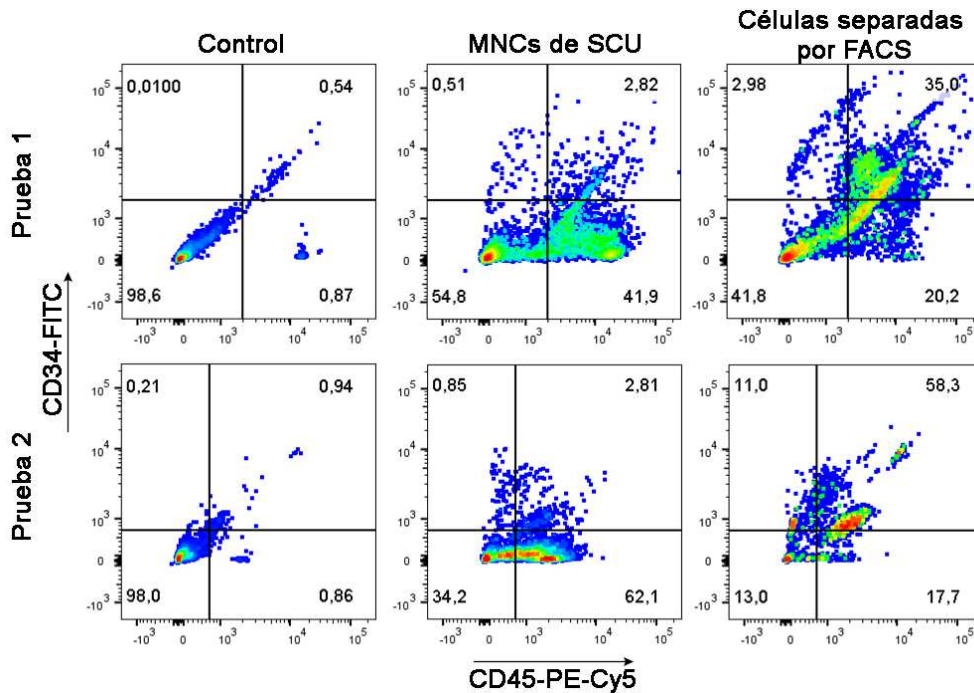


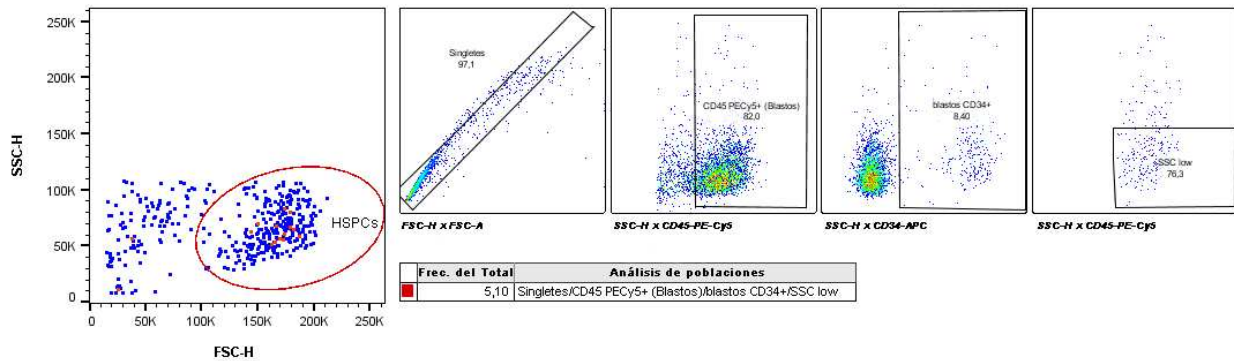
Fig. 18. Citometría de flujo. Gráficos de puntos del análisis de CD34-FITC vs. CD45-PE-Cy5 efectuado a las MNCs de SCU (antes de la separación por FACS) y a las Células separadas por FACS (CD34⁺CD45^{+/dim}), para cada una de las dos muestras evaluadas (1 y 2).

1.2.1.2. Selección inmunomagnética positiva seguida por FACS

Considerando que en la mayoría de los casos la selección inmunomagnética no permitió obtener poblaciones celulares cuyo porcentaje de células CD34⁺ sea superior al 80%, se decidió evaluar una combinación de las dos tecnologías disponibles para la separación celular basada en marcadores de superficie. Así, se descongelaron MNCs de SCU. Con el fin de eliminar agregados celulares resultantes de la destrucción de células y liberación de ADN que suele ocurrir en el descongelamiento, se trataron las MNCs con 24 UI/ml de Benzona en IMDM, incubando en estufa a 37°C durante 15 min, con agitación manual cada 5 min. Luego de lavar las células, 300 µl de las suspensiones se marcaron con anti hCD34-*Beads*, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se determinó el porcentaje de células CD34⁺CD45⁺SSC^{low} mediante citometría de flujo. Siguiendo este criterio de clasificación celular más estricto que el anteriormente utilizado, se obtuvo que sólo un 5,1% de la población celular total presentó estas características inmunofenotípicas luego de la selección inmunomagnética positiva (Figura 19.A), con una recuperación de 90.946 céls. viables/10⁶ MNCs viables.

A

Células separadas por selección inmunomagnética



B

Células separadas por selección inmunomagnética + FACS

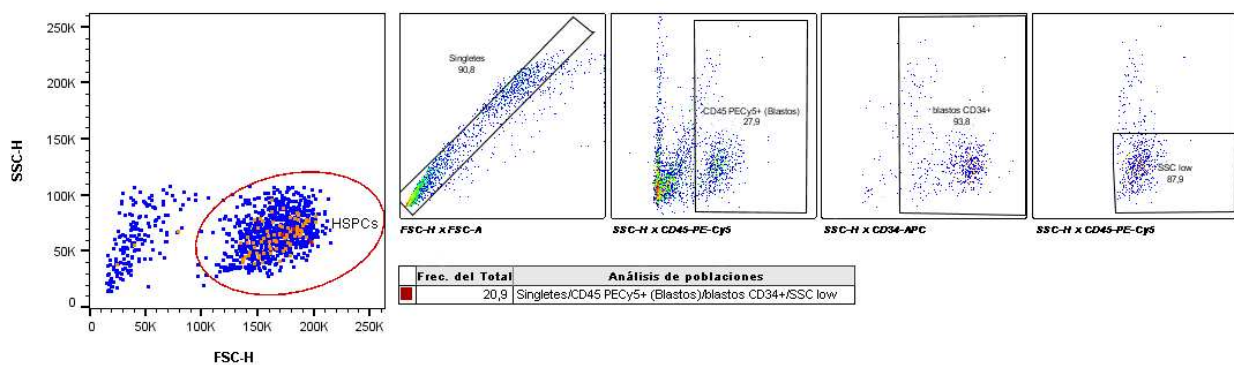


Fig. 19. Citometría de flujo. Gráficos de puntos del análisis efectuado a las células obtenidas: **A.** luego de la separación inmunomagnética basada en el marcador CD34; **B.** luego la separación celular por FACS de la población indicada como HSPCs (realizada a continuación del paso de separación inmunomagnética). Los dos cuadros de mayor tamaño muestran, dentro de marcadores elípticos, el último paso del análisis de poblaciones. Los cuadros de menor tamaño muestran, uno a continuación del otro, los pasos sucesivos de análisis que se efectuaron sobre la población celular total. En los rectángulos inferiores de A. y B. se indican los porcentajes de HSPCs respecto del total celular.

Así, se procedió a la separación por FACS: la fracción de células retenidas ($2,21 \times 10^6$ céls. viables) se marcó con los anticuerpos anti hCD34-APC y anti hCD45-PE-Cy5. Luego de la inmunomarcación, las células se resuspendieron en PBS y se analizaron en el equipo de FACS para establecer los parámetros de voltaje y compensación apropiados. A continuación se determinaron las poblaciones de interés, en este caso la población $CD34^+CD45^+SSC^{low}$ y ésta se separó de acuerdo a la fluorescencia emitida por las células marcadas. Posteriormente, se analizó la composición de la suspensión celular obtenida, constituida en un 20,9% por células $CD34^+CD45^+SSC^{low}$ (Figura 19.B). Si bien este porcentaje se incrementó considerablemente luego del paso de *sorting*, la pureza continúa siendo baja. Asimismo, la recuperación celular fue reducida, considerando que luego de ser mantenidas 5 d en medio de cultivo con factores de crecimiento, sólo se pudieron detectar unas 46.800 céls. viables.

Del mismo modo que en el caso de la separación directa por FACS, la incorporación de un paso previo de selección inmunomagnética no generó mejores resultados en relación a la recuperación y/o la pureza de la fracción celular de interés.

1.2.1.3. Selección inmunomagnética positiva

Tal como se mencionó en la sección 3.3.2.2 de *Materiales y Métodos*, en el procedimiento de enriquecimiento de HSPCs, las células marcadas con microperlas paramagnéticas conjugadas con un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno CD34 son seleccionadas en una columna ubicada en un campo magnético. Las células no marcadas pasan a través de la columna (fracción *no retenida* o NR) y las células marcadas retenidas pueden ser eluidas luego de remover la columna del imán (fracción *retenida* o R).

Si bien este sistema permite la separación de células viables y funcionalmente activas de manera rápida (en un tiempo de procesamiento menor a 3 h), en general la calidad de la muestra de MNCs de partida (estado de agregación, viabilidad y recuento total), así como el estado de los reactivos de purificación y el protocolo de aislamiento, pueden afectar sustancialmente la recuperación celular, la viabilidad y la pureza de la fracción R. De esta manera, se modificaron diversas variables del protocolo de purificación, para seleccionar aquellas condiciones que produjeran mejores resultados en cuanto a los parámetros previamente indicados (recuperación, viabilidad y pureza). Los protocolos analizados se detallan en la Tabla 13.

Los resultados obtenidos se resumen en el gráfico de dispersión de la Figura 20. En el caso del *protocolo A* (recomendado por el fabricante) se observa que el porcentaje de células CD34⁺ obtenido fue muy variable (rango: 2,3%-65,6%), mientras que la recuperación celular se encontró en un rango de 7.843-14.405 céls. R viables/10⁶ MNCs viables). Los protocolos B, C y D fueron ensayados por uniplicado. El *protocolo B* sólo introduce cambios en el número de lavados y el volumen de elusión, por lo que no se observa una gran mejoría en la pureza de la fracción R (66,3%) ni en la recuperación celular (5.876 céls. R viables/10⁶ MNCs viables).

Tabla 13. Protocolos evaluados para optimizar el proceso de purificación por selección inmunomagnética positiva de células CD34⁺ a partir de MNCs de SCU.

		PROTOCOLO				
		A	B	C	D	E
Post-descongelado	<i>Tratamiento con Benzonasa</i>	NO	NO	Incubación en IMDM-25 UI/ml durante 20 min a TA.	Incubación en IMDM-10% SFB-25 UI/ml durante 20 min a 37°C.	Incubación en IMDM-10% SFB durante 30 min a 37°C (concentraciones de enzima de 25; 12,5 o 6,25 UI/ml).
	<i>Volúmenes (μl)</i> <i>Fc Blocking</i> <i>Reagent: CD34</i> <i>Microbeads:</i> <i>Buffer MACS</i>	100:100:300	100:100:300	100:100:300	100:100:300	100:100:300
Primer paso de aislamiento	<i>Lavados</i>	3 x 500 μl	6 x 500 μl	4 x 500 μl	6 x 500 μl	6 x 500 μl
	<i>Elusión</i>	1 ml, realizando presión	2 ml, realizando presión	1 ml separando del imán + 1 ml realizando presión	1 ml separando del imán + 1 ml realizando presión	1 ml separando del imán + 1 ml realizando presión
	<i>Volúmenes (μl)</i> <i>Fc Blocking</i> <i>Reagent: CD34</i> <i>Microbeads:</i> <i>Buffer MACS</i>	NO	NO	25:25:300	NO	100:100:300
Segundo paso de aislamiento	<i>Lavados</i>	NO	NO	4 x 500 μl	NO	6 x 500 μl
	<i>Elusión</i>	NO	NO	500 μl separando del imán + 500 μl realizando presión	NO	1 ml separando del imán + 1 ml realizando presión
	<i>Volúmenes (μl)</i> <i>Fc Blocking</i> <i>Reagent: CD34</i> <i>Microbeads:</i> <i>Buffer MACS</i>	NO	NO	25:25:300	NO	100:100:300

Por esta razón, en el *protocolo C* se realizaron cambios más importantes en el protocolo: se incluyó un paso de tratamiento a TA con Benzonasa luego del descongelado de las MNCs, se modificó la técnica de elusión, realizando una primera elusión sin presión y una segunda elusión ejerciendo presión con el émbolo, de modo de someter a las células que puedan eluir más fácilmente a un menor estrés mecánico. Asimismo, se incluyó un segundo paso de purificación en el cual las células se marcaron con un volumen de microperlas menor que el empleado en el primer paso, para no realizar un consumo excesivo de reactivos. Se evaluó la pureza y recuperación celular de ambos pasos de purificación: en el primer paso se obtuvo una fracción de células R constituida en un 18,1% por células CD34⁺ y una recuperación de 38.000 céls. R viables/10⁶ MNCs viables; luego de someter a las células R a un segundo paso de

inmunomarcación y purificación, se obtuvo una suspensión con un 27,6% de células CD34⁺ y una recuperación celular de 23.444 céls. R viables/10⁶ MNCs viables.

Si bien se puede concluir que un segundo paso de purificación genera una mejora en la pureza de la fracción eluida y, concomitantemente, una reducción en la recuperación celular respecto de la muestra celular de partida, el porcentaje final de pureza continúa siendo bajo, posiblemente debido al uso de un volumen insuficiente de microperlas en la segunda purificación. Adicionalmente, se observa una mejora en la recuperación celular respecto de los protocolos A y B.

En el *protocolo D*, se efectuó un procedimiento de elusión en dos pasos y un tratamiento con Benzonasa, que en este caso se realizó a 37°C, sin efectuar un segundo paso de purificación. Dicha incubación a 37°C produjo una reducción más eficiente de los agregados macroscópicos. En este caso se obtuvo una fracción R con un 28,7% de células CD34⁺ y una recuperación celular de 32.000 céls. R viables/10⁶ MNCs viables. Si bien se trata de una única prueba, este protocolo permitió obtener una mayor recuperación celular, aunque aún se debe optimizar con el propósito de incrementar la pureza de la fracción eluida.

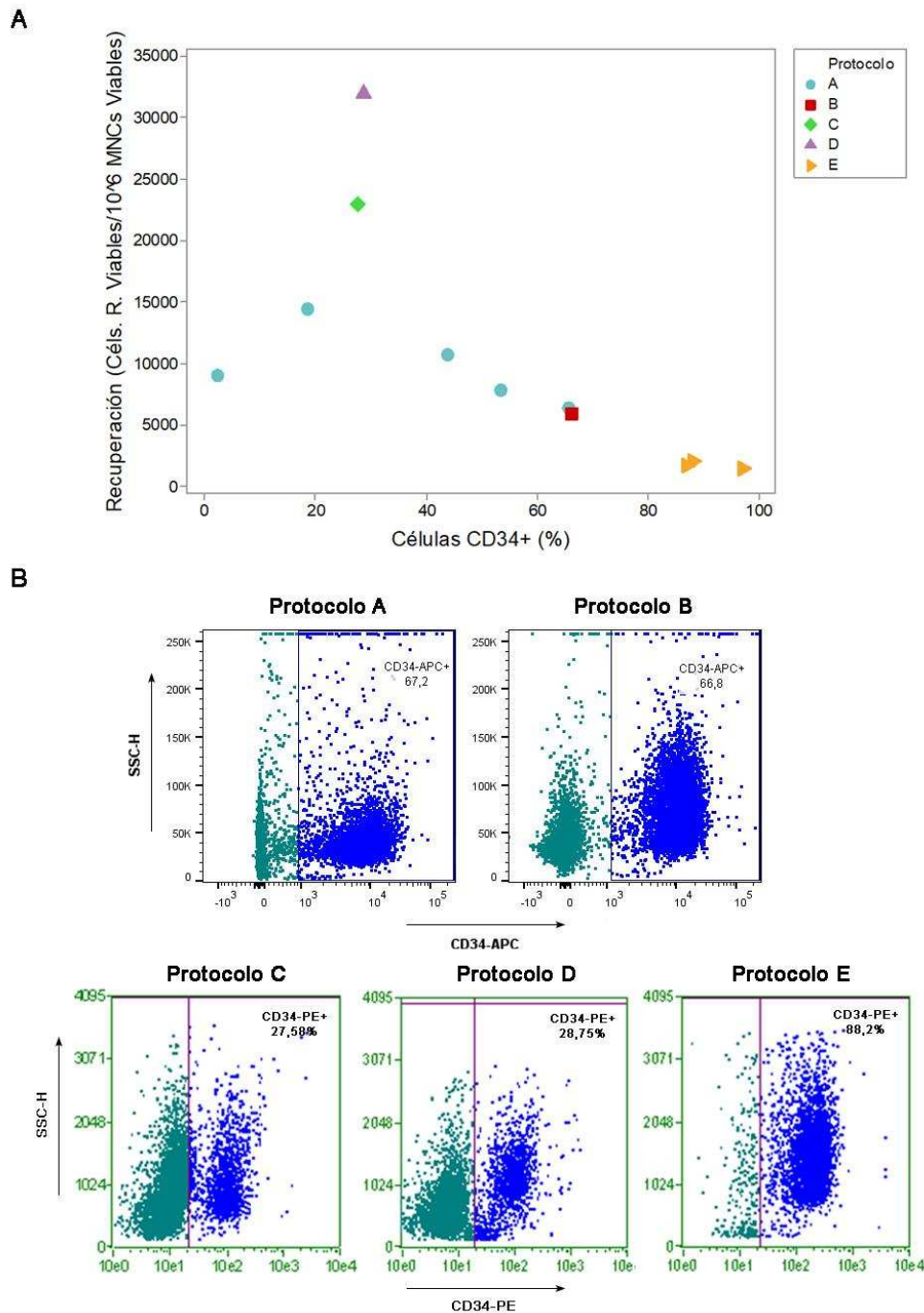


Fig. 20. Recuperación de células hematopoyéticas. A. Gráficos de dispersión de recuperación celular por protocolo. Recuperación celular (células viables/10⁶ MNCs viables) en función de Células CD34+ (%) para los diferentes protocolos de separación inmunomagnética evaluados. Cada punto representa los resultados obtenidos para una prueba de purificación. Cada uno de los protocolos empleados se grafica con un ícono diferente: Protocolo A (●), Protocolo B (■), Protocolo C (◆), Protocolo D (▲) y Protocolo E (▶). **B.** Citometrías de flujo. Ejemplos de gráficos de puntos (SSC-H vs. CD34-APC/CD34PE) obtenidos a partir de las fracciones R obtenidas con los diferentes protocolos analizados. Estos gráficos permiten el análisis de la pureza de las suspensiones celulares; así, en cada *dot plot* se indica la población CD34+ y la frecuencia correspondiente.

En el *protocolo E* se incluyeron las siguientes modificaciones: el tratamiento con benzonasa durante 30 min a 37°C, la incorporación de un segundo paso de purificación, en este caso realizando la inmunomarcación con los volúmenes de microperlas y bloqueante indicados por el fabricante. Ambos procedimientos de purificación incluyeron una elusión en dos pasos, realizando presión con el émbolo sólo en el segundo de ellos. Para este protocolo se realizaron tres pruebas empleándose diferentes concentraciones de Benzonasa luego del descongelado. Se determinaron la pureza y la recuperación luego de la primera y segunda purificación. Luego del primer paso se obtuvieron purezas de entre 37,3% y 58,1% y recuperaciones de entre 5.400 y 6.144 céls. R viables/10⁶ MNCs viables. Al finalizar el segundo paso de aislamiento se obtuvieron fracciones celulares con purezas de entre 87% y 96,4% y recuperaciones de entre 1.405 y 1.980 céls. R viables/10⁶ MNCs viables. Como se observa, el incremento de la pureza de las fracciones celulares obtenidas luego de la separación inmunomagnética ocurre en detrimento de la recuperación celular. Sin embargo, es importante mencionar que empleando el protocolo E los parámetros analizados presentaron variabilidad reducida, a pesar de tratarse de muestras diferentes y de que el tratamiento con benzonasa se efectuó en cada una de las pruebas con una concentración diferente de enzima (24; 12,5 y 6,25 UI/ml), lo que indicaría que los resultados obtenidos no dependen de la concentración de benzonasa utilizada para la reducción de la agregación celular, pudiéndose emplear en futuras aplicaciones la menor concentración analizada. Así, el protocolo E es el más apropiado debido a la pureza elevada y la viabilidad apropiada de las fracciones celulares recuperadas.

Desarrollo de condiciones de cultivo para la producción de células eritroides a partir de HSPCs

2. DESARROLLO DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS ERITROIDES A PARTIR DE HSPCs

2.1. CULTIVO DE HSPCs EN MEDIO DE PRODUCCIÓN ERITROIDE DE REFERENCIA (MePERef)

Inicialmente, consideramos apropiado conocer el comportamiento de las HSPCs, es decir, la factibilidad y capacidad de expansión y diferenciación eritroide, en un medio de producción adaptado en nuestro laboratorio. El mismo se preparó a partir de la composición del medio descrita en el estudio que constituyó la prueba de principio para la transfusión de GRs generados *in vitro* [50]. Sin embargo, suelen ocurrir variaciones de un laboratorio a otro en cuanto a las condiciones de cultivo y manipulación. Asimismo, la variabilidad intrínseca del material celular de partida y de los reactivos (de diferentes proveedores y que, probablemente, presentan variaciones en su pureza y contaminantes), pueden repercutir en la manera en que procede un cultivo primario.

De este modo, se procedió como se indicó en el apartado 5.1 de la sección *Materiales y Métodos*.

2.1.1. Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular

Inicialmente se preparó una suspensión de MNCs de dos muestras de SCU mediante el descongelado de crioviales a partir del banco celular de trabajo. Una vez que se obtuvo una suspensión libre de DMSO, se realizó recuento y determinación de la viabilidad celular en cámara de Neubauer. Se obtuvieron dos suspensiones celulares: M1, con $6,3 \times 10^7$ céls. viables y 89% de viabilidad, y M2, con $3,15 \times 10^7$ céls. viables y 87,5% de viabilidad. De este modo, se recuperaron $9,45 \times 10^7$ MNCs viables totales.

Puesto que la suspensión presentó agregación celular debida al proceso de descongelado, la misma se trató con benzonasa y luego se procedió al aislamiento de células CD34⁺ por separación inmunomagnética de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado 3.3.2.2. En este caso, debido al elevado número de MNCs totales a sembrar en las columnas MS, cada una de las muestras por separado se incubó con 100 μ l de cada reactivo de marcación y se separó en una columna (es decir, se emplearon dos columnas para realizar la purificación de HSPCs). Al finalizar, se mezclaron las fracciones R y, por otro lado, las fracciones NR obtenidas a partir de las dos columnas. Se analizó la recuperación celular por recuento en cámara de Neubauer y se determinó el porcentaje de céls. CD34⁺ en la fracción R, obteniéndose $2,626 \times 10^6$ céls. viables totales (esto es, 27.790 céls. viables/ 10^6 MNCs), con una pureza de 85% céls. CD34⁺ (Figura 21). Así, puesto que la pureza de la fracción R fue elevada (>80% CD34⁺) no fue necesario efectuar un segundo paso de purificación, ya que, si bien el mismo podría mejorar levemente la pureza de la suspensión, esto sería en detrimento de la recuperación celular total.

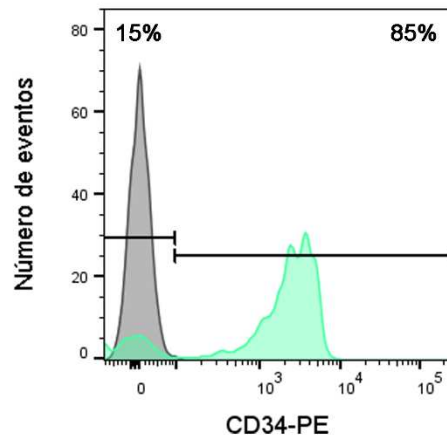


Fig. 21. Citometría de flujo. Histograma (Número de eventos vs. Intensidad de fluorescencia de eventos marcados con anti hCD34-PE) obtenido mediante análisis de la fracción R. El histograma verde representa el anticuerpo monoclonal (mAb) relevante y el gris representa el control. Las estadísticas mostradas corresponden a la muestra de interés marcada con el mAb relevante. La pureza de la fracción luego de un paso de separación inmunomagnética resultó de 85%, por lo cual fue empleada como fuente celular para los cultivos en MePERef.

2.1.2. Desarrollo y caracterización de los cultivos en MePERef

Una vez purificadas, las células se cultivaron ON en condiciones basales (sin el agregado de factores de crecimiento). Luego, se inició el cultivo en las condiciones correspondientes (MePERef 0-7), efectuándose 4 cultivos independientes con una densidad celular inicial de 30.000 céls. CD34⁺/ml en placas de 6 pozos (3 ml de volumen de trabajo). Los cultivos en medio MePERef se llevaron adelante en 3 etapas y en cada una de ellas el medio MePERef se suplementó de manera diferencial de acuerdo a las necesidades de expansión, compromiso y diferenciación para lograr la producción de células eritroides, tal como se detalla en el apartado 5.1 de *Materiales y Métodos*. La Figura 22 muestra un gráfico que resume el procedimiento de cultivo y los análisis efectuados en cada etapa.

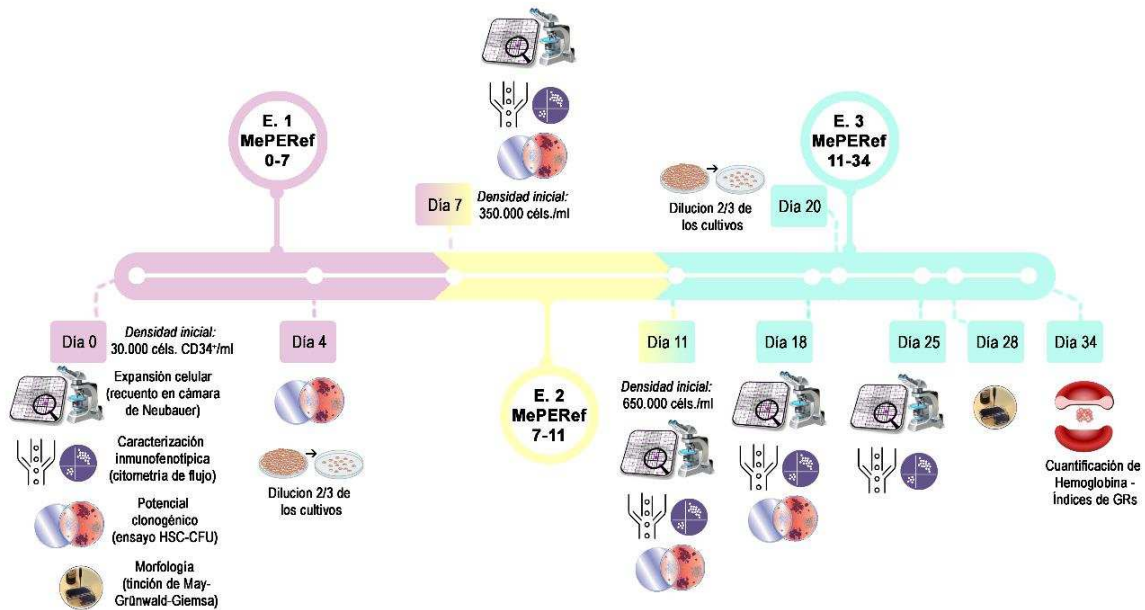


Fig. 22. Representación esquemática de la estrategia de trabajo. Esquema gráfico del proceso de cultivo de HSPCs en MePERef en el cual se indican los análisis realizados en cada etapa.

2.1.2.1. Estudio de la expansión celular

Con el objetivo de normalizar los resultados, la generación de eritroblastos en cultivo es expresada como incremento de veces, es decir, la relación entre el número de células observadas en un día determinado y el número empleado para iniciar el cultivo [55].

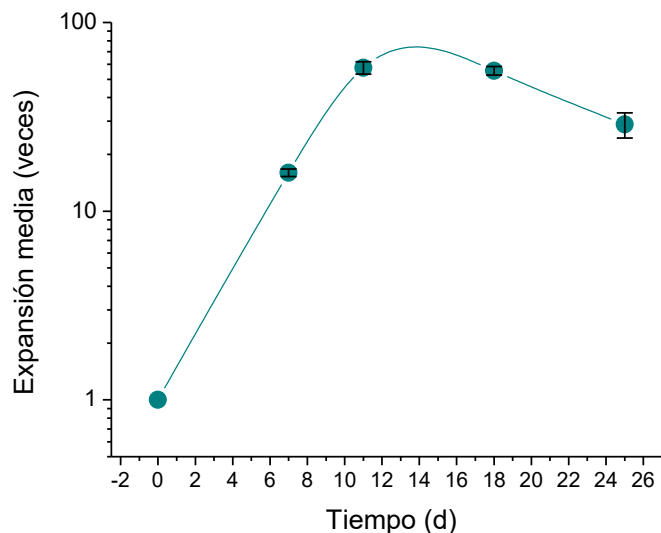


Fig. 23. Amplificación celular media. Expansión celular en MePERef, expresada como incremento en veces del número celular, en función del tiempo de cultivo (d). Los valores indicados son la media \pm D.E. en escala logarítmica ($n=4$).

En este caso, la expansión celular acumulada (desde el día de inicio de los cultivos) creció exponencialmente, sin que se observe una marcada fase de adaptación de las células al medio en el rango de tiempo inicial evaluado, y alcanzó un máximo de amplificación media de 57,6 veces (rango: 53,5-61,8) el día 11. A partir de este

momento, el crecimiento se detuvo: el día 18 la amplificación media acumulada disminuyó levemente y fue de 55,5 veces (rango: 52,4-59,2), si bien la viabilidad se mantuvo constante y con un valor medio de 97,0%. Hacia el día 25, la viabilidad comenzó a reducirse (media: 92,8%), del mismo modo que la expansión celular acumulada, la cual tuvo un valor medio de 28,8. Estos resultados se indican en la Figura 23.

2.1.2.2. Estudio del potencial clonogénico

Como se mencionó previamente, el estudio del potencial clonogénico de las células presentes a lo largo de los cultivos realizados en MePERef se evaluó en medio MACS HSC-CFU completo con EPO (Miltenyi Biotec, Inc.). La determinación del tipo y número de precursores presentes en el cultivo en un determinado momento permite inferir qué tipo de células maduras se generarán una vez que dichos precursores se diferencien. Asimismo, la presencia de precursores más inmaduros (es decir, de aquellos que se encuentran al inicio de las jerarquías celulares) puede relacionarse con una mayor capacidad proliferativa de las poblaciones. La Figura 24 indica los resultados obtenidos en estos cultivos y la Figura 25 muestra imágenes representativas de las colonias obtenidas.

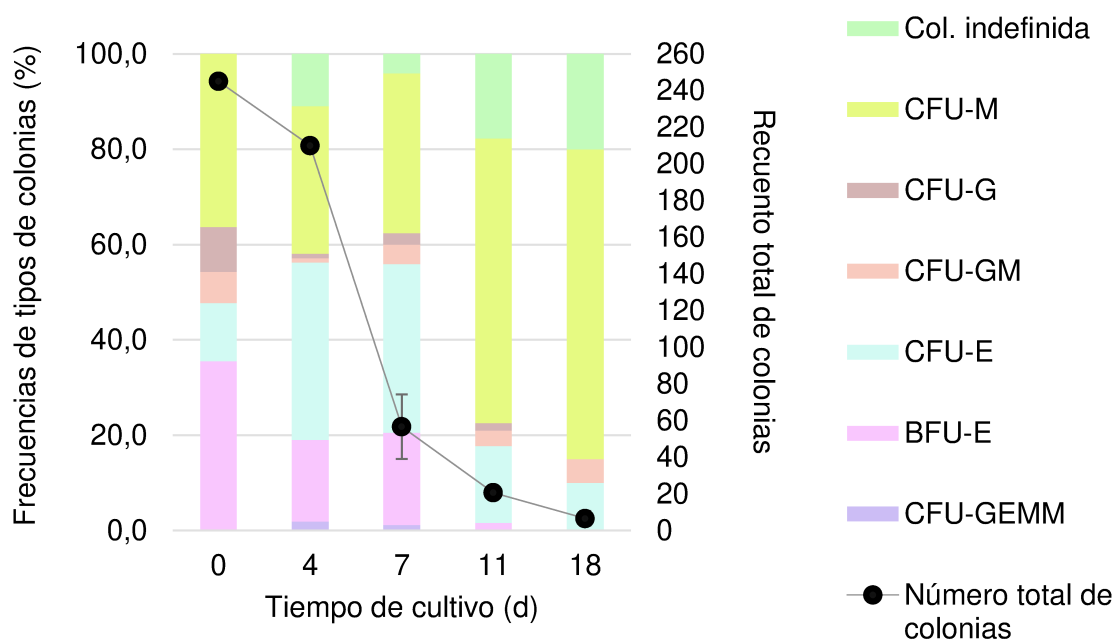


Fig. 24. Ensayos de formación de colonias. Análisis de CFUs presentes en cultivos en MePERef. Las barras muestran las frecuencias de los diferentes tipos de precursores presentes a lo largo de los cultivos (porcentajes promedio; para los días 0 y 4, n=1; para los días 7, 11 y 18, n=3). Los círculos negros indican el número total de colonias presentes en las placas de cultivo HSC-CFU, con sus respectivas D.E. (para los días 0 y 4, n=1; para los días 7, 11 y 18, n=3). *Col. indefinida* indica grupos de células, en general unas pocas, que no presentan la morfología típica de ninguna CFU y que por lo tanto no han podido ser clasificadas.

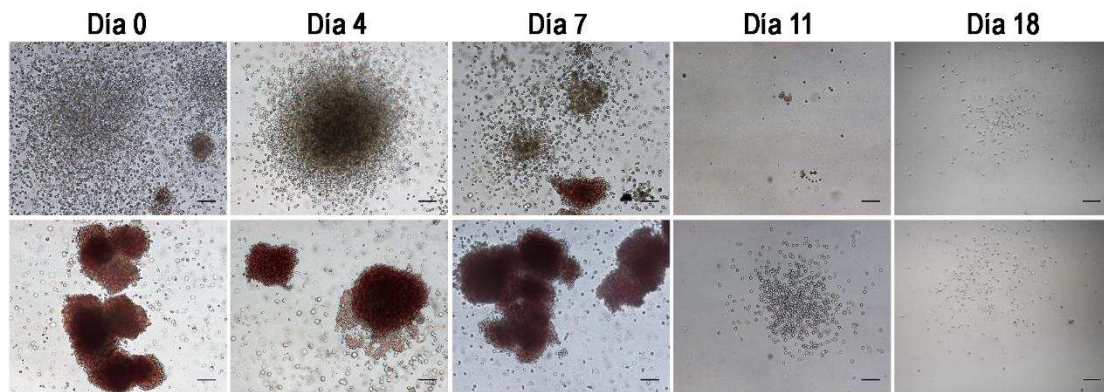


Fig. 25. Microscopías ópticas. Micrografías representativas de colonias obtenidas a partir de células cultivadas en MePERef en diferentes días de cultivo. Se observan colonias de diferente tipo (BFU-E, CFU-E, CFU-GM, CFU-M y Colonias indefinidas). Las barras de escala indican 100 μm (magnificación 100X).

A partir de ambas figuras es posible observar que el potencial clonogénico total de la suspensión disminuye a medida que transcurre el cultivo, ya que se denota una disminución del número total de colonias, que presenta un máximo en el día 0 de cultivo de 245, disminuye más abruptamente entre los días 4 y 7 de cultivo y llega a un mínimo de 6 colonias (rango de 3-11) el día 18 (habiéndose sembrado 550 céls. totales/cultivo). El potencial de formación de colonias observado en el día 0 (520 CFUs totales por 1000 células CD34⁺) fue superior al esperado de 84,5/ 1000 céls. CD34⁺ [33]. Además de la reducción de la capacidad clonogénica de las células en cultivo, se evidencia un incremento en el número de colonias de muy reducido tamaño y baja densidad, cuya clasificación no fue posible.

El porcentaje de BFU-E disminuye progresivamente hasta el día 18, en que se hace nulo. Esto demuestra un elevado potencial eritroide al principio de los cultivos, en el que predominan los precursores más primitivos (35,5%), frente a los CFU-E (12,2%). Esto indica que los precursores presentes tienen una elevada capacidad proliferativa, de respuesta a EPO y de compromiso hacia el linaje eritroide, lo que también se demuestra por el gran tamaño y densidad celular que muestran las colonias eritroides.

Luego de 4 días de cultivo, el porcentaje de BFU-E disminuyó y se incrementó el de CFU-E, lo que evidencia una maduración de los precursores eritroides hacia el siguiente estadio de diferenciación. La frecuencia máxima de CFU-E se obtuvo en los días 4 y 7 de cultivo, siendo éstos de 37,1 y 35,3%.

En cuanto a los progenitores más primitivos, los CFU-GEMM, se observa que su frecuencia es baja incluso en el inicio de los cultivos (porcentajes de 1,9 y 1,2% en los días 4 y 7). Esta baja frecuencia habría dificultado su detección en el día 0, sin embargo en los días 11 y 18 la ausencia de los mismos está más probablemente vinculada a la diferenciación de los precursores inducida por los factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo.

Por otro lado, el incremento en el porcentaje de CFU-M a lo largo del cultivo, desde 36,3% en el día 0 hasta 65% en el día 18, no resultaría favorable para alcanzar los objetivos buscados.

2.1.2.3. Caracterización inmunofenotípica y morfológica

La caracterización inmunofenotípica, realizada mediante citometría de flujo, conjuntamente con un análisis morfológico, efectuado por tinción de May-Grünwald-Giemsa, permite conocer el tipo de células (poblaciones celulares) presentes en los cultivos en sus diferentes etapas y, de este modo, definir más adecuadamente qué condiciones deben ser mejoradas para obtener los productos celulares de interés.

De esta manera, mediante análisis multiparamétrico realizado en los días 0, 7, 11, 18 y 25 de cultivo en MePERef, se evaluaron los marcadores de superficie celular CD34 (células madre/progenitoras hematopoyéticas), CD45 (marcador leucocitario), CD71 (receptor de transferrina, que controla el suministro de hierro en diferentes tipos de células y es altamente expresado por células eritroides) y CD235a (Glicoforina A, expresado por precursores eritroides y eritrocitos). Los perfiles de expresión obtenidos se muestran en las Figuras 26 y 27.

La caracterización indica que el porcentaje de células que expresan el marcador CD34 disminuye rápidamente durante la primera semana de cultivo en MePERef 0-7, alcanzando el mínimo el día 11 de cultivo (Figura 26.A). Esto se relaciona probablemente con la presencia en el medio, desde el inicio, de factores que inducen diferenciación celular, como hEPO.

Adicionalmente, el porcentaje de células CD45⁺ también presenta un máximo (92,2%) en el día 0 de cultivo y se reduce progresivamente hacia el día 25, hasta un valor mínimo de 42 ± 2 % (Figura 26.A). Esto también se constata en la Figura 27 (gráficos de puntos de CD45 vs. CD34), donde se evidencia un corrimiento de la población hacia el eje y, debido a una disminución en la expresión de CD34. Pero también se observa que disminuye la proporción de la población CD45⁺ a la vez que se incrementa la CD45⁻. Estos cambios se correlacionarían con la maduración de las células progenitoras a eritroblastos tempranos, por ejemplo.

En la Figura 27 también es posible observar que un elevado porcentaje de los leucocitos y de las células CD34⁺ (en el día 0) co-expresan el marcador CD71. Debido a que este último desempeña una función crítica en la proliferación celular ya que controla el suministro de hierro, que es esencial para muchas rutas metabólicas, es mayormente expresado por células del linaje eritroide (el receptor CD71 se encarga de la unión y la endocitosis de transferrina). Sin embargo, también es expresado por los

linfocitos T y B activados, los macrófagos y otras células en proliferación [164]. Así, es probable que esta sea la razón por la que existe una co-expresión de CD71 en células CD34⁺ y CD45⁺, cuya expansión se encuentra inducida por los factores de crecimiento presentes en el medio.

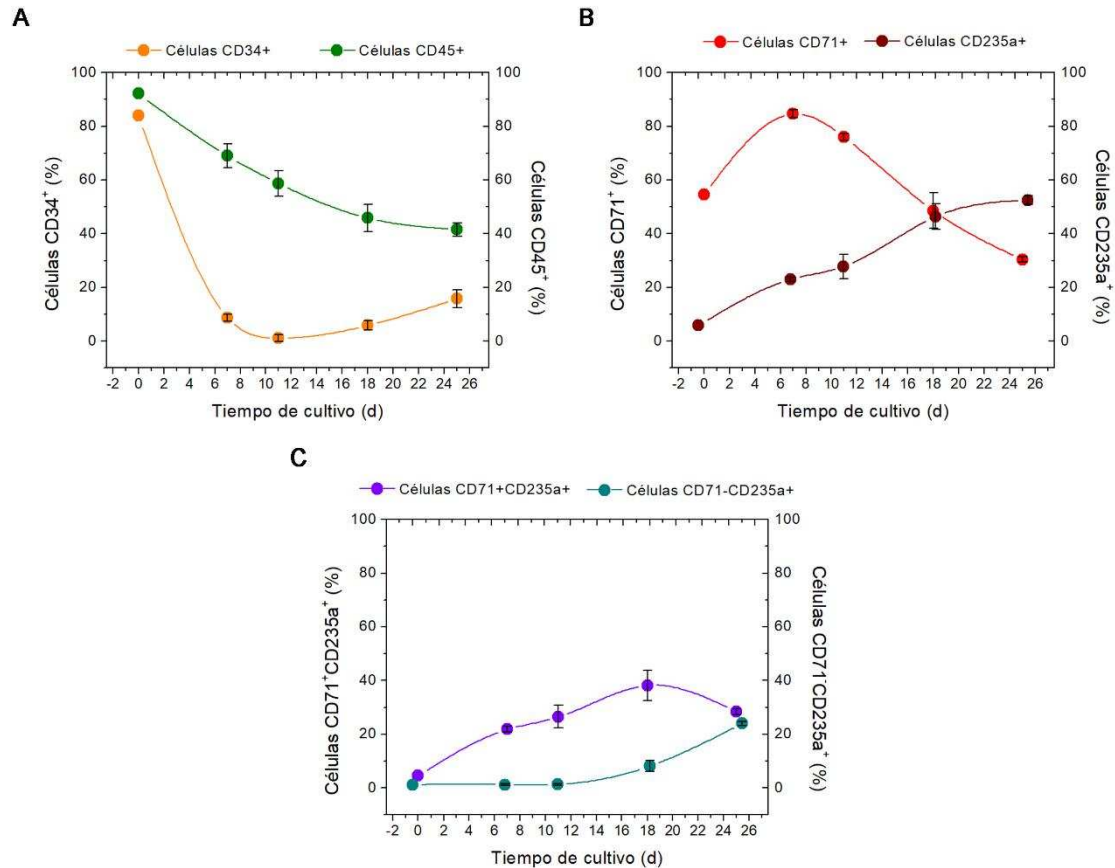


Fig. 26. Caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo. Los paneles muestran los porcentajes de las poblaciones celulares de interés presentes a lo largo del cultivo en MePERef. Los resultados se expresan como porcentajes medios \pm D.E. (n=4). **A.** Células CD34⁺ y células CD45⁺; **B.** células CD71⁺ y células CD235a⁺; **C.** células CD71⁺CD235a⁺ y células CD71⁻CD235a⁺.

Esto se vincula con el incremento en la proporción de células que expresan el marcador CD71, que se produce desde el día 0 (54,7%) al día 7 (85 ± 1 %) (Figura 26.B). Asimismo, el cambio del MePERef 0-7 a MePERef 7-11 (el cual no contiene hidrocortisona ni hIL-3, que estimulan el crecimiento celular e inhiben la diferenciación), se correlacionaría con la reducción progresiva observada de la expresión de la proteína CD71. Dicho cambio de composición del medio induciría una diferenciación celular paulatina. La proporción de células CD71⁺ se reduce más rápidamente desde el día 11, en que se reemplaza el medio por MePERef 11-34, hasta hacerse mínimo en el día 25 (30 ± 1 %). Mediante este cambio de medio de cultivo se remueve el hSCF que también puede inhibir la diferenciación eritroide. De esta manera, la maduración eritroide progresiva de las células en cultivo también se evidencia por la adquisición gradual del

marcador CD235a, desde un valor inicial mínimo de 5,8% hasta un máximo de 52 ± 2 % en el día 25 (Figuras 26.B y 27).

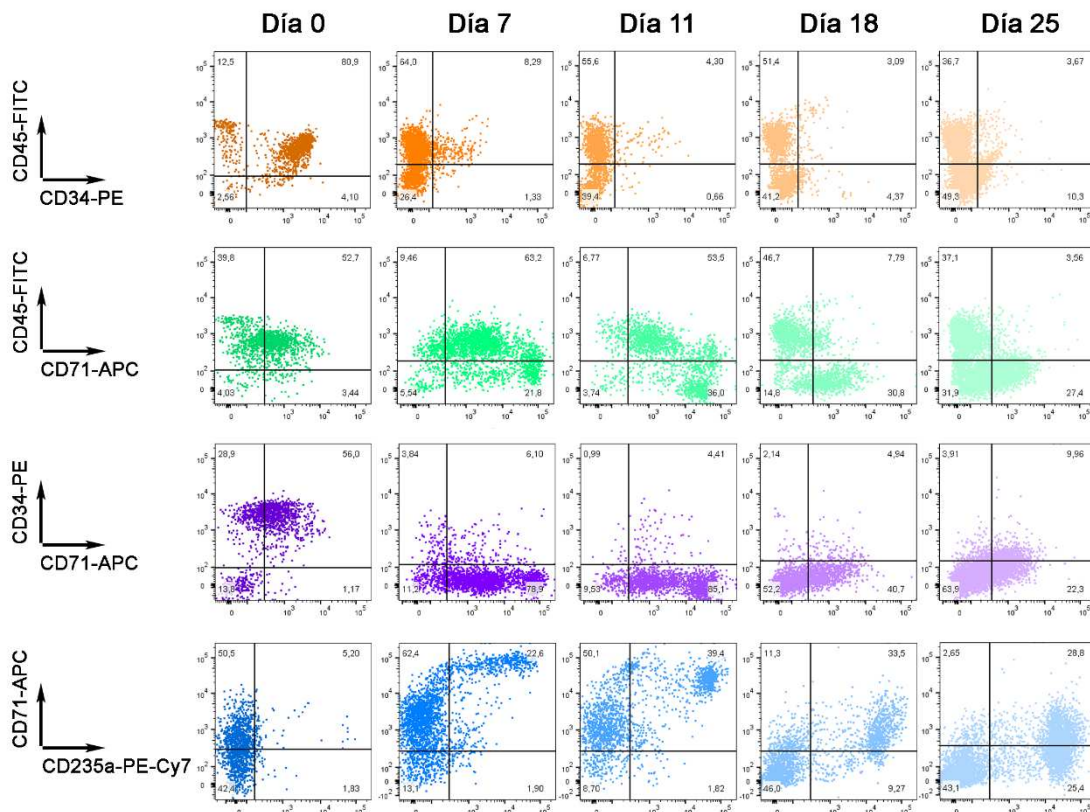


Fig. 27. Caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo. Progresión de la co-expresión de CD45-CD34, CD45-CD71, CD34-CD71 y CD71-CD235a de las células cultivadas en MePERef. Se muestran los gráficos de puntos de un cultivo representativo.

En la Figura 26.C se denota que la población en cultivo progresa desde un fenotipo no-eritroide o eritroide temprano (en el día 0 sólo se observa un 4,6% de células CD71⁺CD235a⁺ y un 1,2% de células CD71⁻CD235a⁺) hasta adquirir progresivamente el inmunofenotipo característico de eritroblastos intermedios CD71⁺CD235a⁺. La máxima proporción de células con este fenotipo se detectó en el día 18 y luego comenzó a disminuir, lo cual podría atribuirse a la maduración de los eritroblastos.

Asimismo, a partir de la Figura 26.C es posible notar que la población purificada a partir de la cual se iniciaron los cultivos, presentó un porcentaje mínimo de contaminación con glóbulos rojos maduros (1,2%). Por otro lado, con el cambio de medio a MePERef 11-34 en el día 11 de cultivo, se comienza a producir un incremento en el porcentaje de células eritroides maduras (GRs), caracterizados por el fenotipo CD71⁻CD235a⁺: desde el día 0 a 11 la proporción de los mismos se mantuvo aproximadamente constante alrededor de 1,2% y, desde este momento, comenzó a incrementarse hasta maximizarse en el día 25 ($24,0 \pm 0,8$ %).

Si bien mediante esta caracterización se comprobó la proliferación y producción eritroide, el porcentaje final de células maduras resultó bajo. En el momento de evaluación final también se detectó un porcentaje elevado de células con fenotipo leucocitario (CD45⁺).

Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante análisis morfológico (por tinción de May-Grünwald-Giemsa) de las células presentes en cultivo en MePERef los días 0 y 28. Como se puede evidenciar en la Figura 28.A, en el inicio de los cultivos, las células presentaron una morfología característica de MNCs agranulares basofílicas, de un tamaño relativamente homogéneo y núcleos grandes, mientras que en el día 28 la morfología celular es más heterogénea. Se evidencian reticulocitos y glóbulos rojos, poco frecuentes, así como algunos eritroblastos ortocromáticos (pequeños y con núcleos excéntricos). También se observa una elevada proporción de leucocitos basofílicos, entre ellos precursores megacariocíticos y macrófagos. Por otro lado, en la Figura 28.B se muestra la evidencia macroscópica de la diferenciación eritroide lograda, en *pellets* de cultivos (día 11).

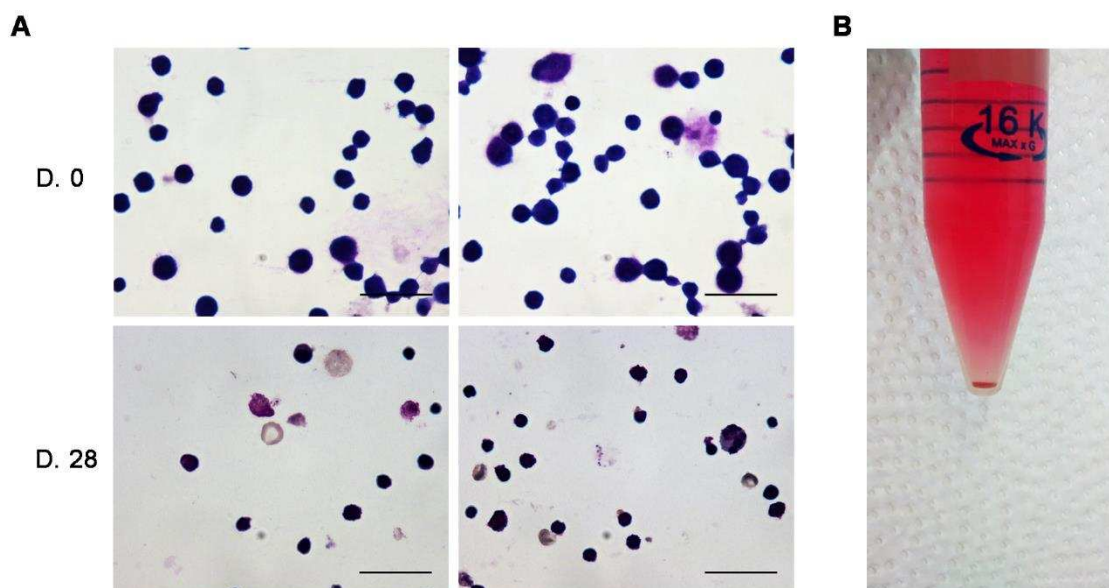


Fig. 28. Diferenciación celular. **A.** Microscopías ópticas. Análisis morfológico de las células presentes en los cultivos en MePERef. Se muestran tinciones de May-Grünwald-Giemsa de cultivos representativos (días 0, arriba, y 28, abajo). Las barras de escala indican 50 μm (magnificación 1000X). **B.** Fotografía de *pellet* celular. Obtenida a partir de un cultivo representativo (D. 11).

2.1.2.4. Cuantificación de hemoglobina e índices de glóbulos rojos

Para la cuantificación de HGB y demás parámetros de glóbulos rojos mediante el método automático (contador hematológico) se partió de una suspensión celular de 182.000 céls. viables/ml. La misma se concentró mediante centrifugación alrededor de 540 veces. A pesar del paso de concentración, el análisis reveló que la mayoría de los

parámetros se encontraban en los límites del rango de cuantificación del equipo, por lo que los resultados aquí indicados constituyen una aproximación. Así, se determinó mediante esta técnica que la suspensión (día 34) contenía de manera aproximada:

- GRs/ml: 55.560 (concentración en la suspensión inicial)
- HGB: 0 g/dl
- Hematocrito: 0,2%

Los parámetros de VCM, HCM y CHCM tampoco pudieron ser definidos por el equipo. Por esta razón se intentó cuantificar el contenido de HGB en la suspensión mediante el método manual de cianometahemoglobina modificado, empleando la suspensión concentrada, pero en este caso tampoco fue posible ya que la absorbancia a 540 nm obtenida para la muestra pura, luego del agregado del reactivo cromógeno, fue inferior al límite inferior del rango lineal de cuantificación.

2.2. DESARROLLO DE UN NUEVO MEDIO DE PRODUCCIÓN ERITROIDE

Como se demostró previamente, la producción y diferenciación eritroide alcanzadas en nuestro laboratorio empleando el MePERef adaptado a partir del medio de cultivo publicado por Giarratana y col. (2011) [50] no fueron altamente satisfactorias, sino considerablemente menores que las reportadas en este trabajo. La expansión celular máxima acumulada reportada fue de 62.000 ± 8.000 veces para las células CD34⁺, mientras que en nuestro caso se obtuvo una expansión de 58 ± 4 veces para las células totales; además, el porcentaje de reticulocitos determinado por citometría con naranja de tiazol fue de $87 \pm 4\%$ en el trabajo de Giarratana y col. y, en nuestro caso, el porcentaje máximo alcanzado de células maduras CD71⁺CD235a⁺ fue de $24,0\% \pm 0,8\%$. De esta manera, se consideró relevante explorar nuevas combinaciones de factores de crecimiento empleados en los cultivos, con vistas a mejorar estos parámetros de interés para la producción de células eritroides. Dichas combinaciones fueron evaluadas de acuerdo a una estrategia de Diseño de Experimentos (DoE), que implican la aplicación secuencial de etapas de selección de factores, optimización de los niveles de los mismos y confirmación del modelo obtenido. De esta manera se pretende lograr una apropiada expansión y una diferenciación selectiva hacia el linaje eritroide de las HSPCs durante la primera semana de cultivo.

2.2.1. Selección de factores (suplementos de cultivo) significativos para la expansión de HSPCs

Se encuentra descripto que *in vivo* varios factores de crecimiento ejercen efectos en combinación con otras moléculas; tal es el caso, por ejemplo, de la insulina y el SCF. Sin embargo, y considerando que uno de los objetivos de este trabajo es optimizar un

medio de cultivo para el crecimiento y posterior diferenciación eritroide de HSPCs, no es de nuestro conocimiento en qué medida la interacción entre suplementos de cultivo puede resultar estadísticamente significativa para las respuestas buscadas.

Por lo tanto, es de interés conocer qué factores son significativos y, al mismo tiempo, verificar si algunas interacciones serían significativas o no, validando así el cálculo de los efectos principales.

El diseño factorial elegido en el presente trabajo para seleccionar los factores que tienen mayor influencia sobre la expansión de las HSPCs (durante la primera semana de cultivo) fue el diseño de *Plackett-Burman* (PB). Se trata de un diseño ortogonal a dos niveles extremadamente económico desde el punto de vista del número de corridas experimentales. Un diseño de PB de 12 experimentos, por ejemplo, permite estudiar hasta 11 factores. En comparación, un diseño factorial completo a dos niveles requiere de 32 corridas para 5 factores, 64 para 6 factores, etc. [165].

Sin embargo, este diseño sólo puede estimar los factores principales, ya que los términos que tienen en cuenta asociaciones entre ellos se encuentran confundidos con los efectos principales o con otras asociaciones. Por esta razón, la validez de los diseños de PB para estimar los efectos de los factores principales depende de la suposición de que los efectos de las interacciones son despreciables. Pero los límites de esta suposición no han sido precisamente establecidos y existe dificultad para conocer las interacciones de antemano [165].

Así, se decidió emplear un diseño de PB para 11 factores con 3 puntos centrales. De este modo, las corridas experimentales se limitaron a 15 evaluándose un elevado número de factores, lo que redundó en un análisis económico y eficiente, dos aspectos que son muy importantes en este tipo de cultivos por el elevado costo de los insumos. Complementariamente al uso de PB, para analizar la potencial existencia de efectos significativos de las interacciones entre factores se empleó un Algoritmo Genético (AG). Los AG son técnicas de optimización numérica que imitan los procesos de selección natural. Emplean aproximaciones de cuerdas binarias (cromosomas), que contienen genes que codifican las variables experimentales [165]. Los resultados obtenidos en este proceso de *screening* se detallan en los siguientes apartados.

2.2.1.1. Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular

Inicialmente se preparó una suspensión de MNCs a partir de una muestra de SCU mediante separación en gradiente de densidad con Ficoll (apartado 3.3.1. de la sección *Materiales y Métodos*). A continuación, se realizó recuento y determinación de la viabilidad celular en cámara de Neubauer. Se obtuvo una suspensión celular con 1×10^8 céls. viables y 100% de viabilidad.

Puesto que se trataba de una muestra de MNCs utilizada inmediatamente luego de la extracción de SCU y su enriquecimiento, la suspensión no presentó agregación celular ya que no fue sometida a los procesos de congelación y descongelación. Por lo tanto, no fue necesario su tratamiento con Benzonasa.

Posteriormente, se procedió al aislamiento de células CD34⁺ por SI de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado 3.3.2.2. En este caso, debido a que el número de MNCs totales a sembrar sería de 10⁸ o superior, la suspensión se incubó con 200 μ l de cada reactivo de marcación (en 600 μ l de buffer MACS) y se separó en una columna. Al finalizar, se analizó la recuperación celular y se determinó el porcentaje de células CD34⁺ en la fracción R, obteniéndose 540.000 células viables totales (esto es, 5.400 células viables/10⁶ MNCs), con una pureza de 57,1% células CD34⁺ (Figura 29.A). Así, puesto que la pureza de la fracción R fue menor a 80%, las células R fueron sometidas a otro paso de SI, realizado en idénticas condiciones que el primer paso. En este caso se obtuvieron 170.000 células viables totales (es decir, 1.700 células viables/10⁶ MNCs), con una pureza de 86,5% células CD34⁺ (Figura 29.B), lo cual se consideró adecuado para iniciar el experimento. Puede evidenciarse que el importante incremento logrado en la pureza de la fracción R fue acompañado de una reducción sustancial en la recuperación celular.

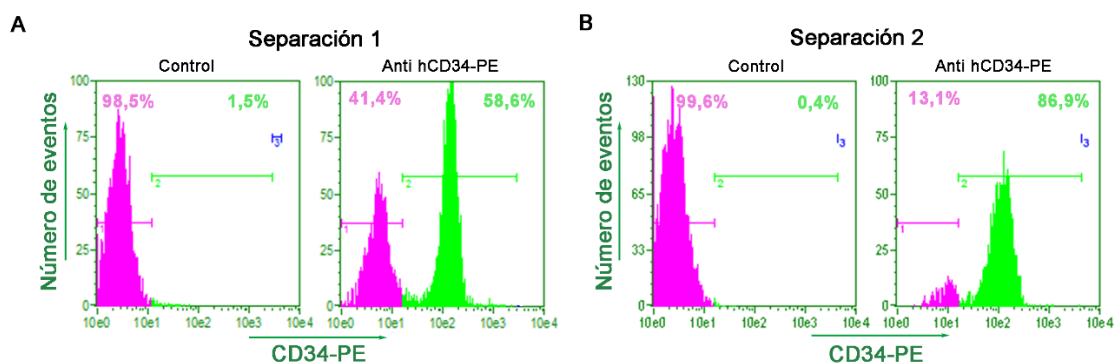


Fig. 29. Citometrías de flujo. Histogramas (Número de eventos vs. Intensidad de fluorescencia de eventos marcados con anti hCD34-PE) obtenidos mediante análisis de las fracciones R de: **A.** el primer paso de purificación y **B.** el segundo paso de SI. Se muestran los histogramas correspondientes a los controles y a las fracciones R marcadas. La pureza de la fracción luego de un segundo paso de separación inmunomagnética se incrementó desde 57,1% a 86,5%, por lo cual fue empleada como fuente celular para las diferentes corridas del paso de *screening* de factores.

2.2.1.2. Experimentos factoriales

Una vez purificada la fracción CD34⁺, se iniciaron los cultivos con suplementación variable de acuerdo a la composición indicada para cada corrida experimental. Los factores y niveles de factores analizados en cada una de ellas se detallan en la Tabla 8 de *Materiales y Métodos*. En cada caso, el cultivo se efectuó en placa de 48 pozos, en un volumen de 500 μ l, y con una concentración celular inicial de

17.400 céls. CD34⁺ viables/ml. Luego de los 7 días de cultivo en condiciones estándar, sin cambios de medio, dilución ni suplementación, se analizó el porcentaje de células CD34⁺ y la tasa de expansión de las mismas. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla (Tabla 14); además se muestran en la Figura 30 citometrías representativas de las respuestas obtenidas por citometría de flujo.

Tabla 14. Valores obtenidos para las dos respuestas analizadas en el día 7 de cultivo (etapa de selección de factores influyentes en la expansión de HSPCs): Porcentaje de células CD34⁺ y Expansión de células viables CD34⁺ (veces) según el orden de corrida.

Corridas	Células CD34 ⁺ (%)	Expansión de células viables CD34 ⁺ (veces)
1	59,2	0,5
2	37,3	2,1
3	47,6	1,8
4	42,8	1,8
5	40,9	0,9
6	30,2	1,0
7	40,1	2,1
8	40,2	1,6
9	36,2	1,8
10	33,6	1,6
11	47,8	2,0
12	32,8	2,2
13	54,1	0,3
14	21,7	1,2
15	32,2	1,3

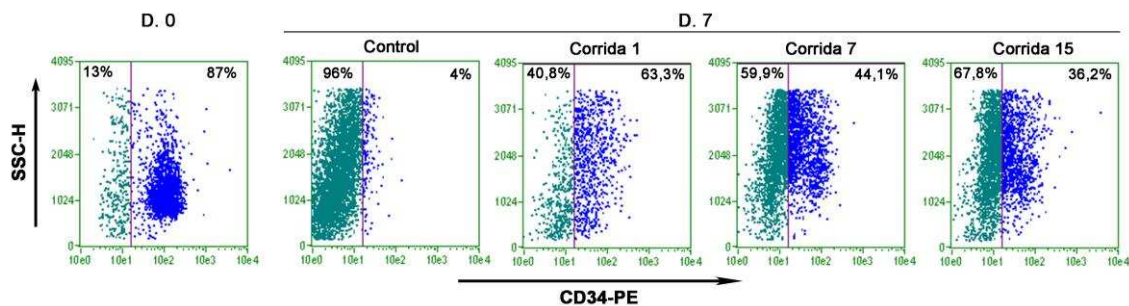


Fig. 30. Citometrías de flujo. Gráficos de puntos representativos (SSC-H vs. hCD34-PE) obtenidos a partir de diferentes corridas. Se contrasta la población celular inicial (D. 0) con las poblaciones presentes en el D. 7. En cada *dot plot* se indica la población CD34⁺ y la frecuencia correspondiente.

No fue posible analizar las células del pozo control con IMDM basal sin suplementación ya que no se encontraron células viables.

2.2.1.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron en el programa *Stat-Ease Design Expert 7.0.0 Software*, con la premisa de encontrar aquellos factores que influyan positivamente de manera significativa sobre las dos respuestas analizadas. Para ello, en primer lugar se cargaron las respuestas obtenidas experimentalmente y se analizaron los gráficos Semi-Normal y los Gráficos de Pareto que se generaron a partir de ellas. El gráfico

Semi-Normal es una herramienta de selección del modelo primario para diseños factoriales, en el cual se muestra una “línea de error” roja, que representa el 50% más pequeño de los efectos, por lo que constituye una guía visual para seleccionar los efectos que presentan una significancia más evidente.

Luego de esta herramienta, se usó el gráfico de Pareto, que también es una herramienta gráfica que facilita la selección de factores que no se presentan tan evidentemente en el gráfico Semi-Normal. El gráfico de Pareto muestra dos límites diferentes: el mayor se basa en el valor-t de Bonferroni, mientras que el límite inferior se basa en el valor-t estándar (estos límites son recalculados en la medida que los términos son seleccionados para el modelo). Así se empleó el gráfico de Pareto para seleccionar algunos efectos adicionales a los elegidos en el gráfico Semi-Normal y comprobar si deben ser incorporados dentro del error del modelo o si son efectos verdaderos mediante un posterior análisis de ANOVA. En general, los efectos seleccionados que se encuentran por encima del Límite de Bonferroni son importantes y deben ser incluidos en el modelo, los que se encuentran por encima del Límite del valor-t son posiblemente importantes y deben ser agregados al modelo si esto tiene sentido para el experimentador. Además, los efectos que se encuentren por debajo del Límite del valor-t podrían ser forzados a ingresar en el modelo por el analista para mantener la jerarquía de términos. Las respuestas se analizaron por separado.

De la misma manera, para analizar la existencia de interacciones entre factores con efectos significativos en las respuestas se empleó el programa MatLab, para la ejecución del Algoritmo Genético (AG).

2.2.1.3.1. Respuesta 1: Porcentaje de células CD34⁺

En primer lugar, para R1 (Porcentaje de células CD34⁺) se seleccionaron los factores PFC y GM-CSF en el gráfico Semi-Normal (Figura 31.A) y, en el gráfico de Pareto, se agregaron los factores Hidrocortisona, hIL-3 y β -mercaptoetanol, los cuales podrían llegar a ser significativos en el modelo (Figura 31.B). Cabe aclarar que el *software* indica cuáles son los factores que tienen efectos positivos y negativos en la respuesta mediante un código de colores: aquellos efectos positivos se muestran en color naranja, mientras que los negativos se indican en color azul en los dos gráficos analizados.

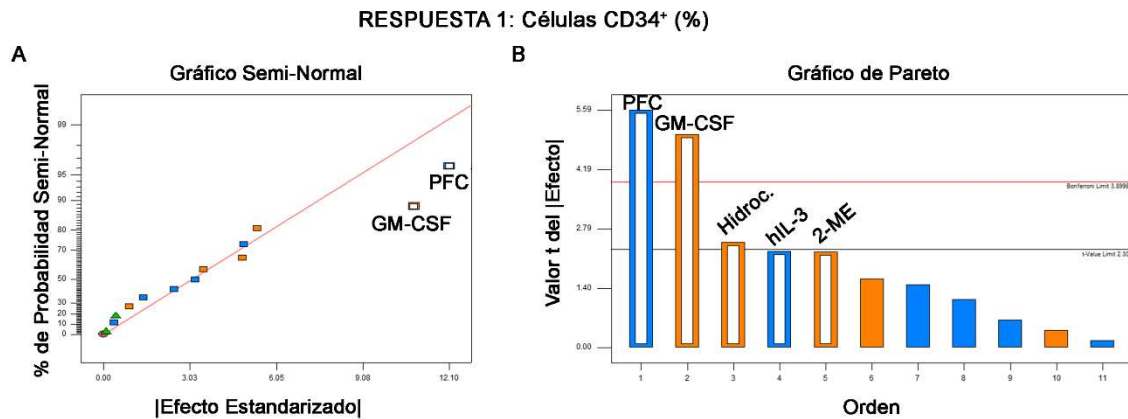


Fig. 31. Selección de factores significativos sobre la respuesta Células CD34+.

A. Gráfico semi-Normal y **B.** Gráfico de Pareto para la evaluación de los efectos de los 11 factores analizados sobre la respuesta *Porcentaje de células CD34+*. Se encuentran nombrados y marcados con su interior en blanco los factores que se incluyeron en el modelo. Aquéllos que se muestran en color azul corresponden a efectos negativos, mientras que los que se indican en color naranja tienen efectos positivos sobre la respuesta. En el gráfico de Pareto el límite superior de Bonferroni se encuentra indicado con una línea roja y el inferior de valor-t se muestra mediante una línea negra. PFC indica Plasma Fresco Congelado; GM-CSF indica Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos; Hidroc. indica hidrocortisona, hIL-3 indica interleuquina-3 humana y 2-ME indica β -mercaptoetanol.

A partir de esto, se procedió a estudiar el Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado. Para los términos de interés, se obtuvieron los *p-valores* que se muestran en la Tabla 15. Como se evidencia aquí, el modelo elegido resultó significativo (p -valor= 0,0008), al igual que la curvatura (es decir, la posibilidad de existencia de efectos de segundo orden) ($p=0,0101$), mientras que la falta de ajuste resultó no significativa ($p=0,4092$). Por otro lado, el R^2_{aj} , es decir, el porcentaje de variación en la respuesta que es explicada por el modelo, fue de 0,84. Todo esto indica que el modelo es capaz de predecir correctamente el comportamiento del proceso. El adecuado ajuste del modelo para esta respuesta podría explicarse por la metodología con la cual se determinó la misma: la citometría de flujo es una técnica de medición muy sensible y con una robustez estadística relativamente buena, por tratarse de un método automatizado que genera resultados a partir de evaluar decenas o cientos de miles de eventos.

Por otro lado, los *p-valores* menores a 0,05, es decir aquéllos que indican los factores con efectos estadísticamente significativos en el modelo, fueron los correspondientes a GM-CSF (0,001), hidrocortisona (0,0382) y PFC (0,0005). Sin embargo, es importante destacar que este efecto del PFC, que es altamente significativo, es un efecto negativo para la respuesta, contrario a lo que se pretende lograr. Respecto de los otros dos factores que se incluyeron en el modelo, hIL-3 y β -mercaptoetanol, no se puede establecer con seguridad que su efecto sea

verdaderamente significativo sobre el porcentaje de células CD34⁺, como así tampoco se puede afirmar lo contrario; los p-valores se encuentran en el límite de aceptación.

Tabla 15. Análisis de la Varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado (etapa de *screening* de factores significativos en la primera semana de cultivo de HSPCs). Se muestran destacados en anaranjado los dos factores con efectos significativos positivos sobre la respuesta *Porcentaje de células CD34⁺* y, destacado en azul, se indica el factor con efecto significativo negativo.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor	
Modelo	1022,97	5	204,59	14,54	0,0008	Significativo
<i>hIL3</i>	72,03	1	72,03	5,12	0,0535	
<i>GM-CSF</i>	354,25	1	354,25	25,18	0,0010	
<i>Hidrocortisona</i>	86,40	1	86,40	6,14	0,0382	
<i>PFC</i>	439,23	1	439,23	31,22	0,0005	
<i>β-mercaptoetanol</i>	71,05	1	71,05	5,05	0,0548	
Curvatura	157,46	1	157,46	11,19	0,0101	Significativa
Residual	112,54	8	14,07			
Falta de Ajuste	94,44	6	15,74	1,74	0,4092	No significativa
Error puro	18,11	2	9,05			
Suma de cuadrados total corregida	1292,98	14				

Asimismo, es importante mencionar que el modelo del ANOVA es apto para comparar efectos de factores sobre un fenómeno si los datos experimentales se ajustan al modelo, es decir, si las condiciones subyacentes al modelo están implícitas en los datos [166]. Las violaciones a estas suposiciones, como se mencionó en la *Introducción*, pueden ser investigadas examinando los residuos. El incumplimiento de los mismos afectará el nivel de significación, ya que se puede incrementar el error de tipo I, lo que resulta en que se informe de demasiadas diferencias significativas entre tratamientos. También se verá afectada la potencia de la prueba, ya que podría realizarse una prueba más adecuada. La robustez de la prueba puede perderse cuando el incumplimiento es severo. Sin embargo, si los supuestos se verifican sólo aproximadamente, el modelo tendrá validez.

Los requerimientos son [166]:

- Independencia de los errores (este supuesto es definitivo para el ANOVA, la falta de independencia afecta la validez de la prueba F)
- Distribución normal de los errores
- Homogeneidad de las varianzas de los tratamientos
- Aditividad o linealidad en los parámetros del modelo.

Así, para el modelo correspondiente a la R1, se analizaron los residuos para asegurar el cumplimiento de estas condiciones. Se verificó la independencia de los errores: se analizó la gráfica de los residuos internamente studentizados en función de orden en que fueron tomadas las observaciones (Figura 32.A), sin que haya indicios de tendencias crecientes o decrecientes, por lo cual se supone independencia entre los residuos. También se analizó la gráfica de Porcentaje de probabilidad normal vs. Residuos internamente studentizados (Figura 32.B) y se comprobó que los residuos se distribuyen en torno al punto cero del eje X y se acomodan a lo largo de la recta normal. En cuanto a la homogeneidad de varianzas u homocedasticidad, la misma se comprobó por observación del gráfico de Residuos internamente studentizados vs. Valor predicho de la respuesta (Figura 32.C): en esta gráfica se observa que los residuos se distribuyen aleatoriamente en torno al valor 0, para los diferentes valores predichos de la respuesta; es decir, los residuos no están relacionados con los valores de la variable respuesta. Otro aspecto importante cuando se genera un modelo estadístico a partir de datos experimentales es la potencial presencia de observaciones influyentes. Este tipo de observaciones afecta desproporcionalmente el modelo por lo cual, si son eliminadas, producirían un cambio sustancial en uno o más de los coeficientes y/o una o más de las respuestas modeladas. El *software* empleado cuenta con varias herramientas estadísticas para detectar este tipo de puntos; en este caso se muestra en la Figura 32.D el gráfico de DFBETAS de la ordenada vs. el número de corrida. Éste muestra una medida de cuánto una observación puede afectar la estimación de un coeficiente de regresión. Se considera que los valores que superan en valor absoluto la línea de corte indicada en rojo, son altamente influyentes [167]; para la R1, por lo tanto, no se distinguen puntos influyentes.

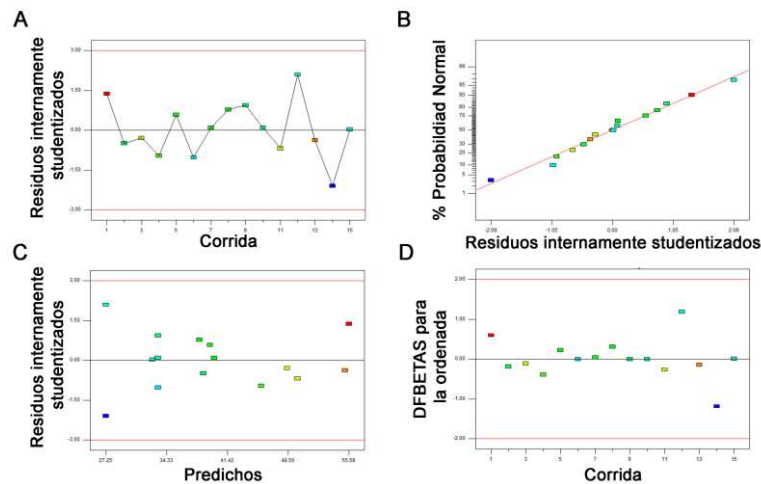


Fig. 32. Análisis de residuos. Estudio del cumplimiento de los supuestos del ANOVA y de la influencia estadística para R1: **A.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del orden de corrida para verificar el supuesto de independencia de los errores; **B.** Gráfico de porcentaje de probabilidad normal en función de los residuos internamente studentizados para verificar la normalidad de los errores; **C.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del valor predicho de la respuesta para evaluar la homocedasticidad; **D.** Gráfico de DFBETAS en función del orden de corrida para analizar la presencia de observaciones influyentes.

Además del análisis de datos efectuado en *Design Expert*, se ejecutó en MatLab el AG, con el objetivo de detectar posibles efectos significativos de las interacciones entre factores sobre la R1 que se han perdido por el diseño de PB. Para ello, se cargó en el programa la matriz de factores y el vector correspondiente a R1; se estableció un número de cromosomas de 20 (debe ser un número par) y un número de generaciones de 100. Finalmente se ejecutó la rutina. Los resultados indicaron que los factores GM-CSF ($p=0,00948$) y PFC ($p=0,00488$) tienen efectos significativos sobre la respuesta. Esto coincide con lo observado en el análisis realizado por *Design Expert*. Asimismo, se evaluaron los efectos de todas las interacciones de dos factores: ninguna de ellas resultó estadísticamente significativa. El modelo resultante por AG, que sólo incluye a estos factores significativos, presentó un R^2 de 0,61, el cual resultó levemente menor que el R^2 del modelo obtenido por el análisis clásico de PB, incluyendo sólo los dos factores que presentan marcada significancia estadística ($R^2=0,7$). Esto otorga validez estadística al uso del diseño PB para estimar los efectos de los factores principales.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que en el análisis por AG se evidenciaron algunas interacciones que, aunque no fueron estadísticamente significativas, presentaron valores más cercanos al valor de corte: EPO-insulina, hSCF-GM-CSF, hSCF-holotransferrina y GM-CSF- β -mercaptoetanol. Puesto que, en general, la importancia de estas interacciones es “hereditaria” con respecto al factor principal

significativo que involucran, se debe prestar atención a las potenciales interacciones entre GM-CSF y hSCF y entre GM-CSF y β -mercaptoetanol.

2.2.1.3.2. Respuesta 2: expansión de células viables CD34⁺

Para la R2 (Expansión de células viables CD34⁺) se seleccionó el factor BSA en el gráfico Semi-Normal (Figura 33.A) y, en gráfico de Pareto, se agregó el factor PFC, que es potencialmente significativo en el modelo (Figura 33.B). En este caso, ambos factores generarían efectos positivos sobre la respuesta es decir, que un incremento en el nivel de los factores produce un aumento en la respuesta estudiada.

A partir de esto, se procedió a analizar el ANOVA para el modelo factorial seleccionado. Para los términos de interés, se obtuvieron los *p*-valores que se muestran en la Tabla 16. Como se evidencia aquí, el modelo elegido resultó significativo (*p*-valor=0,0112), mientras que la curvatura (*p*=0,97) y la falta de ajuste (*p*=0,49) resultaron no significativas. Por otro lado, el R^2_{aj} fue de 0,48. La falta de ajuste no significativa indica que el modelo describe bien el proceso, pero el reducido valor de R^2_{aj} podría indicar problemas con los datos. Esto sería atribuible al elevado error asociado con el recuento en cámara de Neubauer, principalmente en los cultivos con baja densidad celular como los de HSPCs.

Por otro lado, sólo un factor, la BSA, muestra efectos estadísticamente significativos en el modelo (*p*-valor=0,0063). El factor PFC se incluyó también en el modelo, pero su contribución no es significativa (*p*-valor=0,14).

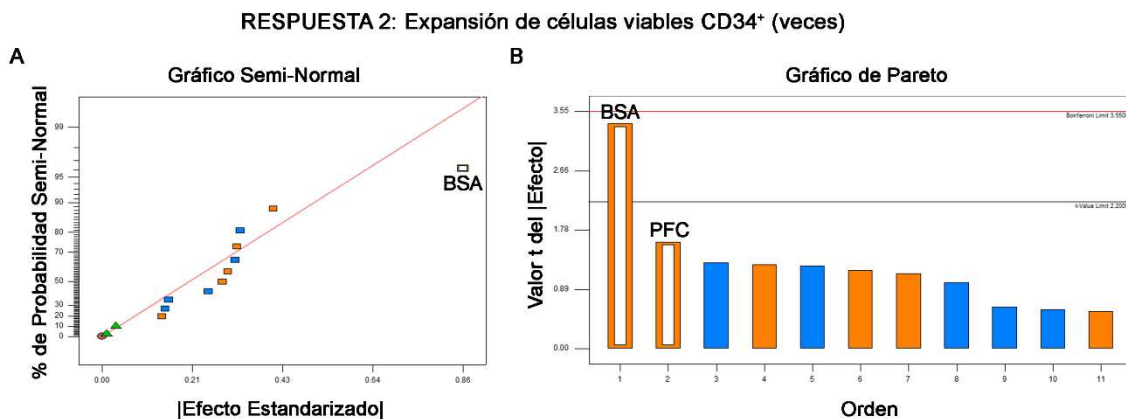


Fig. 33. Selección de factores significativos sobre la respuesta Expansión de células viables CD34⁺. **A.** Gráfico semi-Normal y **B.** Gráfico de Pareto para la evaluación de los efectos de los 11 factores analizados sobre la respuesta *Expansión de células viables CD34⁺*. En los mismos se encuentran nombrados y marcados con su interior en blanco los factores que se incluyeron en el modelo. Aquéllos que se muestran en color azul corresponden a efectos negativos, mientras que los que se indican en color naranja tienen efectos positivos sobre la respuesta. En el gráfico de Pareto el límite superior de Bonferroni se encuentra indicado con una línea roja y el inferior de valor-t se muestra mediante una línea negra. PFC indica Plasma Fresco Congelado y BSA indica albúmina sérica bovina.

Tabla 16. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo factorial seleccionado (etapa de *screening* de factores significativos en la primera semana de cultivo de HSPCs). Se muestra destacado en anaranjado el factor con efecto significativo positivo sobre la respuesta *Expansión de células viables CD34⁺*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor	
Modelo	2,69	2,00	1,34	6,95	0,0112	Significativo
<i>PFC</i>	0,49	1,00	0,49	2,55	0,1383	
BSA	2,20	1,00	2,20	11,35	0,0063	
Curvatura	0,00	1,00	0,00	0,00	0,9719	No Significativa
Residual	2,13	11,00	0,19			
Falta de Ajuste	1,83	9,00	0,20	1,36	0,4938	No significativa
Error puro	0,30	2,00	0,15			
Suma de cuadrados total corregida	4,82	14,00				

Del mismo modo que se realizó con la R1, para la R2 se comprobó el cumplimiento de los supuestos del ANOVA, lo cual se evidencia en la Figura 34.

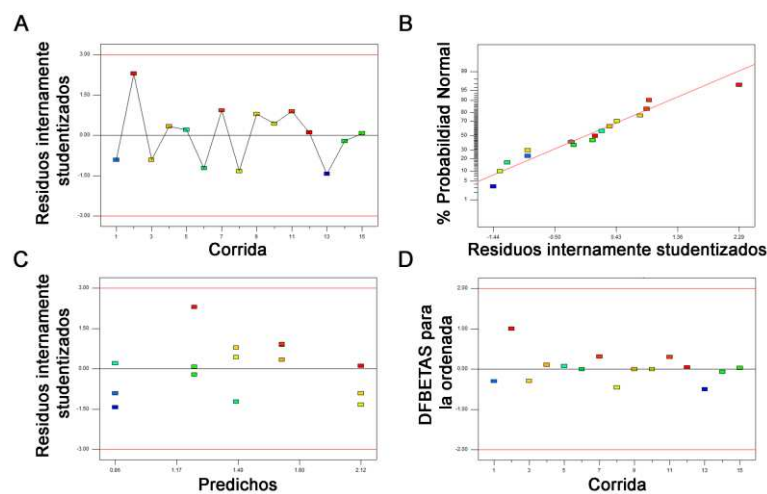


Fig. 34. Análisis de residuos. Estudio del cumplimiento de los supuestos del ANOVA y de la influencia estadística para R2: **A.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del orden de corrida para verificar el supuesto de independencia de los errores; **B.** Gráfico de porcentaje de probabilidad normal en función de los residuos internamente studentizados para verificar la normalidad de los errores; **C.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del valor predicho de la respuesta para evaluar la homocedasticidad; **D.** Gráfica de DFBETAS en función del orden de corrida para analizar la presencia de observaciones influyentes.

También para el estudio de efectos de los factores sobre R2 se utilizó el AG. En este caso, los resultados indicaron que el factor principal BSA es el único que tiene un efecto significativo ($p=0,00566$) sobre la respuesta ya que no supera el valor máximo de p de 0,05. Esto coincide con lo observado en el análisis realizado por *Design Expert*.

Asimismo, se evaluaron los efectos de todas las interacciones de dos factores: ninguna de ellas resultó estadísticamente significativa. Además, el R^2 del modelo generado con este algoritmo [$R^2(AG)=0,43$] no mejora con respecto al $R^2(PB)$, que fue de 0,46 cuando se consideró sólo el factor significativo BSA. Esto otorga, también en este caso, validez estadística al uso del diseño PB para estimar los efectos de los factores principales.

2.2.1.4. Análisis conjunto de las respuestas modeladas para la selección de factores y niveles a evaluar en la etapa de optimización

En función de los resultados obtenidos en el análisis de los datos experimentales obtenidos para ambas respuestas, se obtuvieron criterios para definir qué factores serían incluidos en la siguiente etapa de DoE, la de optimización de factores influyentes en las respuestas. En la Tabla 17 se resumen las concentraciones de los suplementos que resultaron tener menor significancia estadística para la expansión de HSPCs y que se utilizarán en la formulación del medio (días 0-7). Estos factores que presentaron menor influencia se mantendrán durante estos 7 días de cultivo en concentraciones constantes (elegidas en función del tipo de efectos que generan), pero no se eliminarán del medio, excepto hSCFH. Esto se debe a que la experiencia previa y la información bibliográfica sustentan la importancia de su adición, por resultar relevantes para la selección de los precursores de linaje requeridos. En la Tabla se indicaron con * los factores con efectos significativos ($p<0,05$). De este modo, la EPOc se mantendrá en una concentración mínima de 1 UI/ml, debido a que en esta etapa de expansión de progenitores presenta un efecto negativo, pero es necesaria para el mantenimiento de los precursores eritroides que se pueden generar en este periodo. Considerando el efecto contrapuesto que tiene hIL-3 en cada una de las respuestas, se mantendrá en un nivel intermedio entre los dos niveles evaluados (7 ng/ml). hSCFH será el único de los factores evaluados que se eliminarán del medio ya que tiene un efecto muy poco significativo en ambas respuestas. Por otro lado, se consideró importante mantener hSCF en su concentración máxima (100 ng/ml), a pesar de su efecto contrario sobre las dos respuestas evaluadas, ya que su relevancia sobre la expansión y mantenimiento de los progenitores se encuentra ampliamente descrita en la bibliografía; este factor retrasa la diferenciación y maduración eritroide, lo que permite la auto-renovación de los progenitores antes de que esto ya no sea posible [71]. GM-CSF constituye un término significativo del modelo de la R1, aunque, simultáneamente, muestra un efecto negativo (aunque no significativo) sobre la R2. Por esta razón se consideró necesaria la optimización de sus niveles. La insulina presentó efectos negativos no significativos sobre ambas respuestas evaluadas, razón por la cual se minimizó su concentración (4 $\mu\text{g/ml}$); esto puede relacionarse con que, en presencia de hEPO, tiene

un efecto sinérgico sobre la maduración celular y esto se contrapone con el mantenimiento de una población indiferenciada. La hidrocortisona y la BSA mostraron efectos positivos sobre ambas respuestas y significativos sobre R1 y R2, respectivamente, lo que demuestra la importancia de su optimización. En relación con el PFC, éste presentó efectos contrarios sobre las respuestas, pero por su efecto negativo con elevada significancia estadística sobre la R1 se mantuvo en su nivel -1. Si bien la holotransferrina mostró un efecto negativo sobre la R1 y positivo sobre la R2, ambos fueron no significativos y se mantuvo en 50 µg/ml. Finalmente, el β-Mercaptoetanol se mantuvo en su nivel máximo ya que, a pesar de su efecto contrario en las respuestas, el positivo sobre R1 tendría mayor significancia que el negativo y podría interactuar con GM-CSF para incrementar R1.

Tabla 17. Resumen del tipo de efecto de cada factor sobre ambas respuestas evaluadas, niveles evaluados en la etapa de *screening* y niveles de los factores seleccionados para la posterior etapa de optimización del medio de cultivo de los días 0-7. Se indican con asteriscos rojos los factores que mostraron efectos significativos sobre las respuestas.

FACTOR	EFEECTO sobre R1	EFEECTO sobre R2	Nivel -1	Nivel +1	Concentración elegida
<i>EPO</i>	Negativo	Negativo	1 UI/ml	5 UI/ml	1 UI/ml
<i>IL-3</i>	Negativo	Positivo	2 ng/ml	12 ng/ml	7 ng/ml
<i>rhSCFH</i>	Positivo	Negativo	20 ng/ml	100 ng/ml	ELIMINAR
<i>rhSCF</i>	Negativo	Positivo	20 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml
<i>GM-CSF</i>	Positivo *	Negativo	20 ng/ml	100 ng/ml	OPTIMIZAR
<i>Insulina</i>	Negativo	Negativo	4 µg/ml	20 µg/ml	4 µg/ml
<i>Hidrocortisona</i>	Positivo *	Positivo	0,4 x 10 ⁻⁴ M	2 x 10 ⁻⁴ M	OPTIMIZAR
<i>PFC</i>	Negativo *	Positivo	2 % V/V	10 % V/V	2% (V/V)
<i>Holotransferrina</i>	Negativo	Positivo	50 µg/ml	400 µg/ml	50 µg/ml
<i>BSA</i>	Positivo	Positivo *	0,4 % P/V	2 % P/V	OPTIMIZAR
<i>β-Mercaptoetanol</i>	Positivo	Negativo	0,2 x 10 ⁻⁴ M	2 x 10 ⁻⁴ M	2 x 10 ⁻⁴ M

2.2.2. Optimización de factores influyentes en la etapa de expansión de HSPCs por RSM

Con el objetivo de optimizar los factores que presentaron efectos significativos en las respuestas (GM-CSF, hidrocortisona y BSA), se desarrolló en el programa *Stat-Ease Design Expert 7.0.0 Software* un diseño experimental factorial a tres niveles. En este caso se empleó el diseño de *Box-Behnken*, el cual es muy eficiente y económico en términos del número de corridas requeridas, para la estimación de superficies de respuesta de segundo orden. Este diseño además es rotatable o aproximadamente rotatable [168]. De esta manera se evaluaron 3 factores en 3 niveles y se realizaron 3 repeticiones del punto central; las respuestas estudiadas fueron las mismas que para la etapa de selección de factores (Porcentaje de células CD34⁺ y Expansión de células viables CD34⁺). Así, se probaron 15 combinaciones de factores.

2.2.2.1. Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular

Inicialmente se preparó una suspensión de MNCs de dos muestras de SCU mediante la descongelación de crioviales a partir del banco celular de trabajo. Una vez que se obtuvo una suspensión libre de DMSO, se realizó recuento y determinación de la viabilidad celular en cámara de Neubauer. Se obtuvieron dos suspensiones celulares: M1, con $1,2 \times 10^8$ céls. viables y 99% de viabilidad, y M2, con $1,3 \times 10^8$ céls. viables y 100% de viabilidad. De este modo, se recuperaron $2,5 \times 10^8$ MNCs viables totales.

Puesto que la suspensión presentó agregación celular debida al proceso de descongelación, la misma se trató con Benzona y luego se procedió al aislamiento de células CD34⁺ por SI de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado 3.3.2.2 (*Materiales y Métodos*). En este caso, debido a que el número de MNCs totales a sembrar en las columnas MS sería superior a 10^8 MNCs, cada una de las muestras por separado se incubó con 150 μ l de cada reactivo de marcación y se separó en una columna (es decir, se emplearon dos columnas para realizar la purificación de HSPCs).

Al finalizar, se analizó la recuperación celular por recuento en cámara de Neubauer de cada una de las fracciones R y NR y se determinó el porcentaje de céls. CD34⁺ en las fracciones R. Se obtuvieron, para la fracción R1, $1,02 \times 10^6$ céls. viables totales (esto es, 8.700 céls. viables/ 10^6 MNCs), con una pureza de 38,4% céls. CD34⁺ y, para la fracción R2, $5,1 \times 10^5$ céls. viables totales (esto es, 3.920 céls. viables/ 10^6 MNCs), con una pureza de 47,3% céls. CD34⁺ (Figura 35.A).

De esta manera, puesto que la pureza de las fracciones R fueron menores a 80%, las dos fracciones retenidas se combinaron y se sometieron a otro paso de SI, empleando 100 μ l de cada reactivo de marcación. En este caso se obtuvieron 350.000 céls. viables totales (es decir, 1.400 céls. viables/ 10^6 MNCs), con una pureza de 97,6% céls. CD34⁺ (Figura 35.B), lo cual se consideró adecuado para iniciar el experimento. Puede evidenciarse que el importante incremento logrado en la pureza de la fracción R fue acompañado de una reducción sustancial en la recuperación celular.

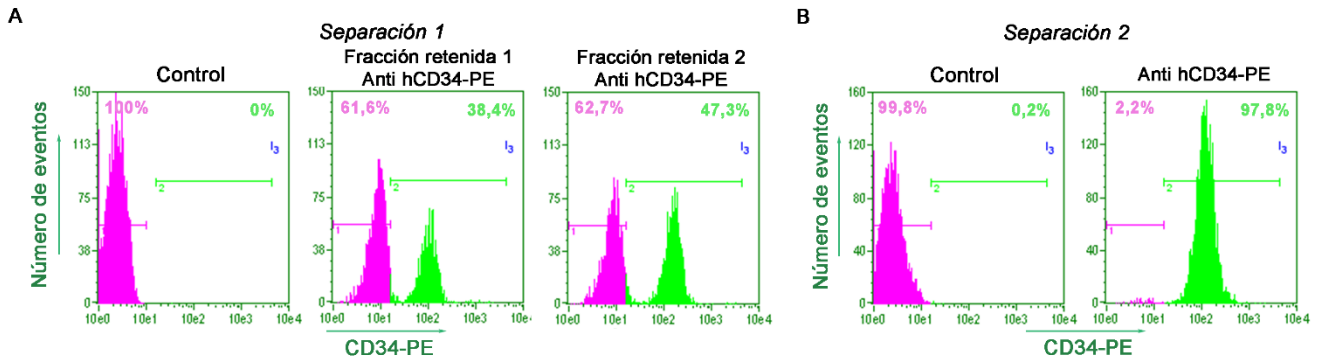


Fig. 35. Citometrías de flujo. Histogramas (Número de eventos vs. Intensidad de fluorescencia de eventos marcados con anti hCD34-PE) obtenidos mediante análisis de las fracciones R de: **A.** el primer paso de purificación (fracciones R1 y R2) y **B.** el segundo paso de separación inmunomagnética. Se muestran los histogramas correspondientes a los controles y a las fracciones R marcadas. La pureza de la fracción luego de un segundo paso de separación inmunomagnética se incrementó desde 38-47% a 97,6%, por lo cual fue empleada como fuente celular para las diferentes corridas del paso de optimización de factores.

2.2.2.2. Experimentos de optimización

Una vez purificada la fracción CD34⁺, se iniciaron los cultivos con suplementación variable de acuerdo a la composición indicada para cada corrida experimental. Los factores y niveles de factores analizados en cada una de ellas se detallan en la Tabla 18; además se incluyó un control de crecimiento en medio IMDM con todos los suplementos mencionados en el punto 2.2.1.4 de esta sección, excepto los tres factores a optimizar, con el objetivo de evaluar el efecto de su depleción del medio y de comprobar la importancia de su incorporación. En cada caso, el cultivo se efectuó en placa de 48 pozos, en un volumen de 500 μ l, y con una concentración celular inicial de 29.600 céls. CD34⁺ viables/ml. Luego de los 7 días de cultivo en condiciones estándar, sin cambios de medio, dilución ni suplementación, se analizó el porcentaje de células CD34⁺ y la tasa de expansión de las mismas. Los resultados obtenidos se incluyen también en la Tabla 18; además se muestran en la Figura 36 citometrías representativas de las respuestas obtenidas por citometría de flujo.

Tabla 18. Corridas experimentales sugeridas por el *software Stat-Ease Design Expert 7.0.0* para la etapa de optimización de los factores seleccionados (diseño de *Box-Behnken*). Se indican el orden estándar, orden de corrida y concentraciones a evaluar de cada uno de los factores. También se muestran los valores obtenidos para las dos respuestas analizadas en el día 7 de cultivo: Porcentaje de células CD34⁺ y Expansión de células viables CD34⁺ (veces) según el orden de corrida.

Ord. est	Ord. corrida	Factor 1 BSA % (P/V)	Factor 2 GM-CSF ng/ml	Factor 3 Hidrocortisona 10 ⁻⁴ M	Respuesta 1 Células CD34 ⁺ %	Respuesta 2 Expansión de céls. viables CD34 ⁺ veces
14	1	1,2	60	1,2	42,62	1,8
5	2	0,4	60	0,4	72,89	0,6
3	3	0,4	100	1,2	68,83	0,1
13	4	1,2	60	1,2	44,50	2,7
9	5	1,2	20	0,4	43,48	2,2
7	6	0,4	60	2,0	65,88	0,7
8	7	2,0	60	2,0	44,48	2,8
6	8	2,0	60	0,4	39,75	2,4
1	9	0,4	20	1,2	65,43	0,9
4	10	2,0	100	1,2	43,51	3,0
15	11	1,2	60	1,2	38,95	1,8
2	12	2,0	20	1,2	34,47	2,8
10	13	1,2	100	0,4	35,40	1,6
11	14	1,2	20	2,0	36,45	1,8
12	15	1,2	100	2,0	37,00	1,7

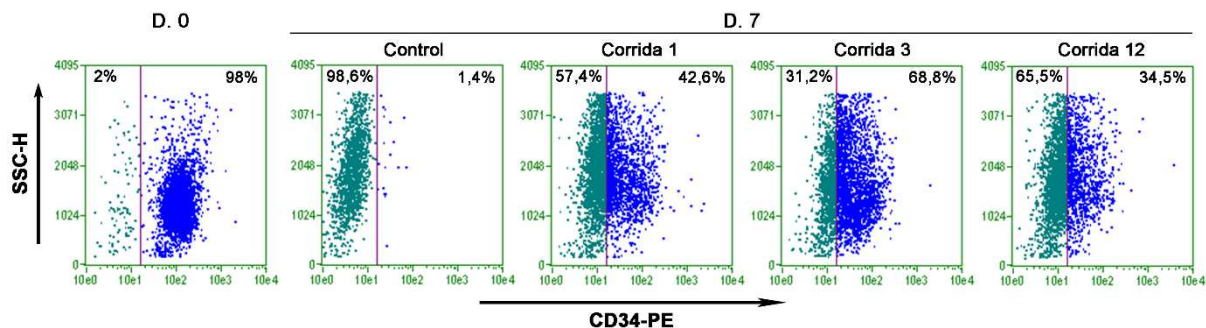


Fig. 36. Citometrías de flujo. Gráficos de puntos representativos (SSC-H vs. hCD34-PE) obtenidos a partir de diferentes corridas. Se contrasta la población celular inicial (D. 0) con las poblaciones presentes en el día 7 (D. 7). En cada *dot plot* se indica la población CD34⁺ y la frecuencia correspondiente.

No fue posible analizar las células del pozo control con medio de expansión basal (el cual no contenía los factores de crecimiento que se optimizaron) ya que no se encontraron células viables, lo que reflejó la significancia del efecto de su incorporación en el medio.

2.2.2.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron en el programa *Stat-Ease Design Expert 7.0.0 Software*, con el objeto de hallar la/s combinaciones óptimas de las variables que generan resultados deseables en las respuestas.

En el caso de la RSM, en primer lugar se debieron analizar para cada respuesta los tests F, de Falta de Ajuste y de adecuación mediante los cuales el programa sugiere un modelo como punto de partida. A partir de allí, se seleccionaron los términos del modelo en función de su significancia y, a continuación, se efectuaron ANOVAs para evaluar el modelo elegido de manera global y en cada uno de sus términos individuales; asimismo, se estudiaron las pruebas de diagnóstico para validar el modelo.

Una vez que se halló un modelo adecuado mediante el empleo de polinomios que caracterizan superficies de respuesta, se generaron los gráficos del modelo para ser interpretados (gráficos 3D y de contorno). Finalmente, se realizó la optimización de múltiples respuestas mediante herramientas gráficas y numéricas, siguiendo los criterios más apropiados para cumplir con los objetivos buscados: generar una óptima expansión de los cultivos de HSPCs, de la manera más selectiva posible que luego permita una adecuada diferenciación eritroide. Para esto se empleó la función deseabilidad.

2.2.2.3.1. Respuesta 1: Porcentaje de células CD34⁺

En el caso de la R1, el modelo sugerido por el *software* fue el modelo cuadrático. Para éste la significancia dada por el p-valor fue de 0,0077 (la mayor determinada por el modelo secuencial de suma de cuadrados), la falta de ajuste presentó la menor significancia entre todos los modelos propuestos (p-valor=0,42) y el R²aj fue de 0,92, que también se maximiza con este modelo.

Luego de seleccionar los términos de manera manual, se realizó el ANOVA (Tabla 19), que mostró que el modelo elegido resultó altamente significativo (p-valor<0,0001), de la misma manera que los términos individuales incluidos en el mismo: BSA y BSA². La Falta de Ajuste también resultó no significativa respecto del error puro (p-valor=0,49) y el R²aj del modelo fue de 0,93. De esta manera la ecuación final del modelo para la R1 (Ecuación 15) fue:

$$\text{Células CD34}^+ (\%) = 94,46083 - 75,14688 \times \text{BSA} + 24,09635 \times \text{BSA}^2 \quad (15)$$

Tabla 19. Análisis de la Varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático seleccionado (etapa de optimización de factores significativos en la primera semana de cultivo de HSPCs).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor	
Modelo	2350,54	2	1175,27	84,01	< 0,0001	Significativo
<i>BSA</i>	1535,13	1	1535,13	109,73	< 0,0001	
<i>BSA</i> ²	815,41	1	815,41	58,29	< 0,0001	
Residual	153,89	11	13,99			
Falta de Ajuste	147,15	10	14,72	2,19	0,4859	No significativa
Error puro	6,73	1	6,73			
Suma de cuadrados total corregida	2504,43	13				

Al igual que en la etapa de selección de factores, se comprobó el cumplimiento de los supuestos del ANOVA analizando los residuos derivados de los datos experimentales. Dichos análisis se muestran en la Figura 37.

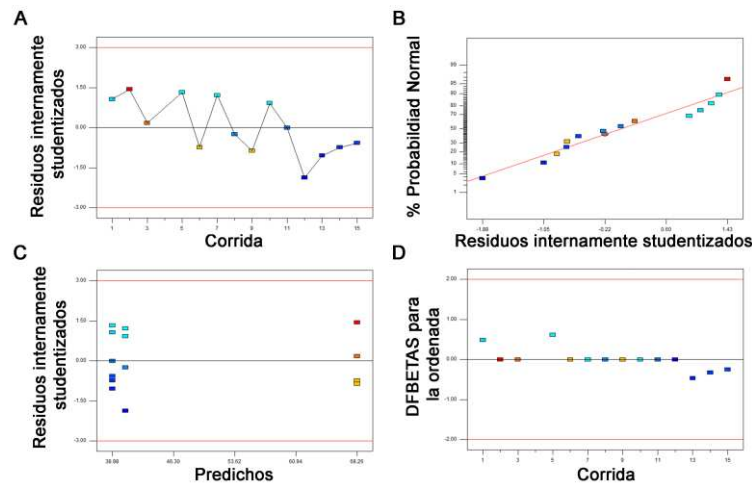


Fig. 37. Análisis de residuos. Estudio del cumplimiento de los supuestos del ANOVA y de la influencia estadística para R1: **A.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del orden de corrida (supuesto de independencia); **B.** Gráfico de porcentaje de probabilidad normal en función de los residuos internamente studentizados (normalidad); **C.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del valor predicho (homocedasticidad); **D.** Gráfica de DFBETAS en función del orden de corrida (observaciones influyentes).

Finalmente, los gráficos 3D de la superficie de respuesta generada a partir del modelado de los datos experimentales se muestran en la Figura 38. Como se evidencia, la R1 se mantiene constante cuando se varían los niveles de GM-CSF (y lo mismo ocurre variando los niveles de Hidrocortisona), mientras que se observa una relación de tipo cuadrática entre la respuesta y los niveles de BSA. Además, la respuesta se maximiza cuando se minimizan los valores de BSA.

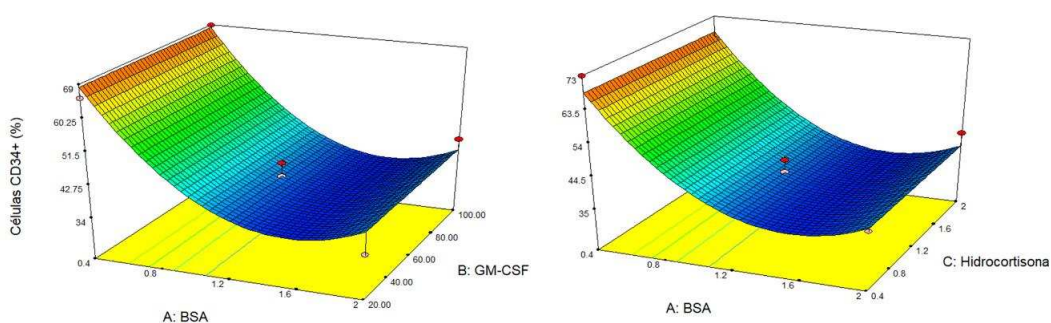


Fig. 38. Modelos de superficie de respuesta (RSM). Se presentan los modelos generados a partir del análisis de los datos experimentales obtenidos para la Respuesta Porcentaje de células CD34+. Se muestra la superficie obtenida para la respuesta en función de los niveles de los factores optimizados (BSA, GM-CSF e Hidrocortisona)

2.2.2.3.2. Respuesta 2: Expansión de células viables CD34+

Para la R2, el modelo sugerido fue el lineal. Para éste la significancia dada por el p-valor fue menor a 0,0001 (la mayor determinada por el modelo secuencial de suma

de cuadrados), la falta de ajuste no fue significativa (p -valor=0,86) y el R^2_{aj} fue de 0,83, el mayor valor entre todos los modelos analizados.

La selección de los términos que constituyen el modelo se efectuó de manera manual. En el ANOVA (Tabla 20), se evidenció que el modelo elegido resultó altamente significativo (p -valor<0,0001), y equivalente al del coeficiente del único factor incluido en el modelo, la BSA (dependencia lineal). La Falta de Ajuste presentó un p -valor de 0,86, es decir que no fue significativa respecto del error puro y el R^2_{aj} del modelo fue de 0,83, tal como predijo el modelo secuencial. De esta manera la ecuación final del modelo para la R2 se indica en la Ecuación 16:

$$\text{Expansión de células viables CD34}^+ (\%) = 0,15919 + 1,36197 \times BSA \quad (16)$$

También para el caso de la R2 se verificó el cumplimiento de los requisitos del ANOVA analizando los residuos derivados de los datos experimentales. Algunos de los gráficos que permiten inspeccionar estas características de los datos se observan en la Figura 39.

Tabla 20. Análisis de la Varianza (ANOVA) para el modelo lineal de R2 seleccionado (etapa de optimización de factores significativos en la primera semana de cultivo de HSPCs).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor	
Modelo	9,50	1	9,50	69,55	< 0,0001	Significativo
<i>BSA</i>	9,50	1	9,50	69,55	< 0,0001	
Residual	1,78	13	0,14			
Falta de Ajuste	1,23	11	0,11	0,41		No significativa
Error puro	0,54	2	0,27			
Suma de cuadrados total corregida	11,27	14				

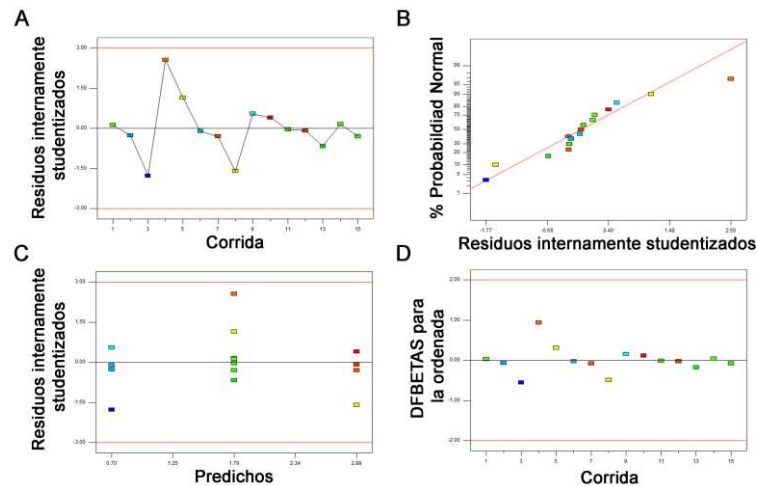


Fig. 39. Análisis de residuos. Estudio del cumplimiento de los supuestos del ANOVA y de la influencia estadística para R2: **A.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del orden de corrida (supuesto de independencia); **B.** Gráfico de porcentaje de probabilidad normal en función de los residuos internamente studentizados (normalidad); **C.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del valor predicho (homocedasticidad); **D.** Gráfica de DFBETAS en función del orden de corrida (observaciones influyentes).

Así, los gráficos 3D (planos) de la superficie de respuesta resultante de este proceso de modelado para la Expansión de células viables CD34⁺ se observan en la Figura 40. Las variaciones en R2 ocurren linealmente con los cambios en la concentración de BSA, mientras que cambios en las otras dos variables no modifican R2. Adicionalmente, se evidencia que el efecto del incremento en los niveles de BSA sobre la expansión celular es el contrario a su efecto sobre el porcentaje de células CD34⁺: en este caso el aumento en la concentración de esta proteína induce incrementos en la expansión y el máximo ocurre para la concentración de 2% (P/V) de BSA. Esto refuerza las observaciones experimentales previas que indican que la expansión de las HSPCs se encuentra generalmente asociada a la pérdida de su naturaleza de *stem* o progenitoras.

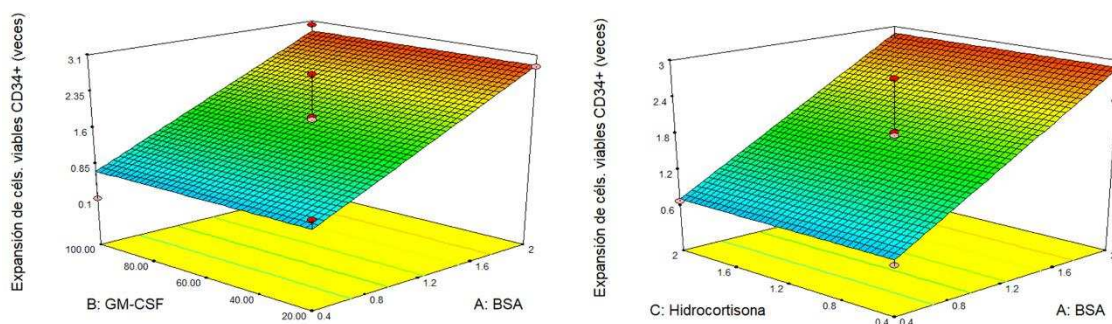


Fig. 40. Modelos de superficie de respuesta (RSM). Se presentan los modelos generados a partir del análisis de los datos experimentales obtenidos para la Respuesta Expansión de células viables CD34⁺. Se muestran las superficies obtenidas para la respuesta en función de los factores optimizados (BSA, GM-CSF e Hidrocortisona).

2.2.2.4. Localización de las condiciones óptimas

Para ambas respuestas puede observarse que los máximos obtenidos no parecen ser absolutos, sino que, probablemente, corriendo la región experimental sería posible producir mejoras en las mismas y/o hallar un punto estacionario. Es decir, podrían modificarse los niveles de los factores significativos en la dirección de ascenso de las respuestas. Sin embargo la economía del sistema en estudio constituye una limitante para esto, razón por la cual se decidió permanecer en el entorno experimental estudiado.

En cada gráfica 3D se evidencia que existe una zona óptima de operación y no un punto. En estos casos es posible seleccionar el mejor conjunto de condiciones desde el punto de vista operacional que permita obtener una solución de compromiso, decidiendo sobre la conveniencia de los niveles de los factores.

Es importante considerar que, como ya fue mencionado, cuando el procedimiento de optimización involucra más de una respuesta, no es posible optimizar cada una de ellas de manera separada, sino que se debe obtener una solución general que lleve a un cierto grado de conformidad con los criterios propuestos para cada variable del sistema. Con este objetivo de optimización simultánea, en este trabajo se empleó la función Deseabilidad, luego de establecer las restricciones que se indican en la Tabla 21. El programa brindó una lista de posibles soluciones que cumplen con los criterios establecidos (y que presentaban valores de deseabilidad mayores a cero); se escogió aquél conjunto de condiciones que presentó el valor más elevado de Deseabilidad.

Tabla 21. Conjunto de restricciones establecidas para realizar la optimización basada en la función Deseabilidad de acuerdo a las limitantes prácticas y los resultados esperados.

<i>Factor</i>	Restricciones			Importancia
	Objetivo	Límite Inferior	Límite Superior	
<i>BSA [% (P/V)]</i>	en rango	0,4	2,0	3
<i>GM-CSF (ng/ml)</i>	minimizar	20	40	3
<i>Hidrocortisona (10^{-4} M)</i>	minimizar	0,4	0,8	3
<i>Expansión de células viables CD34⁺ (veces)</i>	maximizar	1,5	3,0	3
<i>Porcentaje de células CD34⁺ (%)</i>	maximizar	40,00	72,89	3

El paso final en esta optimización de múltiples respuestas fue obtener una predicción de los valores que éstas pueden adquirir cuando se aplica la combinación óptima de los factores, usando modelos de ajuste (Tabla 22).

La solución obtenida fue:

Tabla 22. Predicción puntual de las respuestas cuando se aplican los niveles optimizados de los factores. También se indica el valor de Deseabilidad para esta solución

BSA [% (P/V)]	GM-CSF (ng/ml)	Hidrocor-tisona (10^{-4} M)	Expansión de céls. viables CD34 ⁺ (veces)		Células CD34 ⁺ (%)		Deseabilidad
			Pred.	IC 95%	Pred.	IC 95%	
Niveles optimizados			Pred.	IC 95%	Pred.	IC 95%	
2,0	20	0,4	2,9	(2,5;3,2)	40,55	(36,43;44,65)	0,35

Pred. Indica predicción puntual; IC 95% indica intervalo de confianza para la predicción calculado con un 95% de confianza.

2.2.3. Pruebas de seguimiento o confirmación

Debido a que las condiciones óptimas encontradas constituyen predicciones generadas a partir del modelo derivado de los datos experimentales, al igual que las respuestas predichas en estas condiciones, es adecuado investigar el comportamiento del sistema cuando se utilizan los valores propuestos para las variables.

De esta manera, se efectuaron experimentos de cultivo ($n=3$) con la suplementación indicada como óptima y, luego de 7 d, se investigaron las respuestas previamente analizadas, así como otras que resultan de interés en el proceso de diferenciación eritroide. En una situación ideal las respuestas Porcentaje de células CD34⁺ y Expansión de células viables CD34⁺ se encontrarían en el intervalo de confianza establecido para sus valores predichos.

2.2.3.1. Obtención de HSPCs. Análisis de pureza y recuperación celular

Inicialmente se prepararon suspensiones de MNCs de cuatro muestras de SCU mediante la descongelación de crioviales a partir del banco celular de trabajo. Se obtuvieron cuatro suspensiones celulares: M1, con $3,1 \times 10^7$ céls. viables y 95% de viabilidad; M2, con $2,1 \times 10^7$ céls. viables y 92,6% de viabilidad; M3, con $3,9 \times 10^7$ céls. viables y 99% de viabilidad; y M4, con $4,5 \times 10^7$ céls. viables y 92,6% de viabilidad. De este modo, se recuperaron $1,4 \times 10^8$ MNCs viables totales.

Puesto que las suspensiones presentaron agregación celular, se trataron con Benzona y a continuación se aislaron las células CD34⁺ por SI de acuerdo con el protocolo indicado en el apartado 3.3.2.2 (*Materiales y Métodos*). Para ello, a partir de las 4 suspensiones de MNCs se generaron 2 y cada una de ellas se incubó con 100 μ l de los reactivos de marcación y se separó en una columna (es decir, se emplearon dos columnas para realizar la purificación de HSPCs).

Al finalizar, se analizó la recuperación celular por recuento en cámara de Neubauer de cada una de las fracciones R y se determinó el porcentaje de céls. CD34⁺. Se obtuvieron, para la fracción R1, $3,7 \times 10^5$ céls. viables totales (esto es, 5.200 céls.

viables/ 10^6 MNCs), con una pureza de 63,6% céls. CD34⁺ y, para la fracción R2, la recuperación fue la misma, pero con una pureza de 50,2% céls. CD34⁺ (Figura 41.A).

Debido a que en ambos casos las purezas fueron menores a 80%, las dos fracciones R se combinaron (740.000 céls. viables totales) y se sometieron a otro paso de SI, empleando 100 μ l de cada reactivo de marcación. En este caso se obtuvieron 250.000 céls. viables totales (es decir, 1.800 céls. viables/ 10^6 MNCs), con una pureza de 88,3% céls. CD34⁺ (Figura 41.B), lo cual se consideró adecuado para iniciar el experimento.

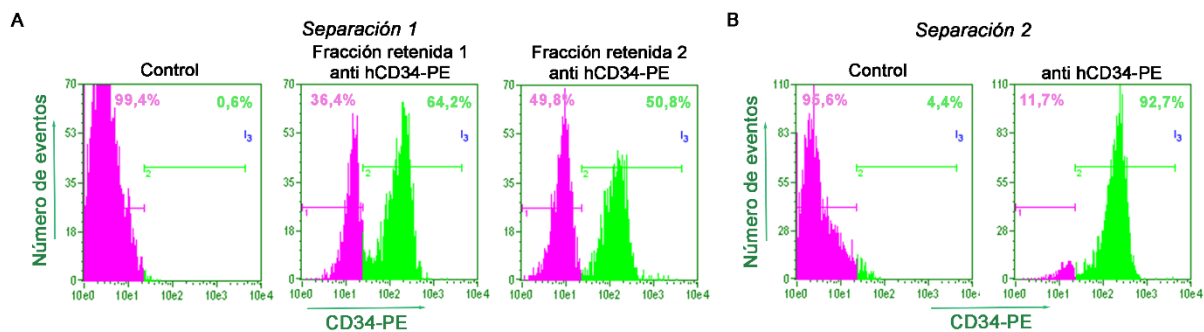


Fig. 41. Citometrías de flujo. Histogramas (Número de eventos vs. Intensidad de fluorescencia de eventos marcados con anti hCD34-PE) obtenidos a partir del análisis de las fracciones R de **A.** el primer paso de purificación (fracciones R1 y R2) y **B.** el segundo paso de SI. Se muestran los histogramas correspondientes a los controles y a las fracciones R marcadas. La pureza de la fracción luego de un segundo paso de separación inmunomagnética se incrementó desde 64-50% a 88%, por lo cual fue empleada como fuente celular para realizar los cultivos para poner a prueba los resultados predichos en el proceso de optimización.

2.2.3.2. Experimentos de confirmación. Cultivos y análisis

Una vez purificadas, las células se cultivaron ON en condiciones basales (sin el agregado de factores de crecimiento). Luego, se inició el cultivo en las nuevas condiciones de expansión (se denominó al medio de expansión optimizado como MePEOpt 0-7). Se efectuaron 3 cultivos independientes en MePEOpt 0-7 y un cultivo en el mismo medio, pero omitiendo la suplementación con PFC (MePEOpt 0-7*free*). El cultivo de las HSPCs en MePEOpt 0-7*free* tuvo como objetivo evaluar la magnitud del efecto que tendría la eliminación del PFC y, en función de esto, decidir acerca de su inclusión con vistas a evitar el uso de aditivos de composición desconocida y variable.

La densidad celular inicial fue de 29.400 céls. CD34⁺/ml en placas de 24 pozos (1 ml de volumen de trabajo) y la composición final del MePEOpt 0-7 se detalla en la Tabla 23. En el MePEOpt 0-7*free* el volumen correspondiente al PFC fue reemplazado por IMDM basal.

Para estudiar el efecto de la composición del medio de cultivo sobre el crecimiento y la diferenciación celular se realizaron diferentes tipos de análisis en los días 0 y 7 de cultivo: a) determinación de la capacidad clonogénica mediante ensayo de

formación de colonias en medio con metilcelulosa, b) de los perfiles inmunofenotípicos evaluando por citometría de flujo la expresión de los marcadores CD34, CD71 y CD235a y c) de la expansión celular mediante recuento en cámara de Neubauer.

Tabla 23. Composición final del MePEOpt 0-7 con el que se efectuó la evaluación de las condiciones optimizadas

Suplemento	Concentración final
<i>hEPO</i>	1 UI/ml
<i>hIL-3</i>	7 ng/ml
<i>hSCF</i>	100 ng/ml
<i>GM-CSF</i>	20 ng/ml
<i>Insulina</i>	4 µg/ml
<i>Hidrocortisona</i>	4x10 ⁻⁵ M
<i>PFC</i>	2% (V/V)
<i>Holotransferrina</i>	50 µg/ml
<i>BSA</i>	2% (P/V)
<i>β-Mercaptoetanol</i>	2 x 10 ⁻⁴ M
<i>IMDM</i>	c.s.p. enrase

2.2.3.2.1. Análisis de la Respuesta 1: Células CD34⁺ (%)

El análisis por citometría de flujo de la expresión del marcador CD34 en las células cultivadas en MePEOpt 0-7 mostró los siguientes valores para los tres cultivos independientes: 29,3%, 39,6% y 50,9% (Figura 42). Por lo tanto, el porcentaje medio de células CD34⁺ resultó de 39 ± 11 %. Si bien sólo uno de los valores individuales se encuentra comprendido dentro del IC 95% (36,43; 44,65) establecido por el modelo para esta respuesta en las condiciones óptimas empleadas, el valor medio sí se halla dentro de este rango. Por otro lado, el marcador no pudo evaluarse para el cultivo llevado a cabo en MePEOpt 0-7free, ya que no se hallaron células viables en el día 7.

2.2.3.2.2. Análisis de la Respuesta 2: Expansión de células viables CD34⁺ (veces)

Los valores de expansión de células viables CD34⁺ que se determinaron en los tres cultivos realizados fueron: 7,7; 10 y 12,7 (Figura 42). De esta manera, la media hallada para esta respuesta fue de 10 ± 2 veces. A pesar de que ni este valor medio ni las respuestas individuales se encuentran en el IC 95% predicho para la R2 (2,5; 3,2), esto no fue considerado un inconveniente ya que la expansión resultó mayor que la predicha y tales variaciones pueden esperarse debido a características intrínsecas de las muestras empleadas en cada etapa de trabajo o a la composición del PFC empleado en estos cultivos.

Por otro lado, la ausencia de células viables en el cultivo en MePEOpt 0-7free nos permitió concluir que no es posible retirar completamente el PFC de los cultivos

cuando se trabaje con esta composición del MePEOpt 0-7, y que deberán investigarse otros componentes adicionales si se pretende reemplazar este suplemento.

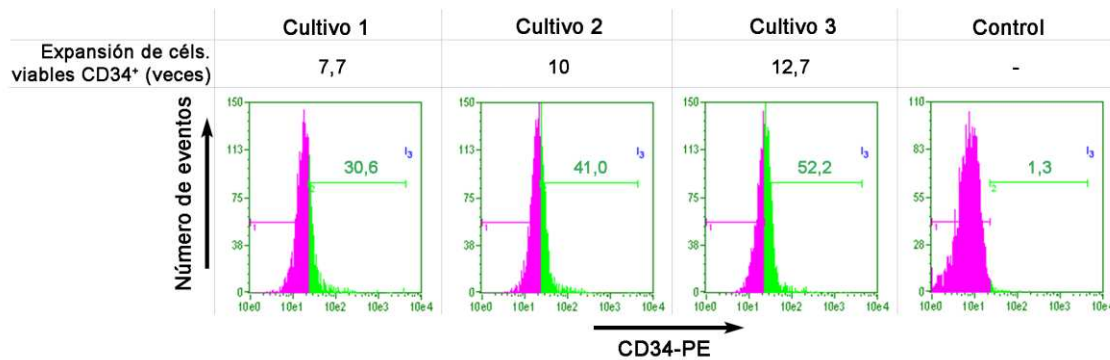


Fig. 42. Citometrías de flujo. Resultados obtenidos para los experimentos de confirmación de las respuestas predichas por el modelo para la composición optimizada de MePEOpt 0-7. La figura muestra la expansión de células viables CD34⁺ y la frecuencia de células CD34⁺ (histogramas de frecuencias) obtenidas para los tres cultivos independientes realizados en MePEOpt 0-7. En cada histograma se indican las poblaciones positiva (en verde) y su porcentaje correspondiente y la negativa (en magenta).

2.2.3.2.3. Evaluaciones adicionales: capacidad clonogénica y marcadores eritroides

El estudio del potencial clonogénico de las células presentes inicialmente y al final de los cultivos realizados en MePEOpt 0-7 se realizó en medio MACS HSC-CFU completo con EPO (Miltenyi Biotec, Inc.). Se contaron las colonias totales y se clasificaron para determinar el número de colonias de cada tipo y así establecer su frecuencia. La Figura 43 indica los resultados obtenidos en estos cultivos y la Figura 44 muestra imágenes representativas de las colonias generadas. Cabe aclarar que para estos estudios se emplearon las células presentes en las diferentes repeticiones ($n=3$) de los cultivos en MePEOpt 0-7, mientras que no fue posible efectuar estos análisis con las células derivadas de MePEOpt 0-7 *free* ya que el número de células totales presentes al final del cultivo fue muy bajo.

A partir de ambas figuras es posible observar que el potencial clonogénico total de la suspensión disminuye a medida que transcurre el cultivo, ya que se denota una disminución del número total de colonias, que presenta un máximo en el día 0 de cultivo de 169, y disminuye a 51 ± 8 a los 7 días (a partir de 550 células totales). Además de la reducción de la capacidad clonogénica de las células en cultivo, se evidencia un incremento en el número de colonias indefinidas de menor tamaño y baja densidad.

El porcentaje de BFU-E sufre una mínima modificación desde 42% a 38% en 7 d. Se observa un elevado potencial eritroide al principio de los cultivos, en el que predominan los precursores más primitivos, frente a los CFU-E (15,4%). Esto indica que

los precursores presentes tienen una elevada capacidad proliferativa y de compromiso hacia el linaje eritroide.

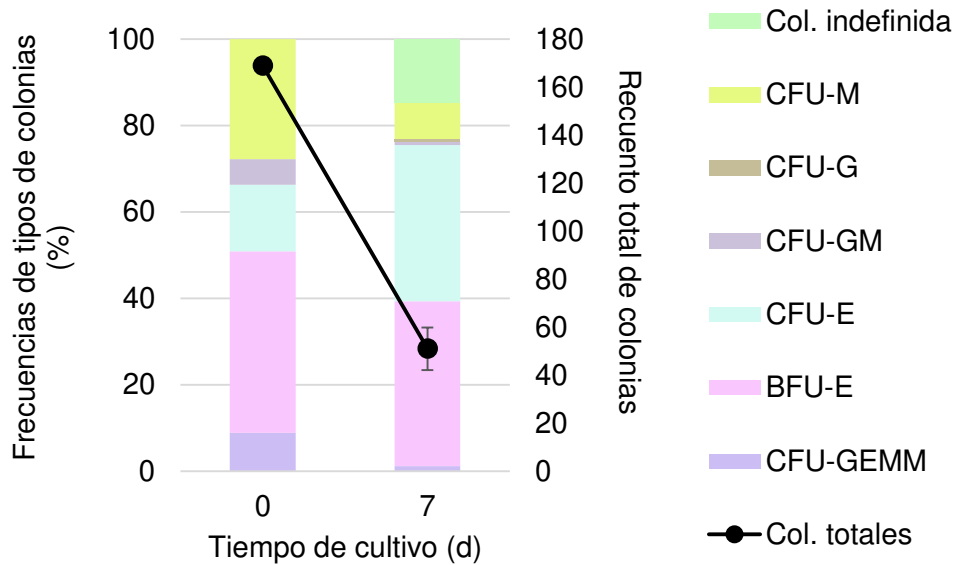


Fig. 43. Ensayos de formación de colonias. Análisis de las CFUs presentes en cultivos en MePEOpt 0-7. Las barras muestran las frecuencias de los diferentes tipos de precursores presentes en el inicio de los cultivos y en el día 7 (porcentajes promedio; para el día 0, n=1; para el día 7, n=3). Los círculos negros indican el número total de colonias presentes en las placas de cultivo HSC-CFU, con sus respectivas D.E.

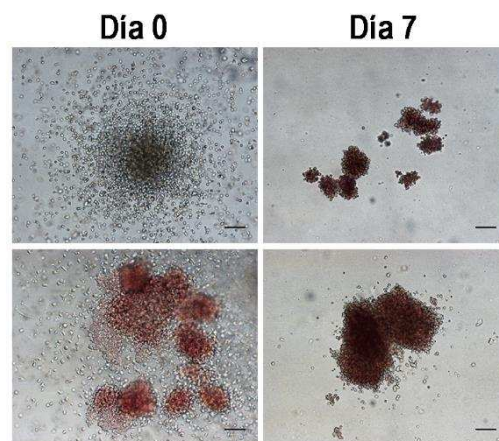


Fig. 44. Microscopías ópticas. Micrografías representativas de colonias obtenidas a partir de células cultivadas en MePEOpt 0-7 en 0 d y 7 d. Se observan colonias de diferente tipo (BFU-E, CFU-E y CFU-M). Las barras de escala indican 100 μm (magnificación 100X).

Adicionalmente, se incrementó la frecuencia de CFU-E (a un valor de 36,2%), lo que indica la ocurrencia de una maduración de los precursores CFU-GEMM presentes hacia linaje eritroide (ya que el porcentaje de BFU-E se reduce muy poco, mientras que el de CFU-GEMM disminuye en mayor medida) y/o una expansión de los CFU-E presentes en el día 0.

En cuanto a los progenitores más primitivos, los CFU-GEMM, la reducción observada en su frecuencia es de 8,9% a 1,2%. También decrece la frecuencia de CFU-GM desde 5,9% a 0,8%.

Por otro lado, en sólo una semana de cultivo se redujo significativamente el porcentaje de CFU-M (27,8% a 8,4%), a diferencia de lo que se observó en el medio reportado. La frecuencia que se presenta en el día 7 es muy baja y se esperaría que continúe bajando. Esto evidencia la capacidad del medio de cultivo optimizado para mantener selectivamente precursores del linaje eritroide (los CFU-E, BFU-E y CFU-GEMM constituyen conjuntamente el 75,5% de las CFU halladas en cultivo en el día 7), mientras que los precursores de linaje de granulocitos y macrófagos no persisten en cultivo.

Como se mencionó previamente, también se evaluaron posibles cambios inmunofenotípicos en los marcadores eritroides. Para esto se investigó la progresión de los marcadores CD71 y CD235a, ambos altamente expresados en células eritroides en diferentes estadios de maduración. El análisis citométrico efectuado en los días 0 y 7 de cultivo en MePEOpt 0-7 (en este último caso sobre las células de las 3 repeticiones realizadas) pretende correlacionar estos datos con los hallados en los ensayos de formación de colonias. En la Figura 45 pueden observarse los gráficos de puntos correspondientes.

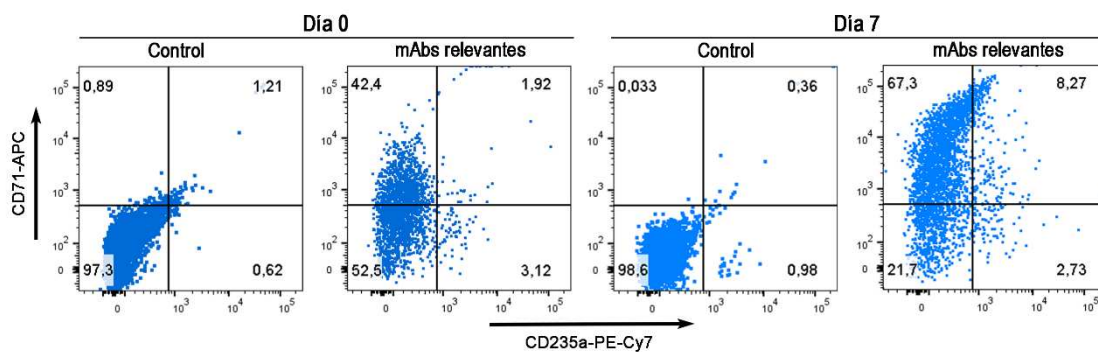


Fig. 45. Citometrías de flujo. Caracterización inmunofenotípica de marcadores eritroides y progresión de la co-expresión de hCD71-hCD235a de las células cultivadas en MePEOpt 0-7. Se muestran los gráficos de puntos de un cultivo representativo marcado con los mAbs relevantes, incluyendo sus controles.

El marcador CD71 se encuentra presente en las células en cultivo desde el día 0 y se incrementa durante estos 7 d. Se evidencia que inicialmente la población celular presenta un fenotipo mayormente CD71^{+/dim}CD235a⁻, correspondiente a los precursores eritroides tempranos y a otras células que incorporan hierro para su metabolismo; esta población se incrementa desde un 42,4% a 67,4 ± 0,3 %. El incremento en la frecuencia de células CD71⁺ así como la mayor intensidad de fluorescencia obtenida para este marcador, están de acuerdo con el aumento que se observa en la frecuencia de los CFU

de tipo eritroide durante esta semana de cultivo. También se evidencia que una pequeña proporción de estos precursores comienza a adquirir un fenotipo más diferenciado correspondiente a los eritroblastos intermedios (CD71⁺CD235a⁺) que pasan de tener una frecuencia de 0,7% a constituir un 8 ± 1 % de la población. La progresión hacia células con mayor grado de maduración puede relacionarse con la formación de un menor número total de colonias en los ensayos clonogénicos.

Por otro lado la proporción de células con el fenotipo CD71⁻CD235a⁺, característico de reticulocitos y GRs maduros, se mantiene constante y en un valor mínimo durante este periodo de cultivo.

A partir de todos estos análisis es posible afirmar que podría utilizarse con buenos resultados el MePEOpt 0-7 durante la primera semana de cultivo para expandir y mantener las HSPCs y precursores eritroides tempranos, y luego transferir las células expandidas en estas condiciones a los medios de compromiso y maduración eritroide MePERef 7-11 y MePERef 11-34.

2.2.4. Diferenciación eritroide de células cultivadas en MePEOpt 0-7

Con el fin de conocer el comportamiento de las poblaciones celulares obtenidas a partir del cultivo en MePEOpt 0-7 y, particularmente, de averiguar la factibilidad de obtener células eritroides partiendo de estas condiciones de cultivo optimizadas, se decidió llevar a cabo un cultivo posterior en MePERef, pero obviando el periodo de expansión de progenitores en este medio (días 0-7).

Para continuar con el cultivo, inicialmente se mezclaron todas las suspensiones celulares obtenidas a partir de las 3 repeticiones del cultivo en MePEOpt 0-7 con el objetivo de lograr una única suspensión de composición homogénea; las células se lavaron y el medio de cultivo se reemplazó por MePERef 7-11, cuya composición se encuentra descrita en el apartado 5.1 de *Materiales y Métodos*. La densidad celular inicial fue de 30.000 céls./ml y los cultivos se realizaron en placas de 6 pozos (3 ml de cultivo) (n=4). La Figura 46 muestra un gráfico que resume el procedimiento de cultivo y los análisis efectuados en las etapas siguientes.

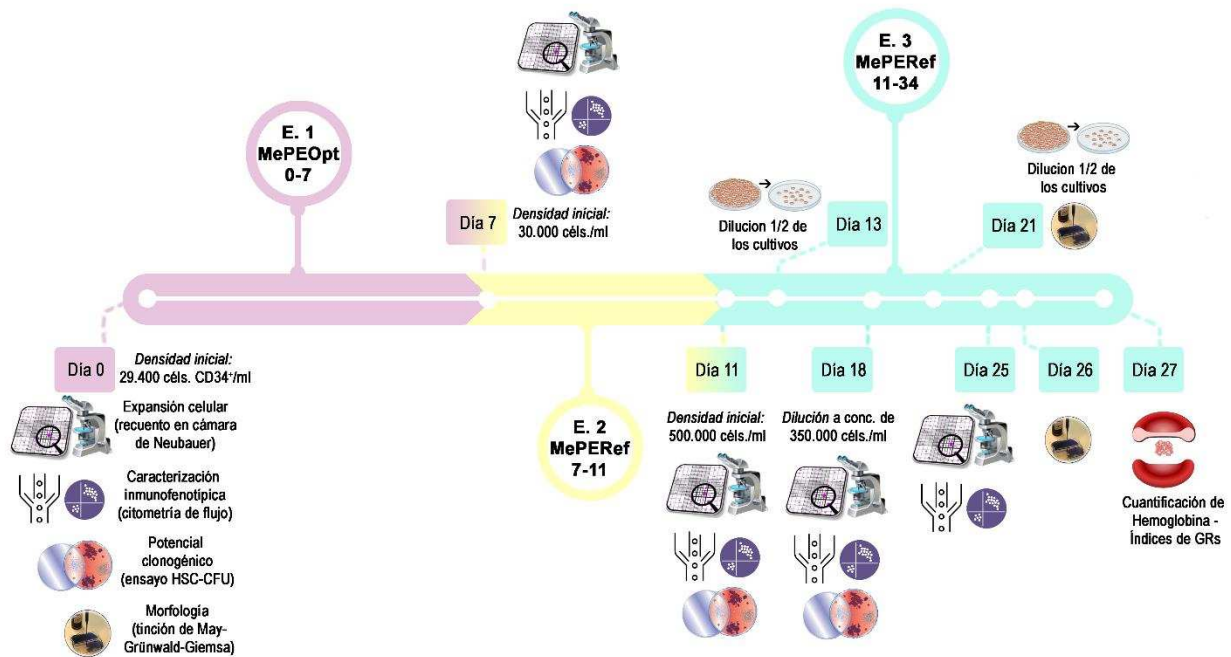


Fig. 46. Representación esquemática de la estrategia de trabajo. Esquema gráfico del proceso de cultivo de HSPCs en MePEOpt 0-7 y luego en MePERef 7-11 y MePERef 11-34 en el cual se indican los análisis realizados en cada etapa.

2.2.4.1. Estudio de la expansión celular

A partir de aquí se denominarán MePEOpt a los cultivos efectuados durante los primeros 7 días en MePEOpt 0-7, durante los días 7-11 en MePERef 7-11 y a partir del día 11 y hasta el final, en MePERef 11-34. De esta manera será más sencillo diferenciarlos de aquéllos efectuados en su totalidad en MePERef.

La expansión celular acumulada (desde el día de inicio de los cultivos) se incrementó y alcanzó un máximo de amplificación media de 571,3 veces (rango: 496,7-680,5) el día 18. A partir de este momento, el crecimiento se detuvo: el día 25 la amplificación media acumulada disminuyó fuertemente y fue de 304,6 veces (rango: 205,1-392,3). Esto estuvo relacionado con una importante caída en la viabilidad celular: hacia el día 18, la viabilidad comenzó a reducirse (media: 63,7%) y alcanzó su valor medio mínimo el día 25 (46%). Estos resultados se indican en la Figura 47.

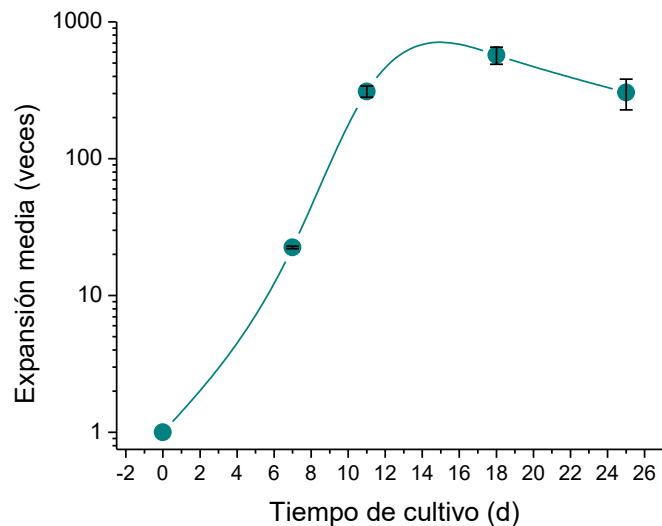


Fig. 47. Amplificación celular media. Expansión celular en MePEOpt 0-7 + MePERef 7-11 y 11-34, expresada como incremento en veces del número celular, en función del tiempo de cultivo (d). Los valores indicados son la media \pm D.E. en escala logarítmica (n=4).

2.2.4.2. Estudio del potencial clonogénico

El potencial clonogénico en los días 0 y 7 en MePEOpt 0-7 se encuentra descrito en el apartado 2.2.3.2.3 de esta sección. En la Figura 48 se muestran las frecuencias de los diferentes tipos y el número total de precursores obtenidos en los ensayos de formación de colonias a lo largo de todo el cultivo para facilitar su interpretación; la Figura 49 muestra imágenes representativas de las colonias obtenidas en el periodo 11-18 d.

En las figuras 48 y 49 se evidencia una caída del potencial clonogénico total de la suspensión a lo largo del cultivo, ya que se denota una disminución del número total de colonias, que presenta un máximo en el día 0 de cultivo de 169, disminuye fuertemente hacia el día 7 (51 ± 8), en el día 11 la media parece aumentar levemente, pero se debe tener en cuenta que el desarrollo de colonias aquí presentó una alta variabilidad (70 ± 30), por lo que podría considerarse que el número total se mantiene constante entre los días 7 y 11. El mínimo se alcanza en el día 18, en el cual la media fue de 1 colonia total, es decir, el potencial en este momento del cultivo puede considerarse nulo.

Como en cultivos anteriormente analizados, se obtuvo un aumento en el porcentaje de colonias de muy reducido tamaño y baja densidad, cuya clasificación no fue posible. Dichos cambios en la densidad y el tamaño de las colonias se evidencian en las fotografías de la Figura 48.

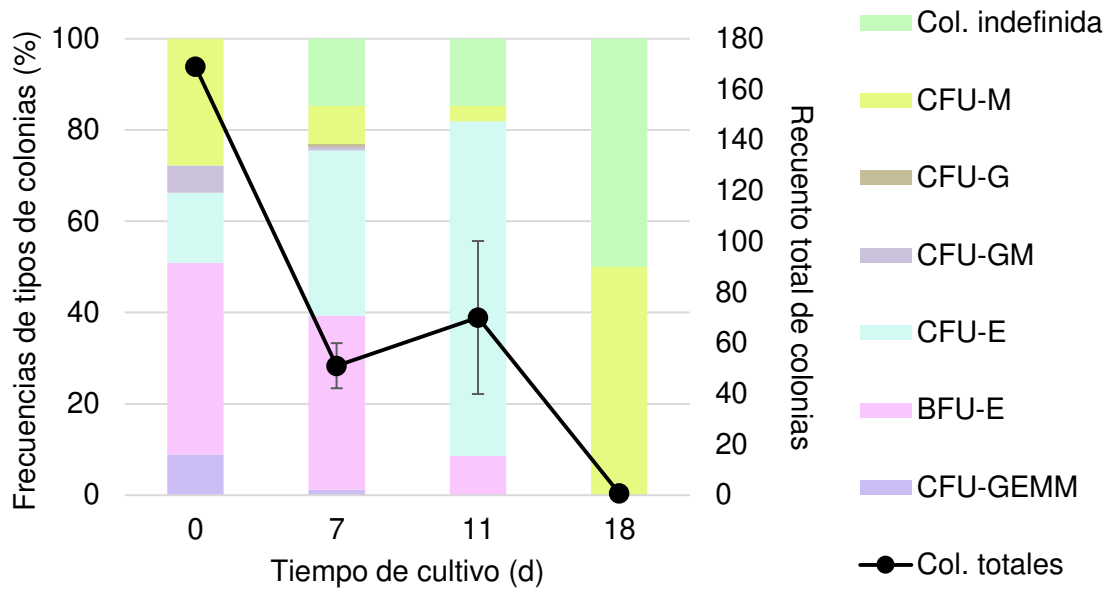


Fig. 48. Ensayos de formación de colonias. Análisis de CFUs presentes en cultivos en MePEOpt. Las barras muestran las frecuencias de los diferentes tipos de precursores presentes a lo largo del cultivo (porcentajes promedio; para el día 0, $n=1$; para los días 7-18, $n=3$). Los círculos negros indican el número total de colonias presentes en las placas de cultivo HSC-CFU, con sus respectivas D.E.

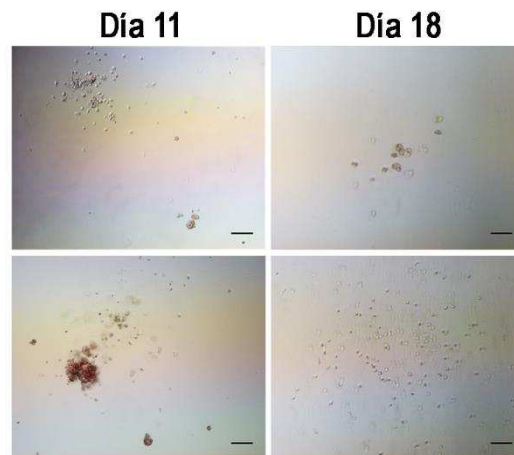


Fig. 49. Microscopías ópticas. Micrografías representativas de colonias obtenidas a partir de células cultivadas en MePEOpt en los días 11 y 18 de cultivo. Se observan colonias de diferente tipo (BFU-E, CFU-E, CFU-M y Colonias indefinidas). Las barras de escala indican 100 μm (magnificación 100X).

La frecuencia de BFU-E se mantiene casi constante durante la primera semana. Luego, disminuye marcadamente hacia el día 11 (8,6%) hasta hacerse nulo; simultáneamente se incrementa el porcentaje de CFU-E, lo que indicaría que los progenitores tempranos BFU-E, predominantes al inicio de los cultivos, se diferenciaron en mayor medida a partir del cambio a MePERef 7-11. Cabe destacar que el potencial eritroide en los cultivos se mantiene siempre muy elevado e, incluso, levemente creciente: analizando la frecuencia total de CFU-GEMM, BFU-E y CFU-E, se observó

que en el día 0 la frecuencia fue de 66,3%; en el día 7, de 75,6% y en el día 11, de 81,9%.

En cuanto a los progenitores más primitivos, los CFU-GEMM, se observa que su frecuencia es baja incluso en el inicio de los cultivos y se reduce hasta ser nula en el día 11 (porcentajes iniciales de 8,9 y 1,2% en los días 0 y 7). Su ausencia en los días 11 y 18 se debería a la diferenciación progresiva de los precursores por la acción de los factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo.

Las CFU-M y CFU-GM se reducen progresivamente desde el día 0 hasta el día 11 (de 27,8% a 3,3% y de 5,9% a 0%, respectivamente). El elevado porcentaje de CFU-M en el día 18 se debe a que fue una de las dos colonias totales halladas en todos los cultivos. Esto refuerza las observaciones realizadas durante el cultivo en MePEOpt 0-7 acerca de la capacidad del medio optimizado para mantener selectivamente precursores del linaje eritroide, en detrimento de los precursores de linaje de granulocitos y macrófagos.

2.2.4.3. Caracterización inmunofenotípica y morfológica

En el análisis citométrico realizado en los días 0, 7, 11, 18 y 25 de cultivo en MePEOpt, se evaluaron los marcadores de superficie celular CD34, CD45, CD71 y CD235a. Los perfiles de expresión obtenidos se muestran en la Figura 50.

El marcador CD34 se redujo gradualmente hasta alcanzar el mínimo el día 11 ($0,2 \pm 0,2$ %). Lo mismo ocurrió con el marcador CD45, que sigue aproximadamente el mismo perfil de expresión, excepto que, durante la primera semana, ocurre un leve incremento en su frecuencia de expresión (alcanza un máximo de 85 ± 4 %). Para este marcador el mínimo se alcanza el día 18, llegando a ser nulo en el día 25 ($0,9 \pm 0,3$ %), lo que indica la pérdida de la población leucocitaria y una elevada selectividad del medio de cultivo (Figura 50.A). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en los ensayos de formación de colonias, en los cuales los precursores predominantes a lo largo del cultivo son los de tipo eritroide.

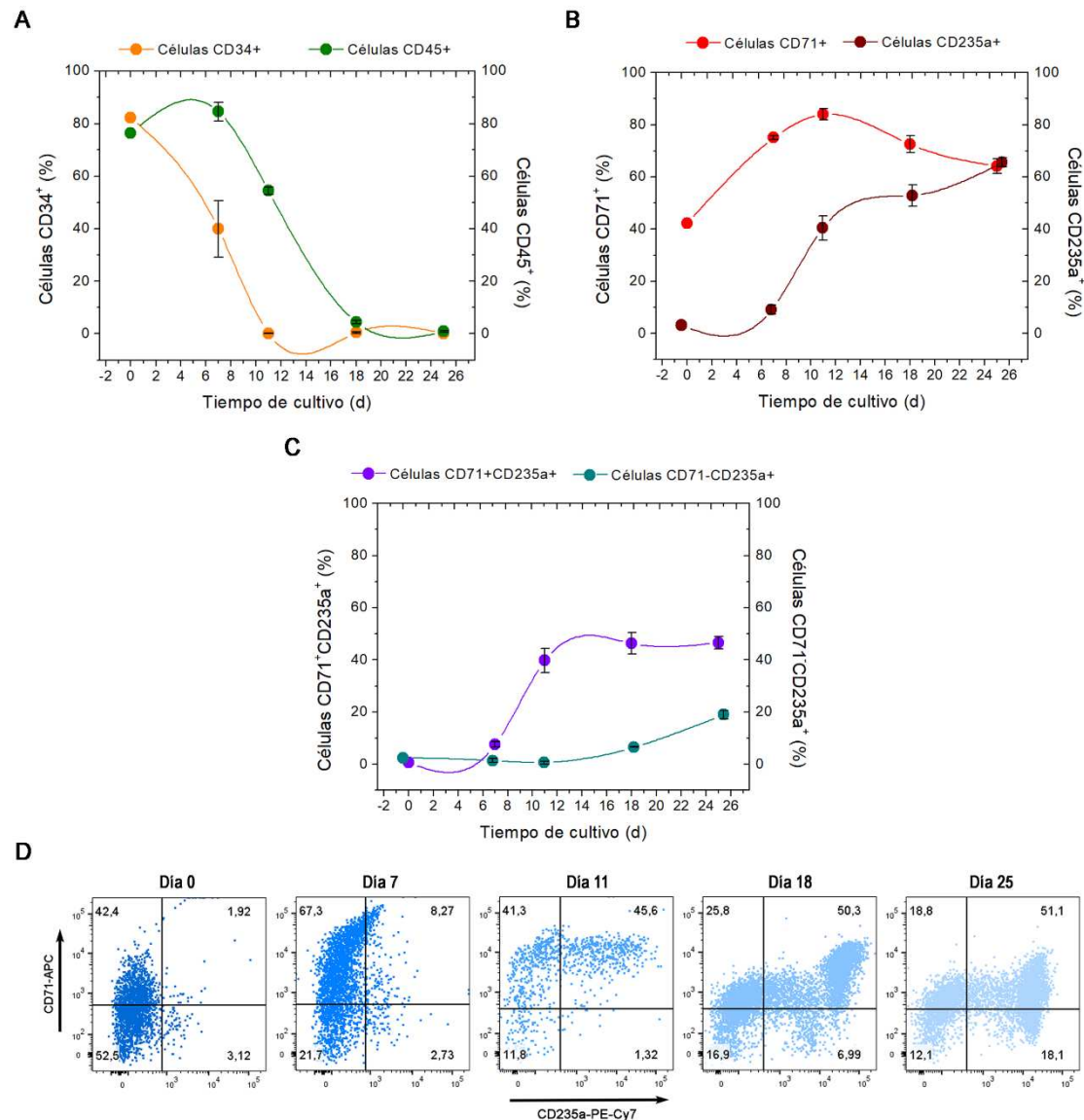


Fig. 50. Caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo. Los paneles muestran los porcentajes de las poblaciones celulares de interés presentes a lo largo del cultivo en MePEOpt. Los resultados se expresan como porcentajes medios \pm D.E. ($n=4$). **A.** Células CD34⁺ y células CD45⁺; **B.** células CD71⁺ y células CD235a⁺; **C.** células CD71⁺CD235a⁺ y células CD71⁻CD235a⁺. **D.** Progresión de la co-expresión de hCD71-hCD235a de las células cultivadas en MePEOpt. Se muestran los gráficos de puntos de un cultivo representativo, indicando las estadísticas en cada cuadrante.

Por el contrario, la expresión del marcador CD71 se incrementa gradualmente desde 42,2% hasta que, en el día 11, se duplica la proporción de células que lo expresan ($84 \pm 2\%$) (Figura 50.B). A partir de este momento se produce una reducción en su frecuencia, de manera concordante con el cambio a MePERef 11-34, que carece de factores como la hidrocortisona, que puede retrasar la diferenciación. En el día 25 es expresado por el $64 \pm 3\%$ de las células.

También mediante esta caracterización inmunofenotípica se corrobora una maduración eritroide progresiva, previamente evidenciada en los ensayos de formación

de colonias, ya que se observa la adquisición gradual de CD235a, desde un valor inicial mínimo de 3,2% hasta hacerse máximo en el día 25 ($65 \pm 2\%$) (Figura 50.B).

En la Figuras 50.C y 50.D es posible ver que la población celular progresa desde un fenotipo no eritroide en el día 0, con ausencia de co-expresión de ambos marcadores, hasta un fenotipo predominantemente eritroide intermedio ($CD71^+CD235a^+$) en el día 11, el cual se mantiene hasta el final del cultivo. Adicionalmente, se denota un incremento en la proporción de células eritroides maduras (reticulocitos y GRs) desde el día 18, hasta hacerse máximo el día 25 ($19 \pm 2\%$). Este aumento se comienza a producir luego del cambio final de medio de cultivo al medio de maduración MePERef 11-34.

Si bien mediante esta caracterización se comprobó la proliferación y producción eritroide, el porcentaje final de células maduras resultó bajo. De todos modos, es posible afirmar que las células eritroides con un grado aún heterogéneo de maduración, son la población predominante al final del cultivo (el porcentaje de leucocitos es mínimo). La predominancia de la población celular eritroide desde el día 18 fue evidenciada también macroscópicamente, ya que las placas de cultivo presentaron depósitos de células de color rojo en el centro, al igual que los sedimentos celulares obtenidos por centrifugación (Figura 51.B).

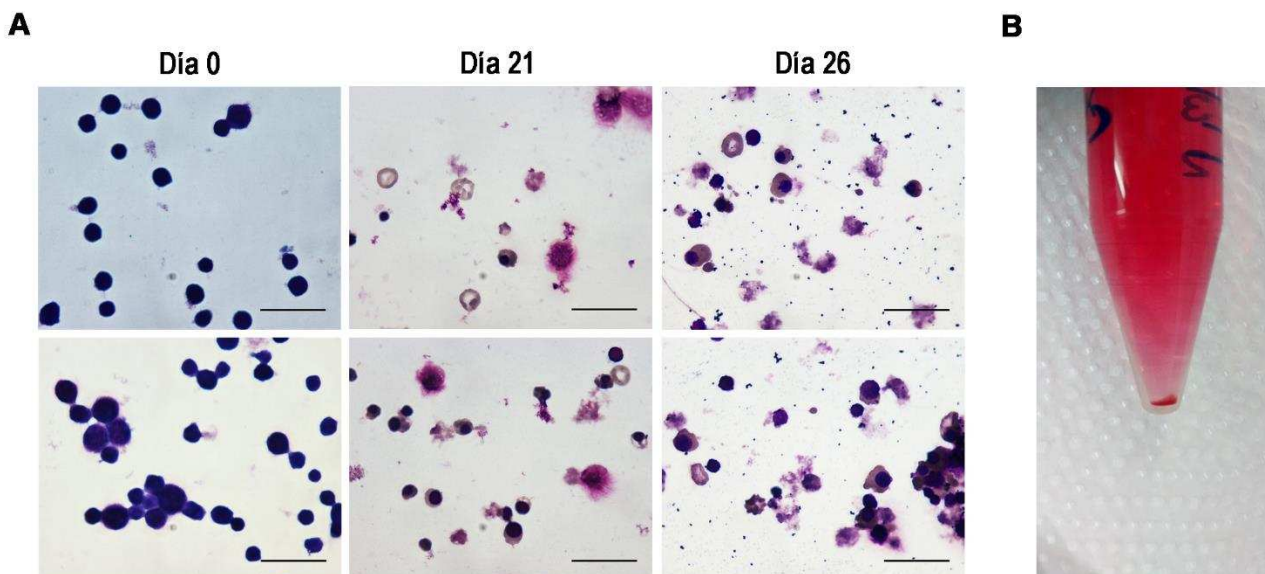


Fig. 51. Diferenciación celular. **A.** Microscopías ópticas. Análisis morfológico de las células presentes en los cultivos en MePEOpt mediante tinciones de May-Grünwald-Giemsa de cultivos representativos (días 0, 21 y 28). Las barras de escala indican $50\ \mu\text{m}$ (magnificación 1000X). **B.** Fotografía del *pellet* celular. *Pellet* obtenido a partir de un cultivo representativo (D. 18).

Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante análisis morfológico (por tinción de May-Grünwald-Giemsa) de las células presentes en cultivo en MePEOpt los

días 0, 21 y 28, tal como se muestra en la Figura 51.A. Se evidencia que en el inicio de los cultivos, las células se presentaron como MNCs agranulares basofílicas, de un tamaño relativamente homogéneo y núcleos grandes. En el día 21 y 28 la morfología celular predominante es la correspondiente a eritroblatos ortocromáticos (con núcleos excéntricos), reticulocitos y GRs. Sin embargo, en general exhiben mayor diámetro que los GRs humanos generados *in vivo*. Los leucocitos basofílicos fueron nulos o muy escasos.

2.2.4.4. Cuantificación de hemoglobina e índices de glóbulos rojos

Para la cuantificación de HGB y demás parámetros de GRs mediante el método automático (contador hematológico) se partió de una suspensión celular de 147.500 céls. viables/ml. La misma se concentró mediante centrifugación alrededor de 540 veces. A pesar del paso de concentración, el análisis reveló que la mayoría de los parámetros se encontraban en los límites del rango de cuantificación del equipo, por lo que los resultados aquí presentados constituyen una aproximación. Así, se determinó mediante esta técnica que la suspensión (en el día 27) contenía de manera aproximada:

- GRs/ml: 74.000 (concentración en la suspensión inicial)
- HGB: 0,1 g/dl
- Hematocrito: 0,5%

Con el objetivo de intentar mejorar la calidad de la determinación de HGB en la suspensión, se empleó el método manual de cianometahemoglobina modificado, empleando la suspensión concentrada. Se procedió como se indica en la sección 4.3.2 de *Materiales y Métodos*, lo que permitió obtener la siguiente curva de Absorbancia en función de la concentración del estándar de HGB (Figura 52). En la zona de linealidad, se calculó la ecuación de la recta empleando el programa OriginLab. La concentración de las muestras se determinó reemplazando el valor de absorbancia correspondiente a cada una de ellas en la ecuación calculada.

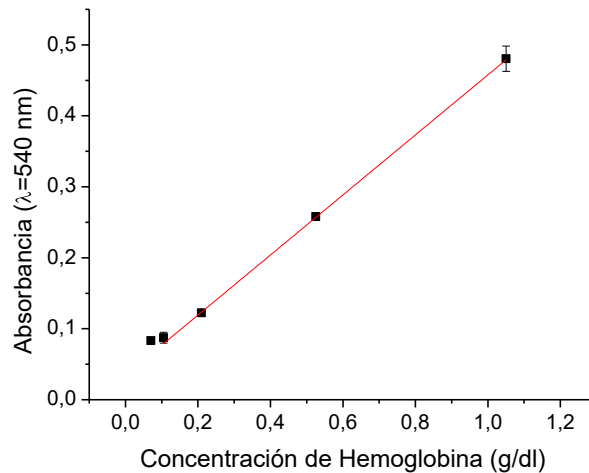


Fig. 52. Cuantificación de hemoglobina mediante el método de cianometahemoglobina modificado.

La Ecuación 17 constituye la ecuación de la recta obtenida a partir del gráfico anterior:

$$y = 0,03463 + 0,42316 x X \quad (17)$$

El R^2_{aj} de la misma fue 0,998. La absorbancia media ($n=2$) obtenida para la muestra concentrada fue de 0,114, por lo que la concentración de hemoglobina en esta suspensión concentrada fue de 0,186 g/dl.

Con estos valores de concentración de HGB y los valores de concentración de GRs y de hematocrito estimados por el analizador automático, se aproximó un rango de valores para los parámetros de VCM, HCM y CHCM, de acuerdo a las ecuaciones 8-10 indicadas en la sección 4.3.1 de *Materiales y Métodos*. Los valores obtenidos (Tabla 24) fueron:

Tabla 24. Índices HCM, VCM y CHCM de las células eritroides generadas en cultivo en MePEOpt evaluados por diferentes métodos.

	HGB según contador hematológico	HGB según método de cianometahemoglobina
$HCM \left(\frac{pg}{cél.}\right)$	25	46,5
$VCM (fl)$	125	125
$CHCM \left(\frac{g}{dl}\right)$	20	37,2

HCM (Hemoglobina celular media) es la masa promedio de HGB en los GRs. El valor de referencia para los adultos es típicamente 29 ± 2 pg/célula [169].

VCM (Volumen celular medio) se define como el tamaño de los GRs y los valores normales son 87 ± 7 fl [169].

CHCM (Concentración de hemoglobina celular media) indica la cantidad de hemoglobina por unidad de volumen. Correlaciona el contenido de hemoglobina con el volumen celular y sus valores normales son 34 ± 2 g/dl [169].

Los valores obtenidos para los parámetros no se encuentran en los rangos normales, pero esto puede deberse a que, como se mencionó previamente, los valores calculados constituyen aproximaciones debido a la reducida concentración de la suspensión celular. Sin embargo, también pudo haber ocurrido que alguna o un conjunto de las condiciones de cultivo hayan afectado o inhibido parcialmente la normal diferenciación de las células eritroides.

**Modificación genética de HSPCs.
Desarrollo y análisis de cultivos de
células recombinantes**

3. MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS HSPCs CON LA SECUENCIA DE hEPO. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE CULTIVOS DE CÉLULAS RECOMBINANTES

3.1. Construcción de vectores lentivirales para expresión en células eucariotas

Con el objetivo de expresar las proteínas hEPO y GFP en HSPCs, se construyeron vectores lentivirales de tercera generación como herramienta de transferencia de material genético. Para tal fin fue necesario, como primer paso, clonar las secuencias codificantes de cada una de las proteínas en vectores lentivirales de transferencia, para luego llevar a cabo el ensamblado de partículas lentivirales y su posterior titulación.

3.1.1. Construcción del vector de transferencia pLV-EF1 α -EPO

Mediante la modificación genética de HSPCs con la secuencia de la EPO humana se pretende estudiar si es posible lograr la sobreexpresión de esta hormona por parte de las HSPCs y analizar los efectos de este enfoque sobre su crecimiento y diferenciación eritroide en ensayos *in vitro*. Así, el objetivo principal es evaluar la factibilidad de generar un sistema de células hematopoyéticas capaces de autoabastecerse con factores de crecimiento (en este caso hEPO) para así reducir el consumo de los mismos en la producción de células eritroides.

Inicialmente, para la construcción del vector *pLV-EF1 α -EPO* se partió del vector pLV-CMV-hEPO existente en nuestro laboratorio. Sin embargo, el promotor CMV se reemplazó por el EF1 α que, en general, permite una expresión robusta, constitutiva y de largo plazo del gen de interés en tipos celulares en los cuales los promotores CMV son frecuentemente silenciados, como es el caso de las HSPCs. El promotor se obtuvo a partir del plásmido pLV-EF1 α .

Para llevar a cabo el clonado, en una primera etapa se amplificó y purificó el ADN de ambos vectores mediante una mini y maxipreparación de ADN plasmídico, lo que permitió obtener cantidad suficiente del ácido nucleico, necesario para los pasos siguientes.

A continuación, se realizó la digestión secuencial de ambos vectores con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Nde*I. Los sitios de restricción para estas enzimas de digestión se encuentran flanqueando las secuencias de los promotores EF1 α y CMV en los vectores pLV-EF1 α y pLV-CMV-hEPO, respectivamente. Por lo tanto, luego de la digestión secuencial en cada caso se obtuvieron por un lado, los plásmidos sin promotor y, por otro, los promotores. Para corroborar la eficiencia de la digestión, se analizaron los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V). En la Figura 53.A, en las calles 2, 3 y 4 pueden observarse los productos de digestión. La calle 1 muestra el vector pLV-CMV-hEPO sin digerir, empleado como control de tamaño.

La calle 2 evidencia la digestión adecuada del pLV-CMV-hEPO, ya que se observa que el vector linealizado presenta un retardo en la movilidad electroforética respecto del vector no digerido presente en la calle 1 y concordante con el tamaño del vector sin promotor (9,7 kb); asimismo se observa un fragmento de bajo tamaño (0,5 kb aproximadamente) correspondiente al promotor. En las calles 3 y 4, la digestión del vector pLV-EF1 α se efectuó por duplicado para obtener de esta manera una mayor cantidad de inserto. Las bandas superiores corresponden al vector y las inferiores al promotor EF1 α .

Posteriormente, los fragmentos de ADN correspondientes al vector pLV-CMV-hEPO digerido, sin promotor, y al promotor EF1 α (1.230 pb) se purificaron desde el gel y se cuantificaron por lectura espectrofotométrica a $\lambda=260$ nm para efectuar, posteriormente, la ligación y transformación de células competentes. Siete de las ocho colonias obtenidas en la placa de V+I resultaron positivas cuando se analizó la presencia del inserto (EF1 α) mediante reacción de PCR de colonias, tal como se observa en la Figura 53.B: en las calles 1 a 7 se observa una banda del mismo tamaño que el control positivo de PCR presente en la calle 10. A partir de 4 de estos 7 clones pre-seleccionados, se corroboró que dos de ellos contenían el inserto, mediante amplificación (miniprep) y posterior digestión con las enzimas *XhoI* y *NdeI* que liberan un fragmento de 1.000 pb si el inserto se incorporó correctamente, tal como se observa en la Figura 53.C, en las calles 5 y 7. Estos clones, se amplificaron y criopreservaron a -70°C .

3.1.2. Construcción del vector de transferencia pLV-EF1 α -GFP

Por otro lado, se llevó a cabo la construcción del vector *pLV-EF1 α -GFP* ya que la proteína verde fluorescente GFP, cuya expresión puede ser cualitativa y cuantitativamente determinada empleando citometría de flujo o microscopía de fluorescencia, fue empleada como sustituto de hEPO para controlar la factibilidad de incorporación de material genético con vectores lentivirales en HSPCs en las condiciones experimentales que se probaron. En este vector la secuencia de GFP se encuentra en el mismo contexto regulatorio que el gen de interés hEPO, por lo que constituye una manera auxiliar para evaluar el éxito de un determinado evento de transducción con las herramientas disponibles en nuestro laboratorio.

Cabe aclarar que no es posible correlacionar directamente la eficiencia de transducción obtenida empleando un vector que codifica GFP con la eficiencia obtenida con el vector lentiviral que codifica hEPO. Esto se debe a que los vectores lentivirales pueden transducir porcentajes variables de células e integrar números variables de copias del ADN en el genoma de la células blanco dependiendo de las condiciones

experimentales tales como el protocolo de transducción empleado, el número de eventos, la preparación del vector y la secuencia; adicionalmente, existen factores celulares intrínsecos que pueden afectar los niveles de expresión del transgen, particularmente en HSPCs, las cuales se sabe que tienden a limitar la eficiencia de transducción lentiviral.

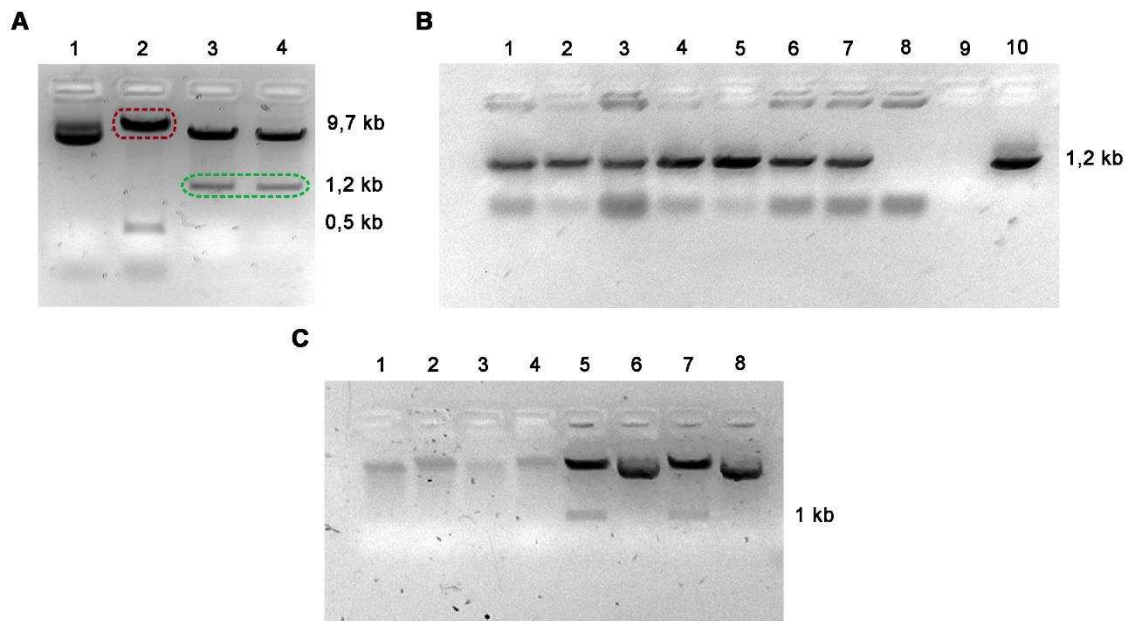


Fig. 53. Electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V): **A.** Digestión con enzimas de restricción. Análisis de los productos de digestión secuencial con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I de: Calle 2, pLV-CMV-hEPO; Calles 3 y 4, pLV-EF1 α . En la Calle 1 se muestra un control de pLV-CMV-hEPO sin digerir. Los fragmentos purificados a partir del gel se indican con líneas punteadas. **B.** PCR. *Screening* de colonias recombinantes: Carril 1 a 8, productos obtenidos partir de las colonias recombinantes; carril 9, control de reactivos de PCR; carril 10, control positivo de reacción. **C.** Digestión con enzimas de restricción. Productos de digestión de los clones seleccionados con las enzimas *Xho*I y *Nde*I. Carriles 1, 3, 5 y 7: productos de amplificación digeridos; Carriles 2, 4, 6 y 8: productos de amplificación no digeridos.

Para generar el vector de expresión *pLV-EF1 α -GFP* se empleó el plásmido pLV-CMV-GFP existente en el laboratorio. La secuencia del promotor CMV (538 pb) se escindió mediante digestión secuencial con las enzimas *Nde*I y *Bam*HI. Por otro lado, el vector pLV-EF1 α se trató con las mismas enzimas para obtener la secuencia del promotor EF1 α (esta digestión fue la misma que la utilizada para el clonado de pLV-EF1 α -EPO). A continuación, se analizó la identidad de los productos de digestión (Figura 54.A), se purificaron el vector pLV-GFP (-CMV) y el inserto EF1 α a partir del gel, y con ambos se efectuó una reacción de ligación y posterior transformación, tal como se indicó para la obtención del plásmido pLV-EF1 α -EPO.

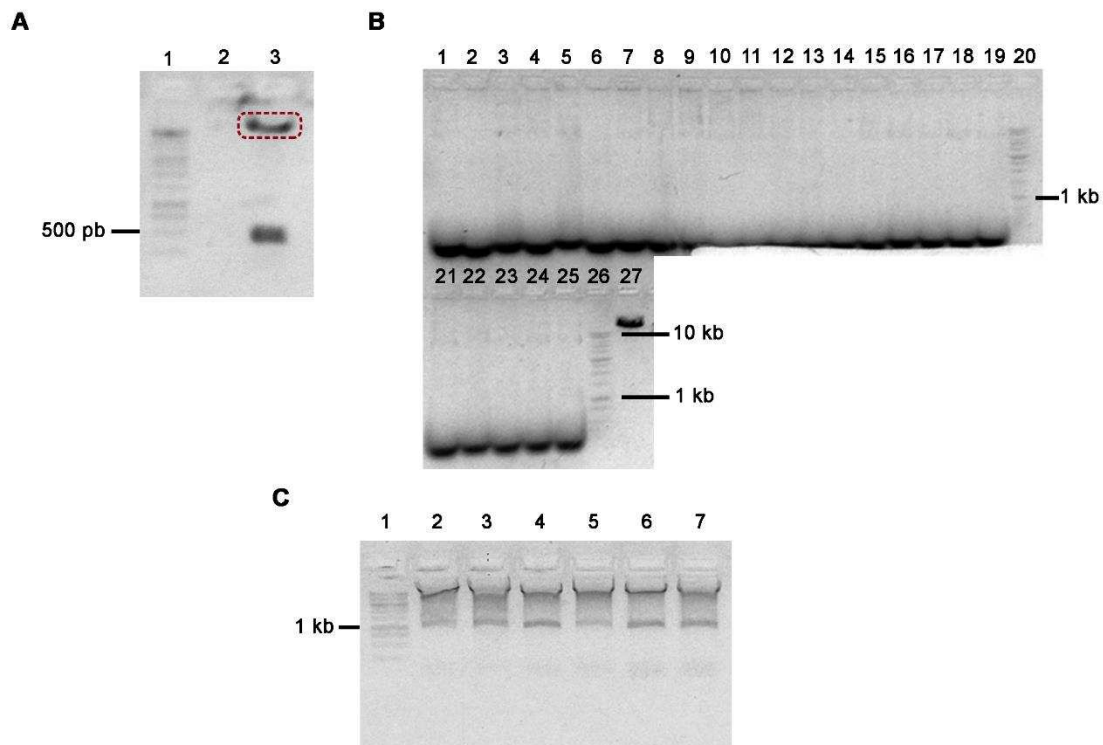


Fig. 54. Electroforesis en geles de agarosa 1% (P/V): **A.** Digestión con enzimas de restricción. Análisis del producto de digestión secuencial con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I. Calle 1, Marcador de masa molecular *Bench Top Ladder* 1 kb; Calle 3, pLV-CMV-GFP. El fragmento purificado a partir del gel se indica con líneas punteadas. **B.** Digestión con enzimas de restricción de productos de miniprep. *Screening* de colonias recombinantes por digestión con *Nde*I y *Xho*I. Carriles 1 a 19 y 21 a 25, productos de digestión; carril 20 y 26, Marcador de masa molecular *Bench Top Ladder* 1 kb; carril 27, control de digestión con *Nde*I/*Xho*I del vector pLV-CMV-GFP, que carece de sitios *Xho*I. **C.** Digestión con enzimas de restricción de productos de minipreps comercial. Análisis de los clones pre-seleccionados a partir de B., con las enzimas *Xho*I y *Nde*I. Carril 1, *Bench Top Ladder* 1 kb; Carriles 2 a 7, productos de amplificación digeridos.

Seguidamente, se seleccionaron colonias individuales de la placa de transformación V+I (24 clones) y se incubó cada una de ellas en 5 ml de medio LB-Ampicilina. Los cultivos se incubaron con agitación a 37°C durante 16-20 h. Luego, se purificó ADN plasmídico de las colonias recombinantes positivas, utilizando la técnica tradicional de minipreparación de ADN (sección 2.3.1.). Las minipreparaciones de los clones seleccionados fueron digeridas con enzimas de restricción (*Xho*I y *Nde*I) para confirmar la presencia del inserto correspondiente. En este caso, la digestión con ambas enzimas permitiría la liberación de un fragmento de 1.000 pb. Sin embargo, el proceso de purificación del ADN plasmídico no fue muy eficiente y se encontró elevada contaminación con ARN; además, no se observaron bandas fuertes como producto de la digestión, sino que se detectaron bandas muy débiles para el tamaño esperado. Por esta razón, el ADN plasmídico de estos clones se volvió a purificar, pero esta vez empleando el *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega) y se

digirió nuevamente con las enzimas *XhoI* y *NdeI*. Por otro lado, el control de digestión con pLV-CMV-GFP generó una banda del tamaño esperado que evidencia que el vector sólo se cortó con *NdeI* en un único sitio, de modo que el mismo se linealizó en el carril 27 (Figura 54.B). Una vez digeridos los productos de miniprep, se comprobó que los 6 clones resultaron positivos (carriles 2 a 7) ya que liberaron un fragmento de 1.000 pb (Figura 54.C).

3.2. Producción de los vectores lentivirales LVs EF1 α -GFP y LVs EF1 α -EPO

Los vectores lentivirales de tercera generación pseudotipados con la VSV-G fueron generados por transfección transiente de células de la línea HEK-293T/17 con cuatro plásmidos: pREV, pVSV-G, pMDL [154,155] y los vectores de transferencia pLV-EF1 α -EPO y pLV-EF1 α -GFP, en cada caso, tal como se indica en el apartado 6.1 de *Materiales y Métodos*. Al cabo de 48 h post-transfección, los sobrenadantes celulares se cosecharon y clarificaron por centrifugación a baja velocidad y filtración (0,45 μ m). Finalmente, se almacenaron a -70°C, en el caso de los LVs EF1 α -GFP, hasta su utilización para transducción de las células y, en el caso de los LVs EF1 α -EPO, hasta su concentración por centrifugación a 65.000 *g* durante 3 h (apartado 6.2 de *Materiales y Métodos*).

3.2.1. Titulación de los vectores lentivirales

Una vez obtenidos los lotes de partículas LVs, las mismas debieron ser caracterizadas para determinar su título físico. Así, para la determinación del título de alícuotas de las partículas lentivirales se empleó el *kit* de titulación *QuickTiter Lentivirus Titer Kit* (Cell Biolabs, Inc.). Este *kit* fue diseñado para detectar únicamente la proteína p24 del virus del VIH que se encuentra asociada a partículas. La titulación se efectuó a partir de un estándar de proteína p24 recombinante provisto con el *kit*. Con esta metodología se calcula el título físico (cantidad de proteína p24 del virus VIH-1 asociada a partículas lentivirales ensambladas), expresándolo en partículas lentivirales por mililitro (LPs/ml). Este valor no es el título correspondiente a unidades de transducción, generalmente expresado en UT/ml, para lo cual es necesario llevar a cabo un método que cuantifique las partículas lentivirales con capacidad de transducir eficientemente las células de interés. De todas formas, el título de transducción se puede aproximar (aunque varía entre diferentes tipos de células) teniendo en cuenta que por lo general 10⁶ UT/ml corresponden a 10⁸-10⁹ LPs/ml. Los títulos obtenidos para los dos lotes de lentivirus producidos se detallan en la Tabla 25 y fueron obtenidos a partir de la curva de absorbancia del estándar (a longitud de onda de 450 nm) en función de su concentración (ng/ml), que se indica en la Figura 55.

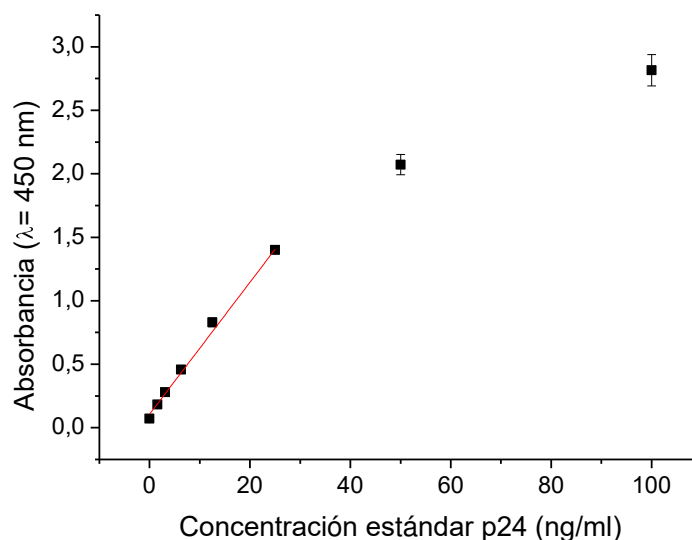


Fig. 55. Titulación de vectores lentivirales.

La Ecuación 18 describe la regresión lineal obtenida a partir del rango de concentraciones indicado en la Figura 55 (rango lineal).

$$y = 0,1063 + 0,0519 x X \quad (18)$$

El R^2 aj de la misma fue 0,99.

Tabla 25. Título de partículas lentivirales de los LVs EF1 α -GFP y LVs EF1 α -EPO (tanto concentrados como no concentrados)

LVs	Concentración de proteína p24 asociada a LPs (ng/ml)	Título físico (LPs/ml)	Título de transducción aproximado (UT/ml)
LVs EF1 α -GFP	70,5	$8,8 \times 10^8$	$8,8 \times 10^5 - 8,8 \times 10^6$
LVs EF1 α -EPO	20,4	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^5 - 2,5 \times 10^6$
LVs EF1 α -EPO (concentrado por centrifugación)	808,6	1×10^{10}	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$

De esta manera, es posible comprobar que los vectores fueron exitosamente ensamblados y que el vector LVs EF1 α -EPO se concentró aproximadamente 40 veces.

3.3. Desarrollo y optimización de un protocolo de modificación genética de HSPCs empleando LVs

3.3.1. Optimización de la suplementación del medio de transducción

Debido a la existencia de múltiples factores intrínsecos y extrínsecos que dictan la eficiencia de transducción celular, se decidió establecer un conjunto de condiciones que resulten adecuadas para la modificación genética de las HSPCs en particular, en función de sus propiedades: crecimiento en suspensión, tendencia a limitar la eficiencia de transducción lentiviral, quiescencia y replicación celular inducida por citoquinas tempranas como hSCF e hIL-3.

Con este fin se utilizaron los LVs EF1 α -GFP, de modo que los niveles de expresión y la proporción de HSPCs modificadas pudieron ser fácilmente determinados por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

En primer lugar se generó un diseño experimental con el objeto de encontrar las concentraciones de citoquinas en el medio de transducción (MT) que favorezcan la transducción lentiviral y, adicionalmente, permitan mantener la viabilidad celular. Por limitaciones en el consumo de reactivos, se realizó un diseño *D-optimal* a dos niveles, en el cual los factores analizados fueron la concentración de hSCF y la concentración de hIL-3 en el MT con las siguientes restricciones:

- $5 \text{ ng/ml} < [\text{hSCF}] + [\text{hIL3}] < 50 \text{ ng/ml}$
- $0 \text{ ng/ml} < [\text{hIL3}] < 20 \text{ ng/ml}$
- $0 \text{ ng/ml} < [\text{hSCF}] < 50 \text{ ng/ml}$

Las respuestas analizadas fueron: R1, % de células GFP⁺; R2, intensidad de fluorescencia media de GFP y R3, número de células viables. De este modo, el *software Design Expert* sugirió 11 corridas experimentales con combinaciones aleatorias de niveles de los factores que cumplan con las restricciones indicadas en relación a la suplementación del MT. A estas 11 corridas se adicionaron dos más correspondientes a un control de transducción sin citoquinas y un control de transducción negativa (sin LVs). Las corridas realizadas se resumen en la Tabla 10 de la sección 6.4 de *Materiales y Métodos*.

El procedimiento experimental involucró inicialmente la purificación de las HSPCs mediante dos pasos sucesivos de SI positiva. Sin embargo, al finalizar el segundo paso de selección sólo se obtuvieron 90.000 células totales con un 80,2% de pureza (CD34⁺), lo que hacía inviable realizar los 13 cultivos. De este modo, para incrementar el número celular y favorecer la integración de las secuencias lentivirales en el genoma celular se llevó a cabo una pre-incubación de las HSPCs purificadas en medio con citoquinas tempranas (hIL-3 5 ng/ml y hSCF 50 ng/ml) durante 4 días.

A continuación se iniciaron los 13 cultivos con las combinaciones de factores para suplementar el MT indicadas por el *software*. El número inicial de células totales fue de 44.000, es decir aproximadamente 35.000 céls. CD34⁺ totales.

Dada la experiencia previa, en la cual no se habían hallado buenas eficiencias en suspensión empleando IMDM basal como medio de transducción, se decidió generar un nuevo medio. El mismo consistió en una dilución del medio semisólido con metilcelulosa básico en las siguientes proporciones: LVs:IMDM basal:medio semisólido básico (2:1:1) y se denominó Medio de Transducción (MT). Asimismo, la MOI constante empleada para esta optimización fue de 5 UT/ml y el volumen de transducción fue de

300 μ l finales en placas de 24 pozos, de modo de incrementar la relación superficie/volumen para favorecer el contacto LVs-HSPCs.

Al finalizar las 72 h de incubación con los LVs, se evaluaron las tres respuestas mencionadas y se obtuvieron los resultados que se observan en la Tabla 26. Los mismos se analizaron con el software *Stat-Ease Design Expert 7.0.0*. La Figura 56 muestra histogramas representativos correspondientes al análisis citométrico de algunas de las corridas experimentales.

Tabla 26. Resumen de cada una de las corridas experimentales realizadas para optimizar la suplementación con citoquinas del MT (diseño *D-optimal*). Se indican el orden estándar, orden de corrida y concentraciones a evaluar de cada uno de los factores. También se muestran los valores obtenidos para las tres respuestas analizadas luego de las 72 h de transducción: R1, Porcentaje de células GFP⁺; R2, intensidad media de fluorescencia y R3, número de células viables, según el orden de corrida (Ord. Corrida).

		F 1	F 2	R 1	R 2	R 3
Ord. Est.	Ord. Corrida	hSCF	hIL-3	Céls. GFP ⁺	Intensidad media fluorescencia	Número de céls. viables
		ng/ml	ng/ml	%		
5	1	50,0	0,0	16,0	90,8	18.750
8	2	16,0	14,5	47,0	368,9	41.250
3	3	0,0	5,0	43,1	182,1	18.750
6	4	30,0	20,0	49,4	334,2	68.750
4	5	0,0	20,0	45,6	267,7	21.250
1	6	20,0	0,0	13,0	78,5	22.500
2	7	28,5	9,5	45,4	301,5	37.500
7	8	0,0	12,5	47,9	238,4	22.500
9	9	43,3	6,7	44,0	253,1	33.750
10	10	17,0	9,0	42,8	254,0	41.250
11	11	30,0	20,0	48,2	322,4	55.000
-	Sin LVs	20,0	0,0	0,3	64,6	16.250
-	Sin citoquinas	0,0	0,0	7,1	37,1	7.500

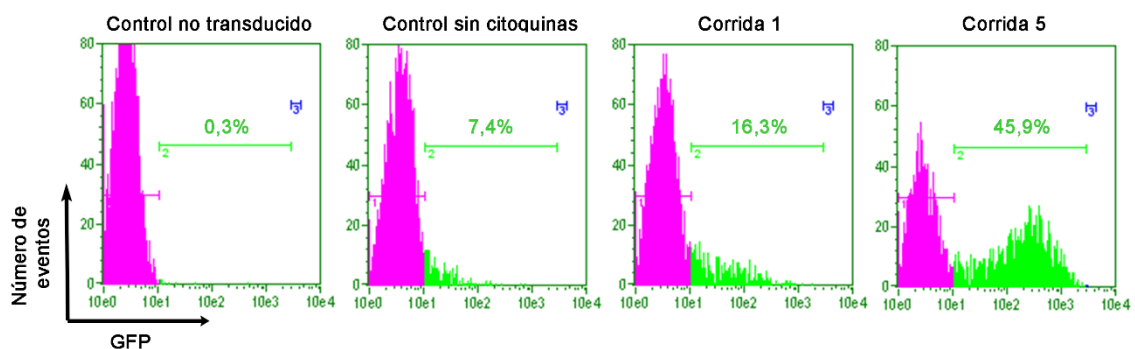


Fig. 56. Citometrías de flujo. Histogramas representativos (Número de eventos vs. Intensidad media de fluorescencia verde) obtenidos mediante el análisis de diferentes corridas (72 h). En cada uno de ellos se indica la población GFP⁺ y la frecuencia correspondiente.

Como puede observarse al contrastar las respuestas obtenidas para las corridas 1 a 11 con la corrida sin citoquinas, la incorporación de estos factores de crecimiento en el MT es realmente necesario ya que su ausencia se correlaciona con una reducción importante en el número de células viables y en el porcentaje de células que expresan la proteína de interés, luego de la transducción.

Las evaluaciones estadísticas se llevaron a cabo del mismo modo en que se efectuaron los análisis en el programa *Stat-Ease Design Expert 7.0.0 Software* para optimizar la composición del medio de expansión para la producción de células eritroides.

3.3.1.1. Respuesta 1: Porcentaje de células GFP⁺

En el caso de la R1, el modelo sugerido por el *software* fue el modelo cuadrático. Para éste la significancia dada por el p-valor fue de 0,0005, la falta de ajuste presentó la menor significancia entre todos los modelos propuestos (p-valor=0,33) y el R²aj fue de 0,98.

Luego de seleccionar los términos de manera manual, se realizó el ANOVA (Tabla 27), que indicó una elevada significancia del modelo (p-valor<0,0001), de la misma manera que los términos individuales incluidos en el mismo: hSCF, hIL-3 y (hIL-3)². La Falta de Ajuste también resultó no significativa respecto del error puro (p-valor=0,31) y el R²aj del modelo fue de 0,98. De esta manera la ecuación final del modelo para la R1 (Ecuación 19) fue:

$$\text{Células GFP}^+ (\%) = 10,28072 - 0,13218 \times hSCF + 4,85336 \times hIL3 - 0,15648 \times hIL3^2 \quad (19)$$

Tabla 27. Análisis de la varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático seleccionado para la Respuesta Porcentaje de células GFP⁺ (optimización de factores para la transducción de HSPCs).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor	
Modelo	1632,27	3	544,09	160,12	< 0,0001	Significativo
<i>hSCF</i>	32,30	1	32,30	9,50	0,0216	
<i>hIL-3</i>	1203,03	1	1203,03	354,03	< 0,0001	
<i>(hIL-3)²</i>	489,00	1	489,00	143,91	< 0,0001	
Residual	20,39	6	3,40			
Falta de Ajuste	19,67	5	3,93	5,46	0,3134	No significativa
Error puro	0,72	1	0,72			
Suma de cuadrados total corregida	1652,66	9				

Asimismo, se comprobó el cumplimiento de los supuestos del ANOVA analizando los residuos derivados de los datos experimentales. Dichos análisis se muestran en la Figura 57.

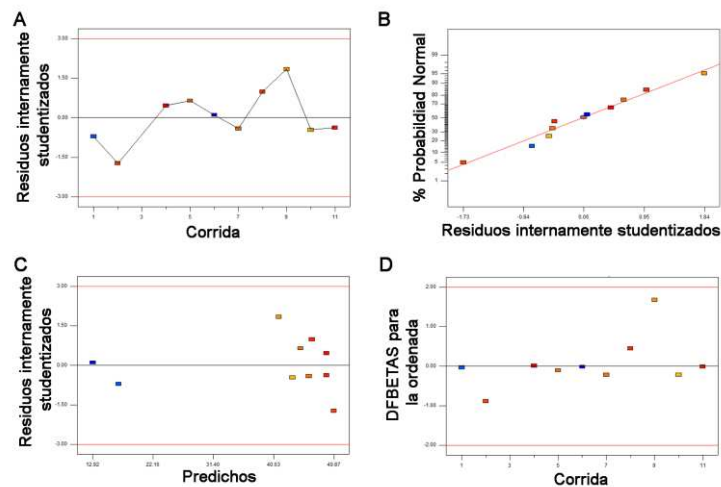


Fig. 57. Análisis de residuos. Estudio del cumplimiento de los supuestos del ANOVA y de la influencia estadística para R1: **A.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del orden de corrida (independencia); **B.** Gráfico de porcentaje de probabilidad normal en función de los residuos internamente studentizados (normalidad); **C.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del valor predicho (homocedasticidad); **D.** Gráfica de DFBETAS en función del orden de corrida (observaciones influyentes).

Finalmente en la Figura 58 se observan los gráficos 3D de superficie de respuesta. Como se evidencia, hSCF afecta linealmente la R1, mientras que se observa una relación de tipo cuadrática entre la respuesta y los niveles de hIL-3.

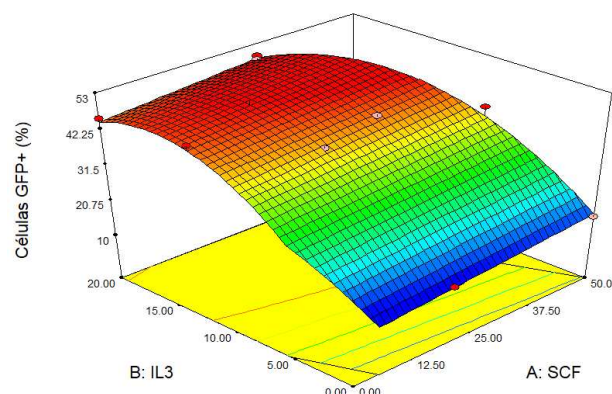


Fig. 58. Modelo de superficie de respuesta (RSM). Modelo generado a partir del análisis de los datos experimentales obtenidos para la Respuesta Porcentaje de células GFP+.

3.3.1.2. Respuesta 2: Intensidad media de fluorescencia

El modelo sugerido por *Design Expert* para R2 también fue el cuadrático. Para éste, el p-valor fue de 0,0156, la falta de ajuste presentó la menor significancia entre todos los modelos propuestos (p-valor=0,1937) y el R^2_{aj} fue de 0,91.

Luego de seleccionar los términos de manera manual, se realizó el ANOVA (Tabla 28), que indicó una elevada significancia del modelo (p -valor=0,0002), de la misma manera que los términos individuales que se incluyeron, y que son los mismos que resultan significativos en el modelo de la R1. La Falta de Ajuste fue no significativa respecto del error puro (p -valor=0,2) y el R^2_{aj} del modelo fue de 0,9, lo que indica que se obtuvo un modelo adecuado para la respuesta. De esta manera la ecuación final del modelo para la R2 (Ecuación 20) fue:

$$\text{Intensidad media de fluorescencia verde} = 32,19643 - 1,48482 \times hSCF + 32,06829 \times hIL3 - 0,97864 \times hIL3^2 \quad (20)$$

Tabla 28. Análisis de la varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático seleccionado para la Respuesta Intensidad media de fluorescencia verde (optimización de factores para la transducción de HSPCs).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor	
Modelo	82567,50	3	27522,50	31,62	0,0002	Significativo
<i>hSCF</i>	5465,97	1	5465,97	6,28	0,0406	
<i>hIL-3</i>	75854,78	1	75854,78	87,15	< 0,0001	
$(hIL-3)^2$	19126,37	1	19126,37	21,97	0,0022	
Residual	6092,76	7	870,39			
Falta de Ajuste	6023,73	6	1003,96	14,54	0,1981	No significativa
Error puro	69,03	1	69,03			
Suma de cuadrados total corregida	88660,26	10				

Asimismo, se comprobó el cumplimiento de los supuestos del ANOVA analizando los residuos derivados de los datos experimentales. Dichos análisis se muestran en la Figura 59.

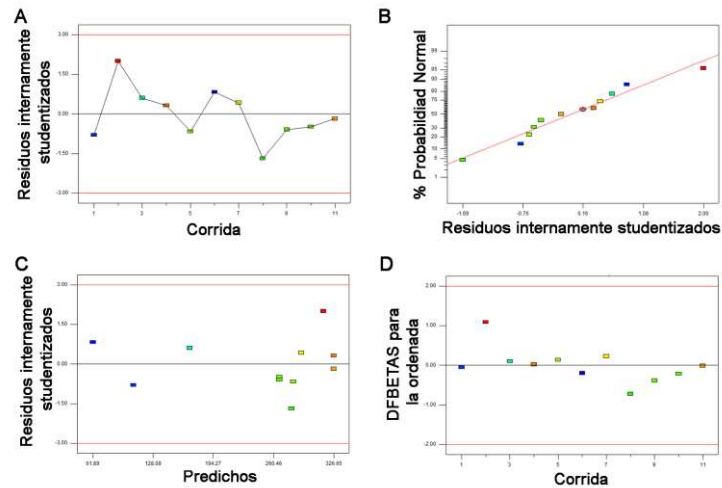


Fig. 59. Análisis de residuos. Análisis del cumplimiento de los supuestos del ANOVA y de la influencia estadística para R2: **A.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del orden de corrida (independencia); **B.** Gráfico de porcentaje de probabilidad normal en función de los residuos internamente studentizados (normalidad); **C.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del valor predicho (homocedasticidad); **D.** Gráfica de DFBETAS en función del orden de corrida (observaciones influyentes).

Finalmente en la Figura 60 se observa el gráfico 3D de superficie de respuesta. Nuevamente, se observa la dependencia lineal con la concentración de hSCF y cuadrática con la concentración de hIL-3. Sin embargo, este RSM muestra una región óptima más acotada en relación a la que se obtuvo para la R1.

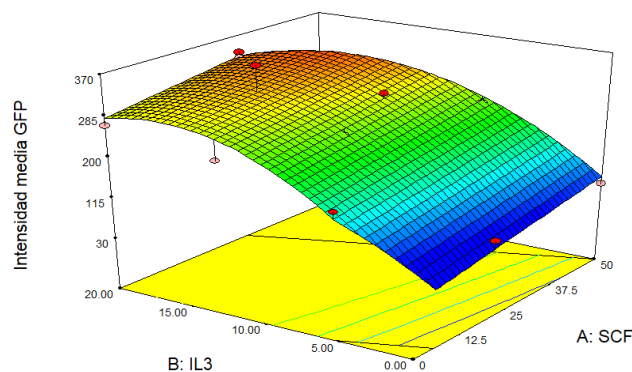


Fig. 60. Modelo de superficie de respuesta (RSM). Modelo generado a partir del análisis de los datos experimentales obtenidos para la Respuesta Intensidad media de fluorescencia verde.

Debido a que los factores que regulan el nivel de expresión de una determinada proteína derivada de un transgen son varios, e incluyen el/los punto/s particulares del genoma donde la secuencia se ha incorporado, así como los elementos de regulación transcripcional, post-transcripcional y traduccional, se espera que la reproducibilidad de esta respuesta sea muy baja. Por lo tanto, su optimización tiene menor peso que la optimización de R1 y de R3.

3.3.1.3. Respuesta 3: Número de células viables

En este caso, el modelo con mayor significancia indicado por *Design Expert* para R3 fue el de dos factores con interacción. Para éste, el p-valor fue de 0,003, la falta de ajuste presentó un p-valor de 0,8992 y el R^2_{aj} fue de 0,87.

Luego de seleccionar los términos de manera manual, se efectuó el ANOVA (Tabla 29), que indicó una elevada significancia del modelo (p-valor=0,0005), de la misma manera que los términos individuales que se incluyeron: hSCF, hIL-3 y hSCF x hIL-3. La Falta de Ajuste fue no significativa respecto del error puro (p-valor=0,9) y el R^2_{aj} del modelo fue de 0,87, lo que indica que se obtuvo un modelo adecuado para la respuesta. De esta manera la ecuación final del modelo para la R3 (Ecuación 21) resultó:

$$\text{Número de células viables} = 23.539,2 - 114,84 \times hSCF - 17,32 \times hIL3 + 70,56 \times hSCF \times hIL3 \quad (21)$$

Tabla 29. Análisis de la varianza (ANOVA) para el modelo de dos factores con interacción seleccionado para la Respuesta Número de células viables (optimización de factores para la transducción de HSPCs).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F-Valor	p-valor	
Modelo	2,4 x 10 ⁹	3	8 x 10 ⁸	22,9	0,0005	Significativo
<i>hSCF</i>	9,1 x 10 ⁸	1	9,1 x 10 ⁸	25,9	0,0014	
<i>hIL-3</i>	1,6 x 10 ⁹	1	1,6 x 10 ⁹	44,7	0,0003	
<i>hSCF x hIL-3</i>	6,9 x 10 ⁸	1	6,9 x 10 ⁸	19,8	0,0030	
Residual	2,4 x 10 ⁸	7	3,5 x 10 ⁷			
Falta de Ajuste	1,5 x 10 ⁸	6	2,5 x 10 ⁷	0,3	0,8992	No significativa
Error puro	9,4 x 10 ⁷	1	9,4 x 10 ⁷			
Suma de cuadrados total corregida	2,6 x 10 ⁹	10				

Asimismo, se comprobó el cumplimiento de los supuestos del ANOVA como se muestra en la Figura 61.

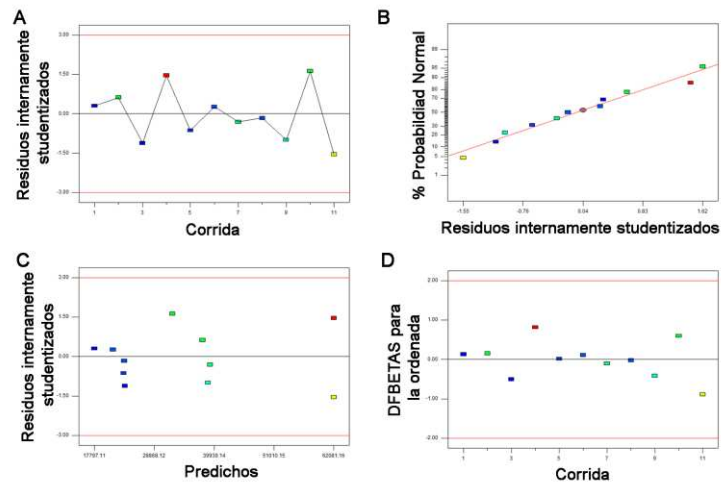


Fig. 61. Análisis de residuos. Estudio del cumplimiento de los supuestos del ANOVA y de la influencia estadística para R3: **A.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del orden de corrida (independencia); **B.** Gráfico de porcentaje de probabilidad normal en función de los residuos internamente studentizados (normalidad); **C.** Gráfico de residuos internamente studentizados en función del valor predicho (homocedasticidad); **D.** Gráfica de DFBETAS en función del orden de corrida (observaciones influyentes).

Finalmente en la Figura 62 se observa el gráfico 3D de superficie de respuesta para R3. Se observa la dependencia lineal con la concentración de ambos factores, pero también con la interacción de ambos, lo que se evidencia por la presencia de una elevación en la diagonal de la superficie, al aumentar la concentración de hIL-3 y hSCF. A partir de esta superficie se puede prever que exista un valor óptimo de la respuesta que se encuentra por fuera del rango experimental explorado.

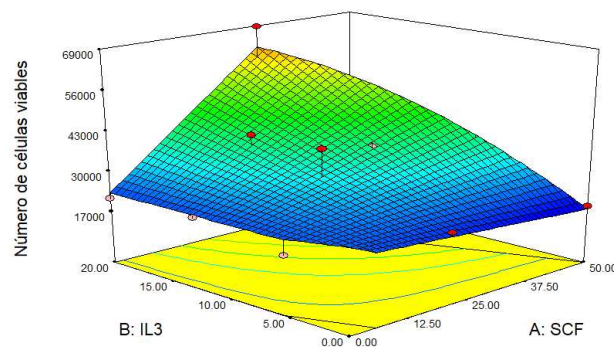


Fig. 62. Modelo de superficie de respuesta (RSM). Modelo generado a partir del análisis de los datos experimentales obtenidos para la Respuesta Número de células viables (luego del periodo de transducción).

3.3.1.4. Localización de las condiciones óptimas

En las gráficas 3D correspondientes a las R1 y R2 se evidencia que existe una zona óptima de operación y no un punto, mientras que el RSM de la R3 muestra una posición más puntual del máximo o una zona más restringida, que parece localizarse en un punto esquina de la superficie. Así, el paso siguiente implicó seleccionar el mejor conjunto de condiciones desde el punto de vista operacional que permita obtener una

solución de compromiso con los criterios que se requieren para cada variable y respuesta del sistema. Con este objetivo de optimización simultánea, se empleó la función Deseabilidad con vistas a optimizar las condiciones de transducción de las HSPCs con partículas lentivirales, luego de establecer las restricciones que se indican en la Tabla 30. El programa brindó una lista de posibles soluciones que cumplen con los criterios establecidos (y que presentaban valores de deseabilidad mayores a cero); se escogió aquél conjunto de condiciones que presentó el valor más elevado de Deseabilidad.

El paso final en esta optimización de múltiples respuestas fue obtener una predicción de los valores que pueden adquirir las diferentes respuestas cuando se aplica la combinación óptima de los factores, usando modelos de ajuste (Tabla 31).

Tabla 30. Conjunto de restricciones establecidas para realizar la optimización basada en la función deseabilidad en función de las limitantes prácticas y los resultados esperados.

Restricciones				
<i>Factor</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>	<i>Importancia</i>
<i>hSCF (ng/ml)</i>	en rango	0	50	3
<i>hIL-3 (ng/ml)</i>	en rango	0	20	3
<i>Células GFP+ (%)</i>	maximizar	13,0	55	4
<i>Intensidad media de GFP</i>	maximizar	78,5	500	3
<i>Número de células viables</i>	maximizar	18.750	100.000	3

La solución obtenida fue:

Tabla 31. Predicción puntual de las respuestas cuando se aplican los niveles optimizados de los factores. También se indica el valor de Deseabilidad para esta solución

hSCF (ng/ml)	hIL-3 (ng/ml)	Pred. Células GFP+ (%)	Pred. Intensidad media de GFP	Pred. Número de células viables	Deseabilidad
33	17	51,9	343,6	59.016	0,68

3.3.2. Elección de la multiplicidad de infección (MOI)

Luego de establecer las condiciones de suplementación del MT más adecuadas empleando una MOI constante de 5 UT/cél., se decidió evaluar la posibilidad de incrementar la misma para obtener mayores frecuencias de células transducidas. De esta manera, se evaluó una MOI superior de 10 UT/cél. y otra MOI de 4 UT/cél., muy similar a la empleada para la optimización del medio.

Para ello, en primer lugar, se purificaron HSPCs a partir de una muestra de MNCs del banco celular de trabajo. Si bien el porcentaje de pureza de las HSPCs CD34⁺ no fue superior a 80% como en experimentos previos, sino que resultó ser 50,2%, se consideró igualmente apropiado para efectuar este ensayo de *screening*. Luego de la

separación las células se cultivaron durante 4 d en medio de pre-incubación para estimular su proliferación y favorecer la incorporación del transgen.

Los resultados obtenidos para las transducciones realizadas con las dos MOI, así como con el control negativo sin LVs se muestran en la Figura 63, donde también se indica la expansión de células viables durante el periodo de transducción. Como puede observarse, la mayor expansión durante estas 72 h se produce para las células que no son expuestas a los LVs, sin embargo, es importante destacar que en los cultivos tratados con LVs no ocurre muerte celular, sino que la viabilidad fue en los dos casos mayor a 95%. Sin embargo, las células tratadas con dos MOI diferentes no presentan una gran diferencia en la expansión celular lograda y el número de células se mantiene aproximadamente constante. Del mismo modo, tampoco se observan diferencias en el porcentaje de células transducidas (GFP⁺) (37,8% con una MOI de 4 UT/cél. y 36,7% con una MOI de 10 UT/cél.) o en el nivel de expresión de la proteína, dado por la intensidad de fluorescencia. Por este motivo, se decidió continuar trabajando con la menor MOI (4 UT/cél.) para evitar la utilización de mayores volúmenes de partículas lentivirales.

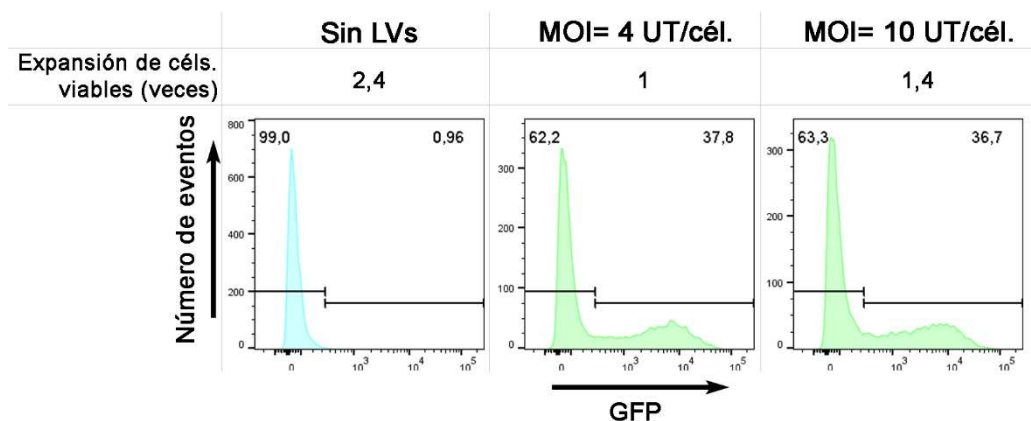


Fig. 63. Citometrías de flujo y amplificación celular. Resultados obtenidos para la selección de MOI: la gráfica muestra la expansión de células viables y la frecuencia de células GFP⁺ (histogramas de frecuencias) obtenidas en las condiciones: sin LVs, con LVs MOI 4 UT/cél y con LVs MOI 10 UT/cél. En cada histograma se indican las poblaciones positiva (derecha) y negativa (izquierda), así como los porcentajes de cada una de ellas.

3.4. Desarrollo y análisis de cultivos de células recombinantes

3.4.1. Ensayo preliminar de formación de colonias en medio semisólido empleando células recombinantes

Este experimento inicial de transducción de las HSPCs con LVs EF1 α -EPO y posterior cultivo fue llevado adelante previamente a la optimización del protocolo de transducción, razón por la cual las condiciones empleadas fueron diferentes. Asimismo, por ser una primera aproximación, se emplearon HSPCs derivadas de SP como fuente celular de partida y las pruebas se efectuaron por uniplicado.

Para realizar la transducción con los LVs EF1 α -EPO, las HSPCs separadas fueron pre-incubadas en medio MePERef 0-7 durante 7 días; a continuación, se efectuó un único evento de transducción en MT suplementado con hIL-3 20 ng/ml, con una MOI de 4 UT/cél., durante 72 h.

El paso siguiente fue investigar el efecto de la transducción con estos LVs sobre la capacidad clonogénica de las HSPCs, así como evaluar la capacidad de las células modificadas de producir hEPO y su efecto sobre la diferenciación eritroide, comparando esto con el efecto de la EPO comercial (EPOc). De esta manera, las HSPCs modificadas con la secuencia de EPO (eHSPCs) y las HSPCs no modificadas (nmHSPCs) se lavaron y se transfirieron desde el MT suplementado a medio de cultivo semisólido básico (HSC-CFU) suplementado con hIL-3 5 ng/ml y hSCF 50 ng/ml, tanto en presencia como en ausencia de EPOc (3 UI/ml). Luego de 8 d, se analizó el porcentaje de colonias eritroides (CFU-E y BFU-E), el número total de colonias y la concentración de hEPO en el sobrenadante.

El ensayo preliminar mostró que el desarrollo de colonias eritroides fue mayor para las eHSPCs, cultivadas con y sin EPOc (62% y 70% sobre el total de colonias, respectivamente), mientras que las nmHSPCs sólo desarrollaron colonias en cultivos suplementados con EPOc (16,3% de colonias eritroides sobre el total) (Tabla 32). En los cultivos sin EPOc de nmHSPCs sólo se observaron pequeños agregados celulares de 2-8 células (Figura 64).

La diferenciación eritroide incrementada observada para las eHSPCs se correlacionó con mayores concentraciones de hEPO en los sobrenadantes de cultivo (7 ng/ml para cultivos con EPOc y 5 ng/ml para cultivos sin EPOc), determinadas por ELISA sándwich amplificado (apartado 6.6.1 de *Materiales y Métodos*). Sin embargo, la cuantificación de hEPO no fue posible en los cultivos de nmHSPCs ya que su concentración se encontró por debajo del límite de detección de la metodología (Tabla 32).

Nuestra hipótesis fue que la transgénesis lentiviral de las HSPCs con el gen de hEPO permitiría que las células produzcan y secreten la hormona en el medio de cultivo. Esto reduciría el uso de este factor de crecimiento como suplemento del medio de cultivo y podría ser empleado en procesos destinados a producir células eritroides. Así, estos resultados preliminares, además de demostrar la factibilidad de transducir HSPCs con los LVs EF1 α -EPO producidos, sin que esto afecte su capacidad clonogénica, sentaron las bases para apoyar nuestra hipótesis y continuar investigando en cultivos en suspensión.

Tabla 32. Ensayo de formación de colonias de células no modificadas y modificadas con la secuencia de hEPO. Evaluación de la capacidad clonogénica, la diferenciación eritroide y la concentración de hEPO en los sobrenadantes de cultivo luego de la transducción lentiviral. Los resultados se presentan para los cultivos de eHSPCs y nmHSPCs en presencia y ausencia de EPOc (3 UI/ml)

	nmHSPCs		eHSPCs	
	Sin EPOc	Con EPOc	Sin EPOc	Con EPOc
<i>Número total de colonias</i>	n.d.	257	501	406
<i>Colonias eritroides (%)</i>	n.d.	16	70	62
<i>Concentración de EPO en sobrenadantes de cultivo (ng/ml)</i>	n.d.	n.d.	5	7

n.d. indica no detectable

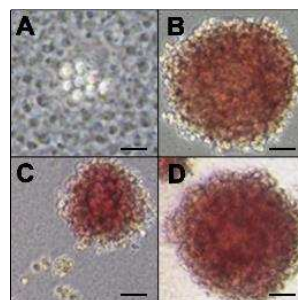


Fig. 64. Microscopías ópticas. Imágenes representativas de colonias crecidas en diferentes condiciones de cultivo. **A.** Células no modificadas en medio sin EPOc; la imagen no muestra una colonia típica, sino un pequeño agregado celular. Los paneles **B** a **D** muestran colonias CFU-E obtenidas en cultivos de **B.** Células modificadas con LVs EF1 α -EPO sin EPOc; **C.** Células no modificadas cultivadas en medio con EPOc y **D.** Células modificadas con LVs EF1 α -EPO en medio con EPOc. Las escalas indican 20 μ m (magnificación 100x).

3.4.2. Cultivos en suspensión de células recombinantes

3.4.2.1. Purificación de HSPCs y desarrollo de los cultivos

Inicialmente se separaron las HSPCs a partir de suspensiones de MNCs derivadas de tres muestras de SCU, mediante el descongelado de crioviales del banco celular de trabajo. Se obtuvieron, primero, tres suspensiones de MNCs: M1, con $1,1 \times 10^8$ céls. viables y 95% de viabilidad; M2, con $1,9 \times 10^8$ céls. viables y 98% de viabilidad; y M3, con $1,6 \times 10^8$ céls. viables y 99% de viabilidad. De este modo, se recuperaron $4,5 \times 10^8$ MNCs viables totales.

En este protocolo no se efectuó tratamiento con Benzona. En este caso, debido a que el número de MNCs totales a sembrar en las columnas MS sería superior a 2×10^8 MNCs, cada una de las muestras por separado se incubó con 100 μ l de cada reactivo de marcación y se separó en una columna (es decir, se emplearon tres columnas para realizar la purificación de HSPCs).

Al finalizar, se analizó la recuperación celular por recuento en cámara de Neubauer de cada una de las fracciones R. Se obtuvieron, para la fracción R1,

$6,2 \times 10^5$ céls. viables totales (esto es, 5.760 céls. viables/ 10^6 MNCs); para la fracción R2, $7,9 \times 10^5$ céls. viables totales (esto es, 4.230 céls. viables/ 10^6 MNCs); y, para la fracción R3, $9,7 \times 10^5$ céls. viables totales (es decir, 6.220 céls. viables/ 10^6 MNCs).

La pureza se determinó a partir del *pool* de células retenidas de las tres purificaciones, resultando 95% (Figura 65). Puesto que fue mayor a 80%, no fue necesario efectuar un paso posterior de purificación y las mismas se emplearon como fuente celular para iniciar los cultivos de células recombinantes.

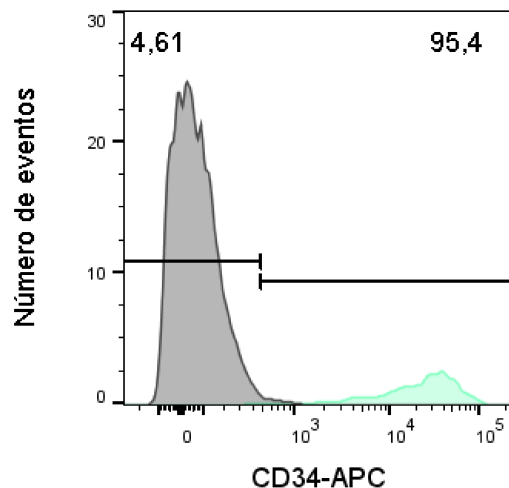


Fig. 65. Citometría de flujo. Histogramas (Número de eventos vs. Intensidad de fluorescencia de eventos marcados con anti hCD34-APC) obtenidos a partir del análisis de la fracción R. El histograma verde representa el anticuerpo monoclonal (mAb) relevante y el gris representa el control. Las estadísticas mostradas corresponden a la muestra de interés marcada con el mAb relevante. La pureza resultó ser de 95%, por lo cual fue empleada como fuente celular para iniciar los cultivos de células recombinantes.

Una descripción detallada del procedimiento realizado para los cultivos en suspensión se encuentra en la sección 6.5.2 de *Materiales y Métodos*. Brevemente, luego de preparar el *pool* de progenitores y evaluar su pureza, éste fue pre-estimulado (días -8 a -3, ya que se consideró como día 0 el día en que se iniciaron los cultivos con las células transducidas) para la posterior transducción lentiviral (que se describe en el apartado 3.4.2.2 de esta sección) (Figura 66).

A continuación, los cultivos de nmHSPCs y de eHSPCs ($n=3$ en cada caso, donde cada réplica biológica derivó de un evento de transducción independiente) se llevaron a cabo en dos pasos, empleando diferente suplementación en cada uno de ellos (Figura 66):

- Para las nmHSPCs, en el primer paso (E. 1), que comprende la primera semana de cultivo, 75.000 céls./ml fueron cultivadas en MePERef 0-7 que incluyó EPOc 3 UI/ml (22,6 ng/ml). En el segundo paso (E. 2), que comprendió los días 7 a 18, las células fueron cultivadas en MePERef 11-34 con EPOc (EPOc (+)). En este medio

las células se resuspendieron a una densidad de 450.000 céls./ml en el día 7 y a una densidad de 750.000 céls./ml en el día 11.

- Para las eHSPCs el protocolo de cultivo fue idéntico, excepto que para estas células, el medio de cultivo no se suplementó en ninguna de las etapas con EPOc (EPOc (-))
- Las nmHSPCs también fueron cultivadas en EPOc (-) como control adicional de cultivo.

Para llevar a cabo el seguimiento de los cultivos, se tomaron muestras de los mismos en los días 0, 7, 11, 15 y 18, para efectuar análisis morfológicos (Tinción de May-Grünwald-Giemsa), determinación de la expansión celular (por recuento en cámara de Neubauer) y, finalmente, caracterización inmunofenotípica (citometría de flujo).

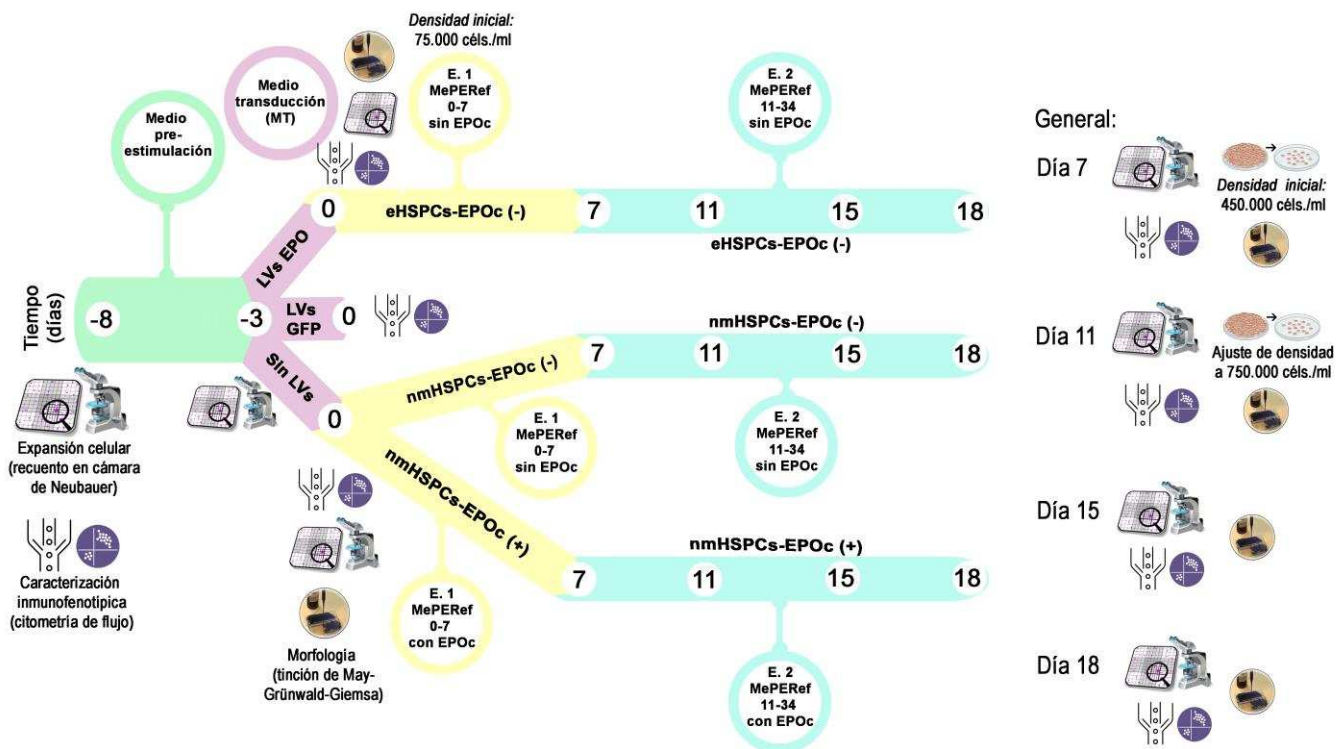


Fig. 66. Representación esquemática de la estrategia de trabajo. Esquema gráfico del proceso de pre-incubación, transducción y cultivo en dos etapas de HSPCs recombinantes y no modificadas, en el cual se indican los análisis realizados en cada paso.

3.4.2.2. Transducción lentiviral

Luego de 5 d de pre-estimulación, se transdujeron las HSPCs con LVs EF1 α -EPO (eHSPCs). También se realizaron controles de células no modificadas (nmHSPCs), en las cuales no se adicionó vector lentiviral, y de células transducidas con LVs EF1 α -GFP (gfpHSPCs). Las transducciones se llevaron a cabo en *StemMACS HSC-CFU* básico 25% (V/V) en IMDM 25% (V/V)-LVs 50% (V/V) (MT) suplementado

con hIL-3 17 ng/ml y hSCF 33 ng/ml a una MOI de 4 UT/cél. (se ejecutaron tres experimentos de transducción independientes en cada caso).

Luego de una exposición de tres días a los vectores lentivirales, las nmHSPCs y las eHSPCs se lavaron dos veces con medio basal y se resuspendieron en el medio de cultivo correspondiente (MePERef 0-7 con EPOc y MePERef 0-7 sin EPOc, respectivamente). Las gfpHSPCs se lavaron dos veces con IMDM y se resuspendieron en PBS para ser analizadas por citometría de flujo y así evaluar la factibilidad de transducción en las condiciones empleadas. La citometría de flujo reveló que el $29,2 \pm 0,2$ % de las células expresó la GFP (Figura 67).

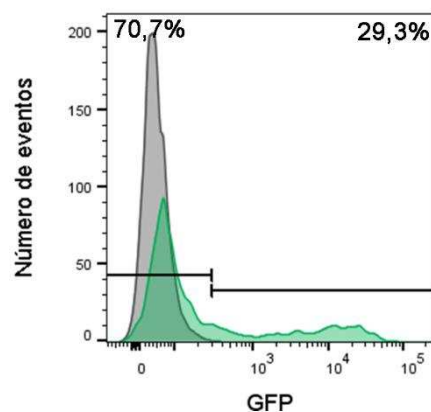


Fig. 67. Citometría de flujo. Análisis del control de gfpHSPCs en el cual la GFP fue empleada como sustituto para estimar la factibilidad de transferencia del material genético. El histograma muestra el porcentaje de células GFP⁺ para un experimento de transducción representativo. En gris se presenta el control de células no transducidas y en verde, la fluorescencia correspondiente a las gfpHSPCs. Las estadísticas mostradas corresponden a esta última muestra.

3.4.2.3. Evaluación de la expansión celular

Las eHSPCs se cultivaron en MePERef sin EPOc [eHSPCs-EPOc (-)], mientras que los cultivos de nmHSPCs se suplementaron con EPOc [nmHSPCs-EPOc (+)]. En el caso de las eHSPCs, la expansión celular alcanzó un máximo de amplificación media de 953 veces (rango: 616-1510 veces) en el día 15 (post-transducción). Adicionalmente, las nmHSPCs mostraron una expansión celular máxima de 369 veces (rango: 201-570 veces) en el día 11, la cual disminuyó hacia el día 18 (Figura 68).

En cuanto a los cultivos control de nmHSPCs-EPOc (-), sólo ocurrió expansión durante la primera semana (Figura 68); luego de ello, el número total de células disminuyó y no se observó diferenciación eritroide en el análisis morfológico (Figura 69.A).

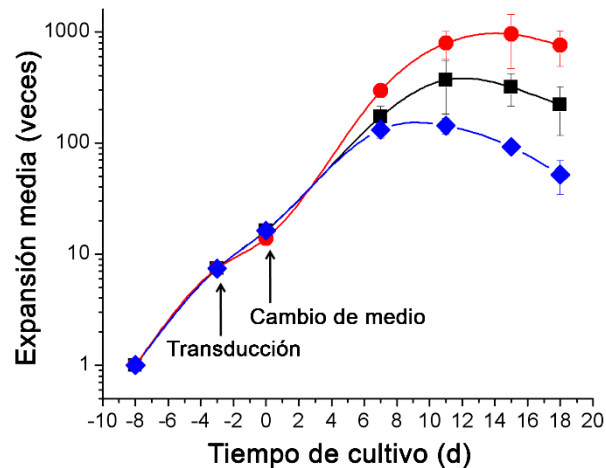


Fig. 68. Amplificación celular media. Expansión celular de nmHSPCs-EPOc (+) (cuadrados negros, ■) y de nmHSPCs-EPOc (-) (rombos azules, ◆); así como de eHSPCs-EPOc (-) (círculos rojos, ●). Los resultados se expresan como cambio (veces) del número celular. Los valores correspondientes a cada punto del gráfico son las medias \pm D.E. en escala logarítmica (n=3).

3.4.2.4. Análisis inmunofenotípico y morfológico

En cuanto a los cultivos control de nmHSPCs-EPOc (-), no se observó diferenciación eritroide en el análisis morfológico (Figura 69.A): durante la primera semana de cultivo las células presentaron morfología de células progenitoras/precursoras y no se observaron eritroblastos. Luego de ese tiempo, la mayoría de las células redujeron progresivamente su tamaño y no mostraron cambios en la afinidad a colorantes desde basofilia a acidofilia, lo cual es característico de la diferenciación eritroide.

En el día 0 de cultivo (post-transducción) tanto las nmHSPCs como las eHSPCs presentaron morfología de células mononucleares agranulares (90% y 98%, respectivamente), con una pequeña proporción de otras células no-progenitoras (10% y 2%, respectivamente). Tan pronto como el día 7, el recuento diferencial de células mostró diferenciación eritroide en ambas líneas celulares [eHSPCs-EPOc (-) y nmHSPCs-EPOc (+)] (Figuras 69.A y 69.B). En este momento los estadios predominantes fueron los proeritroblastos/eritroblastos basofílicos, con núcleos grandes y citoplasma basofílico [64 ± 3 % para las nmHSPCs-EPOc (+) y 78 ± 9 % para las eHSPCs-EPOc (-)], mientras que, a partir del día 11 los cultivos fueron principalmente eritroides.

La frecuencia de las HSPCs detectadas en el análisis morfológico disminuyó a partir del día 0 hacia el día 7, en el cual el 32 ± 6 % de las nmHSPCs-EPOc (+) y el 8 ± 6 % de las eHSPCs-EPOc (-) eran HSPCs; este estadio estuvo ausente hacia el día 11 (6 ± 6 % y 0%, respectivamente). En los días 15 y 18 los cultivos evidenciaron estar predominantemente compuestos por eritroblastos ortocromáticos, más pequeños

y de núcleo condensado excéntrico. Esta población fue el 82 ± 3 % en el caso de las nmHSPCs-EPOc (+) y el 80 ± 10 % en el de las eHSPCs-EPOc (-) en el día 18.

El análisis morfológico fue confirmado por la caracterización inmunofenotípica realizada por citometría de flujo (Figura 70). En ambas líneas, se redujo rápidamente la expresión del marcador de progenitores hematopoyéticos CD34; en el día 7 se alcanzaron sus niveles mínimos (Figuras 70.A y 70.C), aunque aún era posible observar células con morfología típica de HSPCs mediante la tinción de May-Grünwald-Giemsa. Adicionalmente, el porcentaje de células CD45⁺ (marcador leucocitario, expresado débilmente en eritroblastos tempranos) (Figuras 70.B y 70.C) para las eHSPCs-EPOc (-) disminuyó desde un valor inicial de 78 ± 1 % hasta 23 ± 3 % en el día 7, y hasta $4,4 \pm 0,4$ % en el día 11 (n=3). Para las nmHSPCs-EPOc (+), la disminución en la expresión de este marcador fue más lenta: el porcentaje inicial de 88 ± 1 % bajó hasta 54 ± 8 % en el día 7 y cayó hasta 8 ± 2 % en el día 15. La pérdida progresiva del antígeno CD45 concordó con la maduración desde células progenitoras hacia el estadio predominante de eritroblastos tempranos durante la primera semana de cultivo; la pérdida fue casi completa el día 11, en el cual los eritroblastos policromáticos y ortocromáticos fueron los estadios de maduración prevalentes.

En relación con el marcador CD71 y CD235a, el análisis citométrico mostró que la cantidad de células CD71⁺CD235a⁻ (precursores unidades formadoras de colonias eritroides [170]) (Figura 70.D) disminuyó rápidamente en el caso de las eHSPCs-EPOc (-), mientras que la reducción en su porcentaje fue menos abrupta en el caso de las nmHSPCs-EPOc (+). Se observó que la población CD71⁺ adquirió progresivamente el marcador CD235a (Figuras 70.E y 70.G), concomitantemente con la maduración progresiva de los precursores. Por lo tanto, la cantidad de células doble positivas (eritroblastos intermedios) se incrementó durante el periodo de cultivo en ambas líneas celulares, pero el aumento procedió más rápidamente para las eHSPCs-EPOc (-) hasta el día 7. Luego de esto, la frecuencia de los eritroblastos se mostró comparable en ambas líneas. Las poblaciones CD71⁻CD235a⁺ (Figura 70.F), fenotipo característico de células eritroides maduras, alcanzó una proporción máxima en el día 11 [media: 21 ± 1 %, para las eHSPCs-EPOc (-) y $7,8 \pm 0,4$ %, en el caso de las nmHSPCs-EPOc (+)]. Estos porcentajes disminuyeron levemente en el último periodo de cultivo.

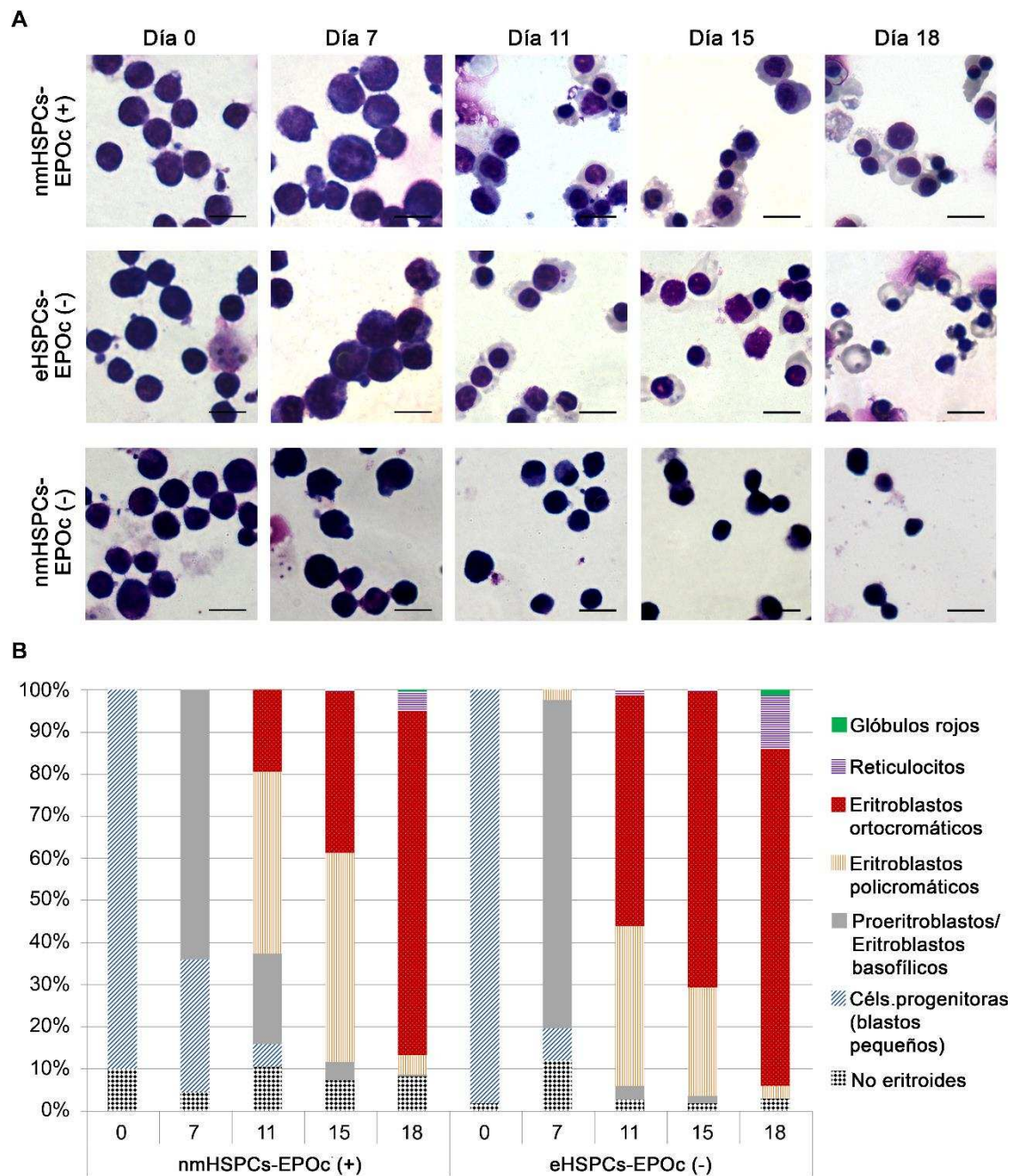


Fig. 69. Análisis morfológicos. A. Microscopías ópticas. Análisis mediante tinción de May-Grünwald-Giemsa de tres cultivos representativos (nmHSPCs-EPOc (+), eHSPCs-EPOc (-) y nmHSPCs-EPOc (-) en los días 0, 7, 11, 15 y 18. Las barras de escala indican 20 μ m (magnificación 1000x). **B.** Histogramas de frecuencias de los diferentes estadios de maduración de las células halladas en cultivos de nmHSPCs-EPOc (+) y eHSPCs-EPOc (-) en los días 0, 7, 11, 15 y 18 (valores medios, n=3).

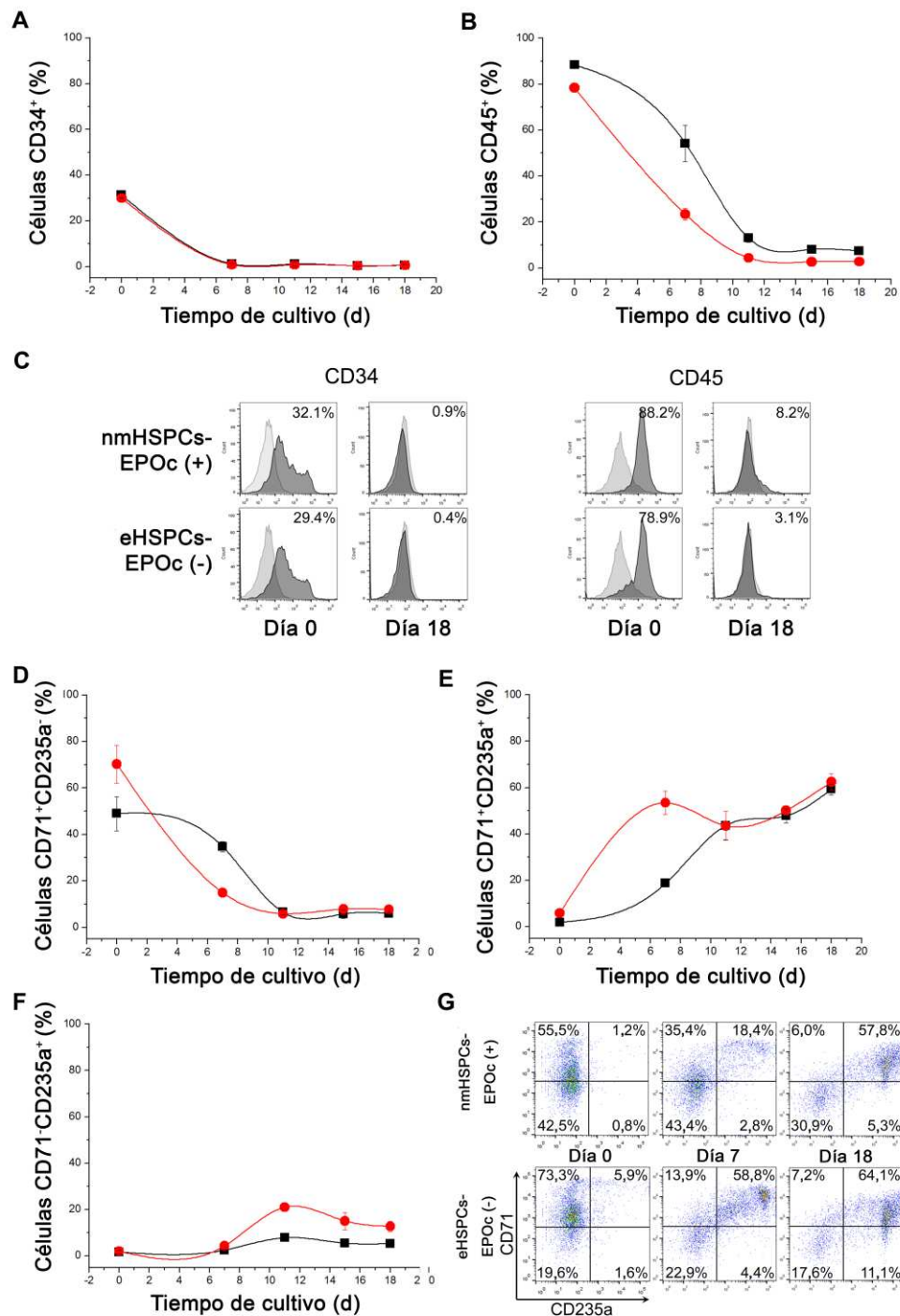


Fig. 70. Caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo. Los paneles muestran los porcentajes de poblaciones celulares obtenidos de cultivos de nmHSPCs-EPOc (+) (cuadrados negros, ■) y de eHSPCs-EPOc (-) (círculos rojos, ●) a lo largo de los cultivos. Los resultados se expresan como porcentaje medio \pm D.E. (n=3). **A.** Células CD34⁺; **B.** Células CD45⁺; **D.** Células CD71⁺CD235a⁻; **E.** Células CD71⁻CD235a⁺ y **F.** Células CD71⁻CD235a⁺. **C.** Histogramas. Expresión de CD34 y CD45 al inicio y final de los cultivos de ambas líneas celulares (se muestra un experimento representativo). Las estadísticas son dadas en cada histograma. Los histogramas oscuros representan anticuerpos relevantes, y los histogramas claros representan los controles. **G.** Gráficos de puntos. Progresión (días 0, 7 y 18) de la co-expresión de CD71 y CD235a en un experimento representativo para ambas líneas celulares. Las estadísticas de los cuadrantes se presentan en cada gráfico.

3.4.2.5. Estudio de la producción de hEPO: cuantificación y determinación del perfil de isoformas

Inicialmente se cuantificó la hEPO producida por las células modificadas en cultivo en suspensión a lo largo del tiempo mediante ELISA sándwich. Las concentraciones de la hormona en los sobrenadantes de cultivo fue detectada en niveles de ng/ml, con un máximo de 36 ± 7 ng/ml (rango: 30-43 ng/ml) en el día 7. Este nivel medio fue mayor que el agregado inicial de EPOc en cultivos de nmHSPCs-EPOc (+) (22,6 ng/ml). Luego de este punto, los niveles decrecieron (día 11, 6 ± 2 ng/ml; día 15, $0,7 \pm 0,2$ ng/ml; día 18, 3 ± 1 ng/ml) en los cultivos de eHSPCs-EPOc (-) (Figura 71.A).

Las isoformas predominantes para la hEPO expresada por las eHSPCs-EPOc (-) fueron determinadas por isoelectroenfocado seguido por *Western blot*. La especificidad del anticuerpo en la detección por *Western blot* fue demostrada en experimentos preliminares, que revelaron que no hay otros componentes en el sobrenadante de cultivo de HSPCs que puedan ser detectados además de la hEPO. Como control se empleó la EPOc usada para suplementar los cultivos de células no modificadas (Zelltek, S.A.). Esta proteína comercial es producida en células CHO y enriquecida en las isoformas más acídicas mediante varios pasos de separación cromatográfica. Por lo tanto, contiene predominantemente isoformas ácidas con puntos isoeléctricos entre aproximadamente 3 y 4,5, que se localizan en la zona de rango de pH más ácido de la membrana [160]. Como puede observarse en la Figura 71.B, tanto la EPOc como la hEPO secretada se localizaron en la parte más acídica de la membrana (considerando que el rango de pH obtenido con los anfolitos usados es de aproximadamente 3,5 a 5,5), lo que refleja sus isoformas predominantemente acídicas.

Las bajas concentraciones de hEPO producidas por las células modificadas pudieron haber impedido la detección de isoformas menos abundantes. Sin embargo, en la Figura 71.B, las cuatro isoformas observadas en el carril 2 son ligeramente menos acídicas que aquéllas observadas en el carril 1 (control), lo que podría asociarse con pequeñas diferencias en el contenido de ácido siálico. Esto podría atribuirse a los diferentes huéspedes en los cuales las dos proteínas recombinantes fueron producidas (hámster vs. humano). Se ha descrito que los patrones de glicosilación y particularmente la cantidad de ácido siálico son huésped- y tejido-dependientes. Las variaciones en la maquinaria enzimática de glicosilación podrían ser una potencial explicación para las diferencias encontradas [171]. Ambos análisis de EPO (ELISA e isoelectroenfocado seguido por *Western blot* confirman que las células transducidas fueron capaces de producir hEPO con isoformas principalmente acídicas.

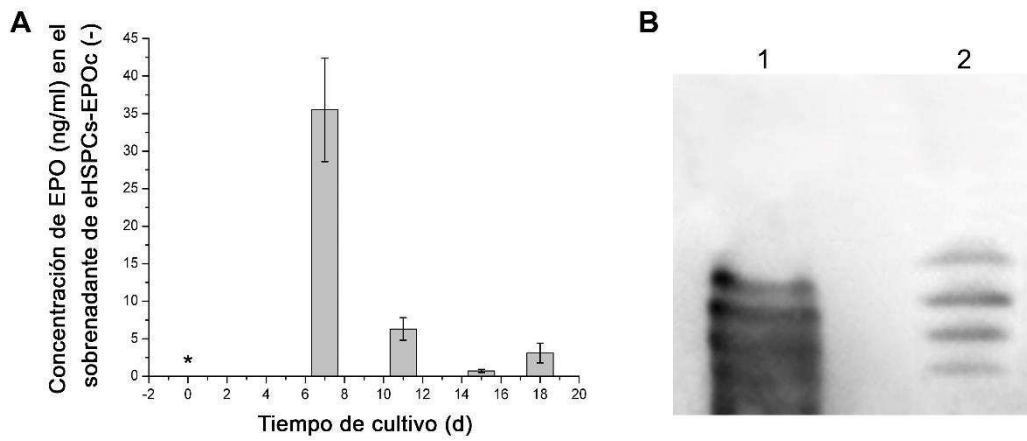
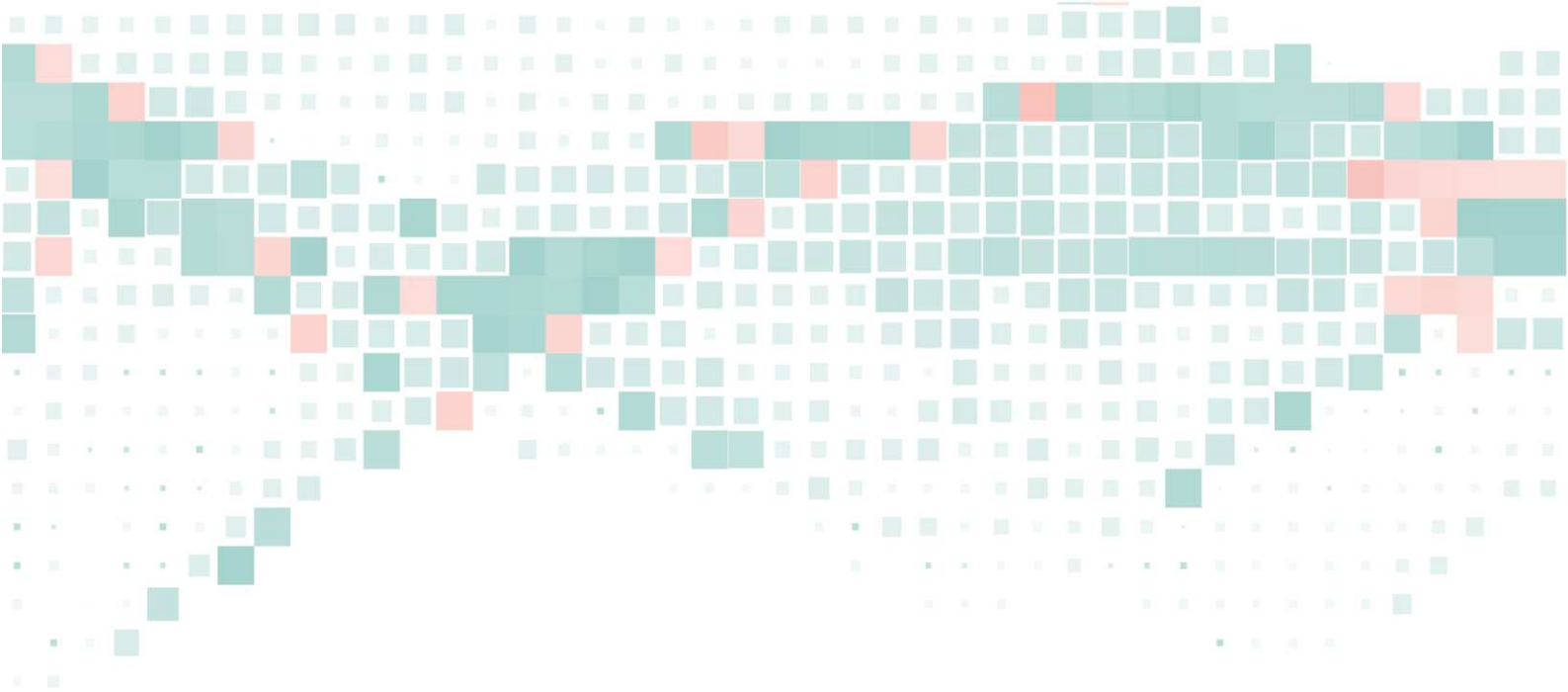
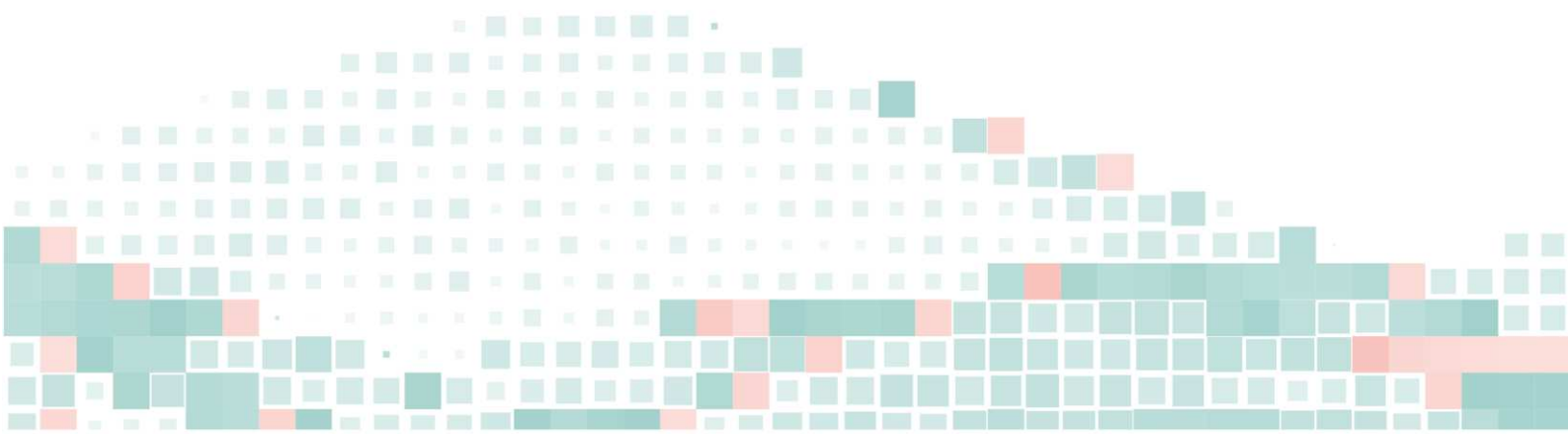


Fig. 71. Análisis de la producción de hEPO. A. ELISA sándwich. Cuantificación de hEPO en sobrenadantes de cultivo de eHSPCs-EPOc (-) en los días 0, 7, 11, 15 y 18. Las barras indican la concentración media de la hormona (ng/ml) \pm D.E. (n=3). El asterisco indica que la concentración es no detectable. **B.** Isoelectroenfocado seguido por *Western blot*. Análisis de isoformas de EPO: en el carril 1 se evaluó la EPOc, en el carril 2, el sobrenadante de cultivo de las células modificadas (concentrado y desalado).



Discusión y Conclusiones



Las células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPCs) constituyen una población heterogénea de células multipotentes capaces de diferenciarse en los tipos celulares mieloides o linfoides del sistema circulatorio, que se caracterizan por presentar un fenotipo CD34⁺. Éstas pueden derivarse de diferentes fuentes: médula ósea, sangre periférica y sangre de cordón umbilical [32] y se emplean como terapia celular para tratar diversos desórdenes congénitos y adquiridos del sistema hematopoyético [36,37]. Adicionalmente, se está trabajando en desarrollar estrategias adecuadas para su empleo como vehículo celular en terapia génica [38] y en terapia celular, previa generación *ex vivo* de los componentes sanguíneos [21,39].

Particularmente, respecto de la última aplicación mencionada, la producción *in vitro* de células eritroides presenta aplicación, a largo plazo, en prácticas de transfusión. Si bien la prueba de concepto de este principio se ha efectuado en 2011 [50], mediante la administración en un humano de 10¹⁰ GRs cultivados, y se ha realizado un progreso sustancial en los procesos biotecnológicos destinados a la producción de GRs [34,51,52], la rentabilidad continúa siendo un desafío que hace que esta tecnología sea actualmente inaplicable en la práctica clínica. Es necesario considerar que el medio de cultivo empleado en los protocolos disponibles presenta un costo muy elevado, debido a que los factores de crecimiento que se incluyen como suplementos representan más del 90% de su costo (solamente la eritropoyetina representa el 33% del costo del medio) [21,47].

Así, con una visión más realista acerca de su empleo en el mediano-corto plazo, se exploran otras tres aplicaciones: a) la generación de GRs reactivos con fenotipos comunes y raros, para su empleo en *kits* diagnósticos destinados a la detección de anticuerpos para identificar pares de transfusión adecuados e individuos aloimmunizados; b) la obtención de células eritroides primarias para el descubrimiento y evaluación de drogas, por ejemplo, para estudiar tratamientos anti-malaria, anti-virales, inductores de producción de hemoglobina, estimuladores de la eritropoyesis; y c) el uso de células eritroides derivadas de HSPCs genéticamente modificadas como vehículos para la entrega dirigida de drogas, por ejemplo de aquellas proteínas recombinantes de corta vida media o de agentes anti-tumorales [55].

La posibilidad de desarrollar estas aplicaciones nos han impulsado a diseñar estrategias para producir cantidades adecuadas de células eritroides a partir de HSPCs derivadas de SCU, reduciendo el uso de factores de crecimiento costosos en el proceso de cultivo y contribuyendo así a una mejor comprensión de estos procesos de producción.

En primer lugar se hipotetizó que el desarrollo de procedimientos de diseño experimental permitiría generar, de manera racional, sistemática y en función de la

información disponible, una formulación óptima y eficiente (es decir, que minimice el consumo de recursos) del medio de cultivo, mediante la ejecución de experimentos planificados para extraer información fundamental. Adicionalmente, se propuso que someter a las HSPCs a un proceso de transgénesis lentiviral con el gen de hEPO permitiría que las células produzcan y secreten la hormona en el medio de cultivo y que esto reduciría el uso de este factor de crecimiento como suplemento. De este modo se llevaron adelante dos líneas principales de trabajo, que se discutirán más adelante. Sin embargo, un paso previo necesario fue asegurar la disponibilidad de la fuente celular de partida.

Para el desarrollo de ambas estrategias, se requirió la generación de un banco celular de trabajo que permita acceder a MNCs viables y listas para ser empleadas como fuente de HSPCs en los diferentes ensayos de cultivo *in vitro*. De este modo, este banco fue generado a partir de la separación de MNCs mediante centrifugación en gradiente de densidad de 50 muestras anticoaguladas de SCU. A pesar de la dificultad que presentó el 20% de las muestras en la eliminación de precursores nucleados o agregados eritrocitarios, la separación celular mostró parámetros de recuperación y viabilidad celular apropiados: el valor de mediana obtenido para la recuperación de MNCs de $2,2 \times 10^6$ MNCs viables/ml de SCU y para la viabilidad celular de 99%, fueron muy similares a los valores indicados por Kekarainen y col. [172] ($2,68 \times 10^6$ MNCs/ml de SCU y 95%, respectivamente). Estos valores aseguraron la constitución del banco celular de trabajo de MNCs, mantenido a -196°C .

Asimismo, se debió establecer la metodología óptima para obtener HSPCs a partir de las MNCs. Luego de estudiar tres estrategias principales diferentes (FACS, separación inmunomagnética basada en la detección de antígeno CD34 -SI- seguida por FACS y SI) y, a su vez, cinco protocolos distintos de SI, se decidió continuar purificando las HSPCs mediante SI protocolo E. Este protocolo, basado en la realización de dos pasos consecutivos de SI y un pre-tratamiento de las MNCs con Benzona a 37°C (lo que redujo la agregación celular post-descongelado), fue el único que permitió la generación de fracciones de HSPCs CD34⁺ con elevada pureza (siempre superior a 80%, según determinaciones realizadas por citometría de flujo), viabilidad celular apropiada y recuperaciones celulares aceptables y adecuadas para continuar con los ensayos posteriores de cultivo celular (Figura 20). Estos resultados fueron concordantes con el incremento de pureza reportado luego de un segundo paso de marcación, por Jaatinen y Laine [33], sólo que en el protocolo empleado en esta tesis, el segundo paso de purificación requirió las mismas condiciones de marcación que el primero mientras que los autores emplearon menores volúmenes de reactivos en el segundo paso. La

purificación fue posible en tiempos de separación bajos, que no afectaron por ejemplo, la viabilidad celular.

La gran variabilidad en los parámetros de las fracciones retenidas correspondientes a los diferentes protocolos de SI refleja la importancia de aspectos como el estado de la suspensión de partida, el tiempo de separación y los pasos de pre-tratamiento y purificación aplicados.

Es posible afirmar que el sistema de separación FACS no constituyó una herramienta adecuada ya que la baja frecuencia de las HSPCs en las muestras de partida dificulta que el equipo seleccione apropiadamente las poblaciones de interés, en tiempo y condiciones que no afecten el estado celular y la calidad de los cultivos primarios. Incluso, la incorporación de un paso previo de SI no logró revertir esta tendencia.

Una vez que fue establecido el sistema de purificación, se consideró adecuado conocer el comportamiento de las HSPCs, es decir, la factibilidad de expansión y diferenciación, en el medio de producción eritroide adaptado en nuestro laboratorio a partir del medio de referencia publicado por Giarratana y col. [50]. A lo largo del cultivo realizado en este medio adaptado, al que se denominó MePERef, fue posible evidenciar una expansión celular de hasta 57 veces (máximo alcanzado a los 11 días; Figura 23). Esta expansión máxima resultó considerablemente menor que la reportada en la misma publicación en la que se empleó el medio de cultivo de referencia para la expansión y diferenciación de HSPCs derivadas de SP movilizada (aproximadamente 62.000 veces en el día 15). Sin embargo, no es posible realizar una comparación directa entre los resultados debido a diferencias en el procedimiento, fuente celular y preparación del medio de cultivo. En ambos casos, sin embargo, se observó que la expansión celular ingresa en una fase de constancia/decaimiento a partir del día 18.

En lo relativo a la diferenciación celular en estas condiciones adaptadas, fue posible evidenciar un compromiso de las poblaciones presentes en los cultivos hacia el linaje de interés: en primer lugar, la prevalencia de precursores primitivos de tipo BFU-E en el inicio de los cultivos reflejó un elevado potencial eritroide, que se manifestó en la progresión de los cultivos mediante el desarrollo de un mayor número de CFU-E en los ensayos de formación de colonias durante la primera semana de cultivo, y la disminución de la expresión del marcador de células madre CD34 y del marcador leucocitario CD45, evaluados por citometría de flujo. La diferenciación eritroide gradual también se puso en evidencia a través del incremento en la proporción de células que expresan el marcador CD71, desde el día 0 al día 7 de cultivo, y su posterior decaimiento y adquisición paulatina del marcador CD235a, que alcanzó su expresión máxima en el día 25

(Figuras 24 a 27). Estos cambios acontecidos a partir del día 7 se habrían correlacionado con la modificación en la composición del medio de cultivo.

Si bien se comprobó la proliferación y producción eritroide, el porcentaje final de células maduras resultó bajo (en las tinciones de May-Grünwald-Giemsa efectuadas en los cultivos en el día 28 se observó también una baja frecuencia de reticulocitos y glóbulos rojos y algunos eritroblastos ortocromáticos; adicionalmente no fue posible cuantificar la hemoglobina presente en la suspensión celular en el día 34). Cabe destacar que también se encontró un desarrollo leucocitario importante a lo largo de los cultivos: ocurrió un incremento en el porcentaje de CFU-M a lo largo de los mismos, el marcador CD45 sólo se redujo hasta un porcentaje mínimo de 42% y las tinciones efectuadas en el día 28 evidenciaron gran heterogeneidad y una elevada proporción de leucocitos basofílicos (Figura 28).

De esta manera, la obtención en estas condiciones de una expansión y diferenciación eritroide ineficientes, han impulsado el estudio de nuevas estrategias que permitan mejorar los resultados obtenidos con el sistema de producción eritroide de referencia. Así, como fue indicado, una de las líneas de trabajo implementadas consistió en el desarrollo de condiciones de cultivo para la producción de células eritroides a partir de HSPCs. Para esto, se empleó una estrategia de diseño experimental secuencial basada en la selección y optimización de concentraciones de suplementos de cultivos con efectos significativos sobre la expansión de HSPCs; las cuales, luego de su expansión, fueron cultivadas en condiciones ya descritas adecuadas para la expansión y maduración de precursores eritroides. Además, la relevancia de optimizar la composición del medio de cultivo reside en que los factores de crecimiento contribuyen en un 57,5% al costo total, mientras que la transferrina y el plasma lo hacen en un 36% [21]. Por lo tanto, si se pudiera reducir el consumo de factores o hallar nuevas combinaciones que permitan mejorar los rendimientos del producto celular deseado, se podría avanzar hacia una producción más rentable.

Con estos objetivos presentes, se inició el proceso de desarrollo de las condiciones de cultivo para la producción de células eritroides con el empleo de un diseño experimental factorial de tipo *Plackett-Burman* que permitió estudiar la significancia estadística del efecto de 11 factores sobre la expansión de las HSPCs (se analizaron como respuestas el porcentaje de células CD34⁺ y la tasa de expansión de las mismas) en un periodo de cultivo de 7 días luego de su purificación. De esta manera, las corridas experimentales llevadas a cabo se limitaron a 15, evaluándose un elevado número de factores, lo que redundó en un análisis económico y eficiente. El empleo de este diseño particular no permitió la estimación de la existencia de interacciones entre los factores estudiados que pudieran ser relevantes en las respuestas, por lo que

complementariamente se utilizó un análisis por Algoritmo Genético con este fin. Las dos respuestas se analizaron inicialmente por separado. Luego de comprobar el cumplimiento de los supuestos del ANOVA empleado para el análisis, y verificar que el modelo obtenido presentaba una falta de ajuste no significativa y un R^2_{aj} de 0,84, que indicó una capacidad de predicción adecuada del comportamiento del proceso, se obtuvo que la respuesta 1 (porcentaje de células CD34⁺) fue afectada significativamente por los niveles de GM-CSF, PFC (con un efecto negativo) e hidrocortisona. Adicionalmente, la evaluación del efecto de las interacciones entre dos factores por Algoritmo Genético arrojó que ninguna de ellas resultó estadísticamente significativa. Por otro lado, la tasa de expansión de células CD34⁺ fue también modelada con una falta de ajuste no significativa. Sin embargo, el reducido valor de R^2_{aj} obtenido en este caso fue indicativo de problemas en la medición de esta respuesta, probablemente debido al elevado error asociado al recuento en cámara de Neubauer de suspensiones con baja densidad celular. A pesar de esto, el modelo se tuvo en cuenta y se incorporó la concentración de BSA como factor también significativo en esta etapa de expansión celular para la producción eritroide. Del mismo modo que para la respuesta 1, no se reconocieron interacciones entre factores estadísticamente significativas. Para ambas respuestas, esto otorgó validez a los modelos generados a partir del diseño de *Plackett-Burman*.

Sin embargo, a pesar de no haberse hallado interacciones estadísticamente significativas para las respuestas estudiadas, ambas vinculadas con el mantenimiento de las HSPCs en un estado indiferenciado, se reconoce que si bien este objetivo se puede lograr parcialmente y durante un periodo de tiempo muy limitado de cultivo *in vitro*, inevitablemente, al separar a las HSPCs de su nicho natural *in vivo*, la diferenciación ocurrirá en mayor o menor grado. Por lo tanto, es importante mantener presentes en el medio de cultivo ciertos factores que interaccionan y que son absolutamente requeridos para lograr que los progenitores que van comprometiéndose y adquiriendo un mayor grado de diferenciación, lo hagan en la dirección del linaje celular de interés. Este es el caso, por ejemplo, de EPO y SCF que actúan sinérgicamente para incrementar la eritropoyesis, donde SCF hace a las células más sensibles a EPO y simultáneamente ralentiza la diferenciación eritroide. Por este motivo se mantuvieron para etapas posteriores todos los factores que se incluyeron en el proceso de *screening*, puesto que, por lo que se encuentra reportado en la bibliografía, se consideró que serían positivos para el proceso, ya sea en el mantenimiento de las HSPCs o de los precursores eritroides que se puedan producir.

Entonces, a partir de la información generada, se estableció la necesidad de optimizar los niveles de los factores BSA, GM-CSF e hidrocortisona, manteniéndose los

niveles de los demás factores evaluados en valores constantes y establecidos en función del grado y tipo de efecto (positivo o negativo) sobre las respuesta estudiadas. Para tal fin, se empleó un diseño experimental de tipo *Box-Behnken*, que se caracteriza también por su eficiencia y economía, evaluándose las mismas respuestas. Nuevamente éstas se analizaron en un principio por separado, estudiando los ANOVAs y los requerimientos estadísticos correspondientes: la respuesta 1 presentó una dependencia de tipo cuadrática con la concentración de BSA (Figura 40), mientras que la respuesta 2 presentó una dependencia lineal con este mismo factor (Figura 42), obteniéndose en ambos casos, modelos con elevada capacidad predictiva. Si bien los modelos de superficie de respuesta obtenidos en ambos casos muestran que los óptimos no corresponden a puntos estacionarios, sino que sería posible evaluar nuevas regiones experimentales para mejorar la optimización, la economía del sistema constituye una limitante. De este modo, los datos aquí generados que establecen las relaciones existentes entre factores y respuestas, permitieron llevar adelante una optimización simultánea de ambas respuestas para encontrar, a través de la maximización de la función Deseabilidad, un conjunto de condiciones experimentales que permita obtener una solución de compromiso, luego de establecer conveniencias sobre los niveles de factores y sobre las respuestas. De esta manera, el empleo secuencial de herramientas de diseño experimental permitió obtener una nueva formulación de un medio de cultivo para ser empleado en la primera etapa de crecimiento de los progenitores hematopoyéticos, al que se denominó MePEOpt 0-7, y que incluyó a los factores con efectos estadísticamente significativos sobre la expansión de los progenitores en concentraciones óptimas para tal fin, así como otros factores cuyos niveles se ajustaron en función del tipo de efecto sobre las respuestas relevantes.

Con el objetivo de evaluar el desempeño de estas nuevas condiciones iniciales de cultivo para las HSPCs, y de conocer si sería posible producir células eritroides a partir de ellas o si, por el contrario, la pérdida de viabilidad o un desarrollo leucocitario predominante impedirían cumplir con esta meta, es que se evaluó experimentalmente el medio de cultivo optimizado. Así, las HSPCs purificadas fueron mantenidas durante la primera semana en el MePEOpt 0-7, para luego ser transferidas a los medios de expansión y maduración eritroides MePERef 7-11 y MePERef 11-34 (Figura 48).

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, en tanto permitieron, durante la primera semana de cultivo, obtener un porcentaje medio de células CD34⁺ comprendido dentro del intervalo de confianza predicho por el modelo generado durante el proceso de optimización y, a su vez, una media de expansión de células viables CD34⁺ que superó el límite superior del intervalo de confianza predicho para esta respuesta (Figura 44). En este último caso las variaciones con respecto a la predicción podrían

atribuirse a tres cuestiones: por un lado, a la variabilidad intrínseca de las poblaciones celulares primarias correspondientes a distintas muestras de SCU, a una composición variable del PFC empleado como suplemento o bien a que, durante el proceso de optimización, la medición de esta respuesta se asoció con una elevada variabilidad y una consecuente reducción en la capacidad predictiva de los modelos obtenidos. Estas características no favorecen la generación de modelos altamente predictivos.

Asimismo, la progresión global de los cultivos iniciados en este nuevo medio resultó favorable debido a que la expansión celular acumulada media alcanzó un máximo de 571 veces en 18 días (Figura 49), con un perfil de expansión similar al obtenido en el MePERef (con variaciones en los valores absolutos de expansión). También, en lo relativo a la diferenciación celular, se obtuvo evidencia de la capacidad de las condiciones de cultivo de mantener y expandir selectivamente precursores del linaje eritroide, induciendo también su diferenciación progresiva, mientras que otros linajes no han persistido en los cultivos. Se obtuvo un desarrollo predominante de colonias de tipo eritroide desde el inicio de los cultivos: en el día 0 se observó una elevada proporción de precursores de tipo BFU-E más primitivos; luego, los CFU-E incrementaron su frecuencia lo que coincidió con el cambio a MePERef 7-11 (Figura 50). Por otro lado, al evaluar por citometría de flujo la progresión de la expresión de los marcadores CD71 y CD235a, se observó que las células inicialmente presentaron un fenotipo no eritroide, luego uno mayormente característico de precursores eritroides tempranos (CD71⁺CD235a⁻), lo que estuvo de acuerdo con el aumento en la frecuencia de los CFU-E y que, posteriormente, adquirieron un fenotipo más diferenciado correspondiente a los eritroblastos intermedios que expresan simultáneamente ambos marcadores. También se denotó, desde el día 18, un incremento en la proporción de células eritroides maduras (reticulocitos y GRs). Esto último se evidenció mediante citometría de flujo (en el día 25 se alcanzó un máximo de 19% de células CD71⁻CD235a⁺) (Figura 52), mediante análisis morfológico por tinción de May-Grünwald-Giemsa (maduración eritroide heterogénea) (Figura 53) y por detección de niveles de hemoglobina diferentes de 0 (entre 0,1 y 0,186 g/dl) en la suspensión celular recuperada en el día 27 (luego de ser concentrada).

La elevada selectividad eritroide en detrimento de la leucocitaria que se mencionó se pudo demostrar ya que, a diferencia de lo que se observó en los cultivos realizados en MePERef, en este caso se encontró en los ensayos de formación de colonias que en sólo una semana de cultivo se redujo drásticamente el porcentaje de colonias leucocitarias como las CFU-M o CFU-GM, las cuales no persistieron en cultivo. Adicionalmente, los marcadores CD34 y CD45 disminuyen gradualmente; el porcentaje

de células CD45⁺ se hizo nulo el día 25 de cultivo (Figura 52), momento en el cual las tinciones también demuestran un porcentaje mínimo/nulo de leucocitos (Figura 53).

Un inconveniente que se presentó en estos cultivos fue que a partir del día 18 el crecimiento celular se detuvo, la viabilidad celular comenzó a reducirse de manera sorprendente (en el día 18 fue del 64% y en el día 25 del 46%) y la enucleación fue pobre e inconsistente en el día 27, las células carecían del color rojo profundo que fue observado en el día 18. Podrían existir factores intrínsecos que se encuentren regulando la eritropoyesis y generen este efecto, pero esto último fue también evidenciado en este trabajo en los cultivos en MePERef y por otros autores en diferentes condiciones [34]. Sin embargo, ellos lo percibieron en cultivos de 55 días, mucho más largos, y lo atribuyeron a que la presencia de altos niveles de citoquinas en cultivos prolongados podría llevar a transformaciones celulares y pérdida del potencial de diferenciación.

A pesar de esto, en conclusión, es posible afirmar que se han identificado exitosamente factores de crecimiento clave y que podría utilizarse el MePEOpt 0-7 con buenos resultados en la expansión y mantenimiento de HSPCs y precursores eritroides tempranos para luego transferir las células expandidas en estas condiciones a los medios de cultivo de diferenciación/maduración eritroide reportados. Un aspecto a considerar es que las estimaciones de costo efectuadas por litro de medio de cultivo, comparando los medios MePERef 0-7 y MePEOpt 0-7, indican que el segundo cuesta aproximadamente el 78% del primero. Y podrían obtenerse mejoras explorando la optimización de la composición de los medios de cultivo empleados en las etapas posteriores, así como de otros parámetros físicos (agitación, oxígeno).

Cabe aclarar que la utilización de algunos de los suplementos presentes en este medio de cultivo sería cuestionable desde el punto de vista de la potencial aplicación a largo plazo del mismo en la producción de células eritroides con fines transfusionales. Por un lado, la BSA, de origen animal podría ocasionar efectos inmunológicos indeseados, pero podría ser reemplazada por la albúmina sérica humana (HSA). Asimismo, el empleo de β -mercaptoetanol tampoco sería adecuado, pero el control de los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) podría llevarse a cabo mediante la regulación de la concentración oxígeno en el medio, del mismo modo en que se controlan los niveles de CO₂ en los cultivos estándar. Si bien la regulación de este parámetro físico no fue posible mediante las herramientas experimentales con las que contábamos en el laboratorio, es importante recalcar que, además de regular las ROS, el mismo juega un rol muy importante en la regulación de la eritropoyesis *in vivo* a través de su efecto directo en el microambiente medular. La hipoxia estimula la expresión del receptor de EPO y regula los componentes de la vía de síntesis de HGB, por lo que afecta directamente el mantenimiento de los progenitores, su diferenciación y

maduración [173]. Adicionalmente, sería deseable reducir al mínimo la concentración de plasma o eliminarlo, ya que su empleo redundaría en una mayor variabilidad del proceso de cultivo y en la posibilidad de incorporar componentes desconocidos o indeseados, como agentes adventicios. De este modo, para evaluar la magnitud del efecto que tendría la eliminación del PFC de los cultivos y, en función de esto, decidir acerca de su inclusión, se estudió paralelamente la eliminación del PFC de MePEOpt 0-7 (a este medio libre de plasma se lo denominó MePEOpt 0-7 *free*). Se concluyó que no es posible retirar completamente el PFC de los cultivos realizados con esta composición del MePEOpt 0-7, ya que al cabo de una semana no se hallaron células viables, y que se deberán investigar otros componentes adicionales si se pretende reemplazar este suplemento.

Como se expresó anteriormente, la segunda estrategia abordada para mejorar el sistema de producción eritroide de referencia implicó la generación de HSPCs genéticamente modificadas con la secuencia de hEPO, de modo que las células secreten la hormona en el medio de cultivo, con el objeto de reducir la suplementación con este factor. Así, en este trabajo se describió el proceso desarrollado para la obtención de las células recombinantes, desde la generación exitosa de los vectores de expresión en células eucariotas (Figuras 55 y 56); el ensamblado, acondicionamiento y titulación de los vectores lentivirales empleados para la transducción celular (Figura 57 y Tabla 25); la puesta a punto de las condiciones de transducción particulares requeridas por estas células (que crecen en suspensión y son quiescentes y poco susceptibles de ser transducidas) (Figuras 60, 62 y 64; Tabla 31); como así también la realización y análisis de los cultivos de células recombinantes, incluido un ensayo preliminar efectuado en medio semisólido (Tabla 32 y Figura 66) que apoyó la hipótesis inicial e impulsó a continuar desarrollando esta estrategia en cultivos en suspensión.

De esta manera, se efectuaron cultivos comparativos entre las células no modificadas nmHSPCs cultivadas con EPO comercial [nmHSPCs-EPOc (+)] y las células modificadas eHSPCs cultivadas en ausencia de EPO comercial [eHSPCs-EPOc (-)] (Figura 68). En este último caso la EPOc no fue adicionada los cultivos ya que se hipotetizó que de esta manera se lograría que las HSPCs secreten la propia EPO requerida para su supervivencia y diferenciación eritroide.

En estas condiciones se reportó el compromiso celular hacia el linaje eritroide, evaluado mediante citometría de flujo y tinción de May-Grünwald-Giemsa), debido al efecto de la EPO producida por las HSPCs. La expresión de los marcadores CD34 y CD45 disminuyeron considerablemente durante la primera semana de cultivo, en correlación con la aparición de los eritroblastos tempranos. El porcentaje de células con

el antígeno CD45 continuó reduciéndose hasta el día 11, concomitantemente con la aparición de eritroblastos policromáticos y ortocromáticos (Figuras 71 y 72). Tanto en las eHSPCs-EPOc (-) como en las nmHSPCs-EPOc (+), la inmunofenotipificación reveló que la diferenciación eritroide se caracterizó por un incremento en la expresión de CD71 (marcador eritroide temprano y de reticulocito temprano [170,174]) y CD235a (Figura 72). Conjuntamente con los cambios inmunofenotípicos, se observaron eventos adicionales que caracterizan el desarrollo eritroide: los estudios morfológicos mostraron condensación nuclear debido a la condensación de la cromatina. También fue posible evidenciar cambios en la afinidad por colorantes: las células progresaron desde la basofilia debida al alto contenido de ARN en las células más inmaduras, hacia la acidofilia, un fenómeno directamente relacionado con el almacenamiento de hemoglobina [175] (Figura 71). Las eHSPCs-EPOc (-), así como las nmHSPCs-EPOc (+), alcanzaron un estado similar de maduración. En el ensayo preliminar en medio semisólido las colonias presentaron un tamaño y morfología normales (Figura 66). Adicionalmente, se sabe que la hEPO es requerida para la supervivencia y maduración de las CFU-E y los eritroblastos, pero no es requerida en el estadio de eritroblasto ortocromático para los pasos finales de diferenciación eritroide [176,177].

En estos experimentos se demostró la secreción de hEPO mediante ELISA sándwich e isoelectroenfocado seguido por *Western Blot*. La hEPO secretada alcanzó un nivel máximo en el día 7 de cultivo (Figura 73), momento en el cual los estados de maduración predominantes eran los proeritroblastos/eritroblastos basofílicos. De este modo, se puede inferir que durante la primera semana los progenitores produjeron la hormona y por lo tanto estimularon su propia proliferación y diferenciación a eritroblastos. La caída en el nivel de hEPO luego de la primera semana no sería perjudicial para la expansión y diferenciación de los eritroblastos, ya que los estados de maduración alcanzados en este momento del cultivo presentarían menor respuesta a hEPO que aquélla que tienen los estadios de maduración presentes previamente a este punto en los cultivos; incluso, a partir del momento en que las células alcanzan el estadio de eritroblasto policromatofílico tardío, son independientes de hEPO para su supervivencia [66]. Así los eritroblastos serían capaces de madurar autónomamente con estimulación por hEPO reducida. Esta caída en el nivel de hEPO secretada se puede explicar por las diluciones que se efectuaron en los días 7 y 11 de cultivo. Sin embargo, es evidente que las células presentes en esta etapa no fueron capaces de contrarrestar esta reducción en la concentración de la hormona mediante producción de una mayor cantidad, probablemente debido a que se habría iniciado una disminución en el número de ribosomas [64], y una heterocromatinización asociadas con la

maduración [64,176,178]. Es sabido que la actividad nuclear se reduce progresivamente hasta el estadio de eritroblasto ortocromático, en el cual el núcleo se encuentra completamente inactivo e incapaz de sintetizar ADN o ARN [178].

El isoelectroenfocado seguido por *Western Blot* mostró similitud entre las isoformas presentes en la EPOc y en la hEPO secretada por las HSPCs, aunque esta última presentó isoformas levemente menos acídicas que la primera. La comparación con los cultivos de nmHSPCs-EPOc (+) permitieron observar que los estados de diferenciación final de las poblaciones presentes en ambas líneas de cultivo presentaron elevada semejanza. Así, los resultados obtenidos indican que la hEPO secretada por las eHSPCs-EPOc (-) sería suficiente para inducir la expansión y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos de manera comparable con la acción ejercida por la EPOc sobre las nmHSPCs.

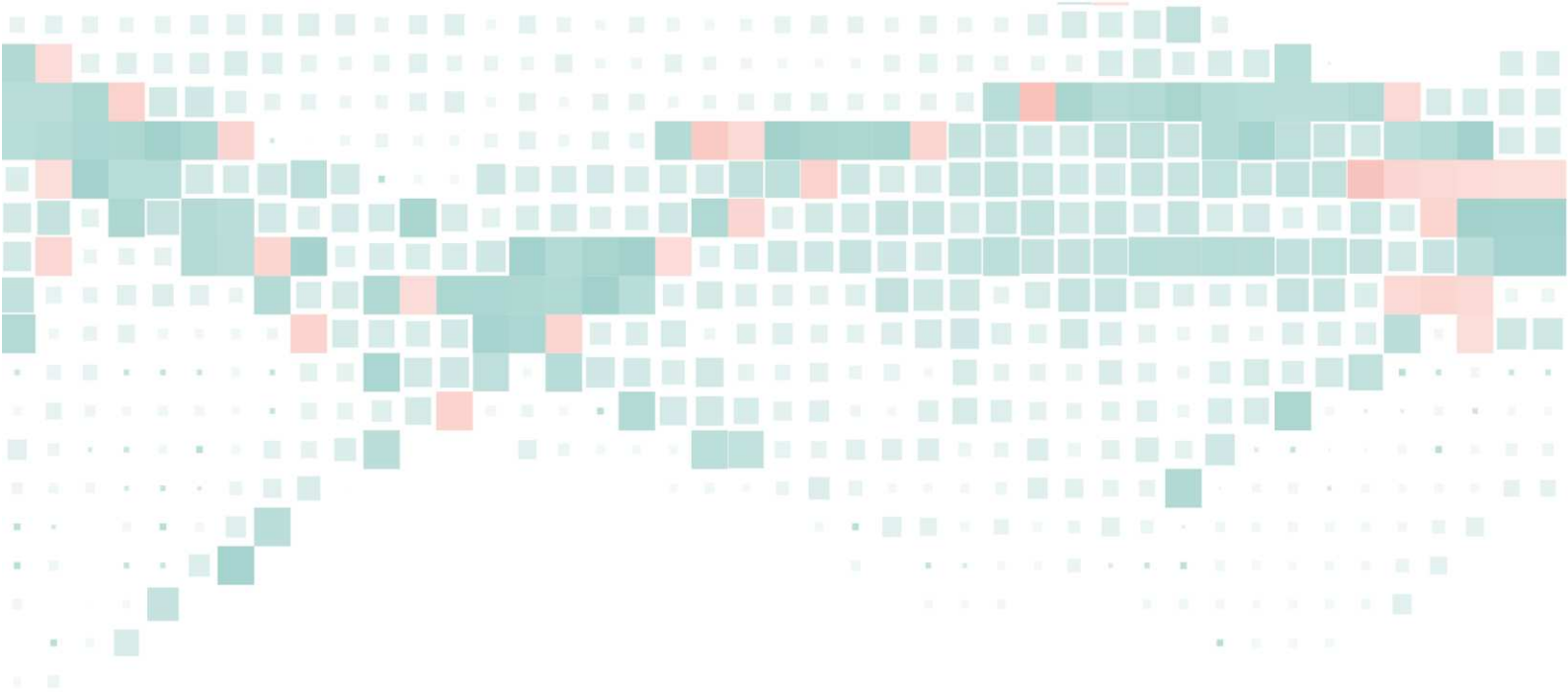
El uso práctico de estas células genéticamente modificadas en los procesos de producción de GRs a gran escala parece no ser imposible debido al considerable progreso que se ha hecho en los procedimientos de cultivo de HSPCs y de producción lentiviral a gran escala, incluso bajo buenas prácticas de manufactura [179–182].

Para trasladar las tecnologías de generación de células eritroides a la práctica, los procesos deben ser escalados. Es por eso que estas proyecciones siempre consideran evaluaciones de rentabilidad, tal como se ha efectuado en publicaciones previamente señaladas. La contribución de la hEPO al costo del medio de cultivo es importante, pero los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible desarrollar sistemas de cultivo en los cuales las HSPCs recombinantes se auto-abastezcan con hEPO. Y la misma estrategia podría ser empleada para explorar la expresión constitutiva o inducible de otras proteínas que tienen una influencia muy elevada en el costo del medio de cultivo, como el hSCF, así como en otros contextos. Asimismo, esta estrategia podría utilizarse de manera combinada con el medio de cultivo optimizado desarrollado.

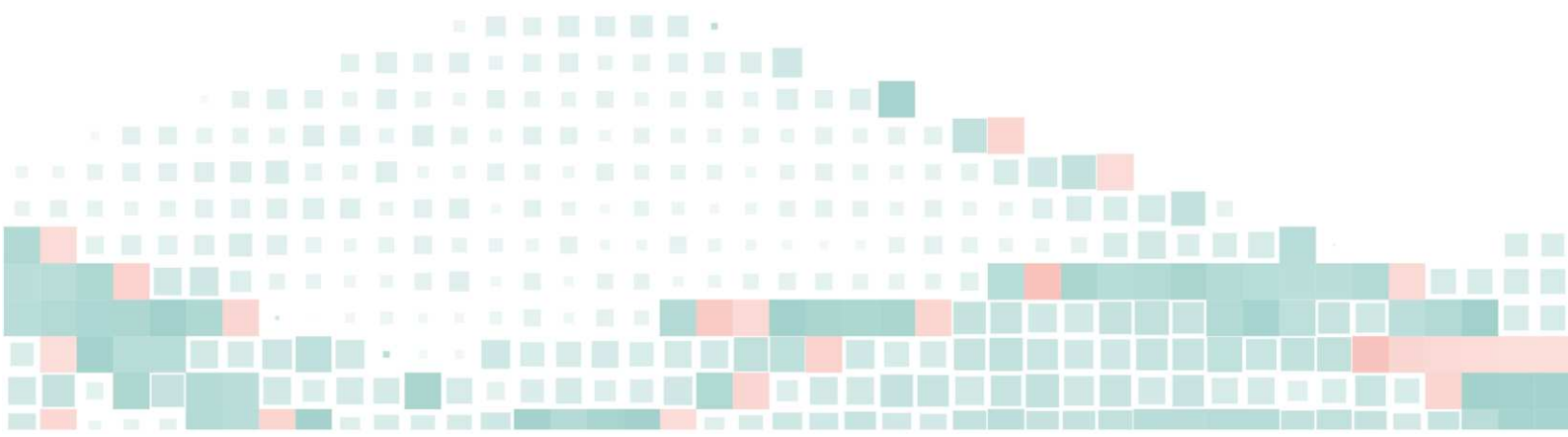
En conclusión, las HSPCs genéticamente modificadas con la secuencia de hEPO fueron auto-inducidas a diferenciar *in vitro*, en ausencia de EPOc, en poblaciones altamente enriquecidas en células eritroides. Se demostró que este resultado se alcanzó como consecuencia de la acción de la hEPO secretada por las propias HSPCs. El estado de maduración final alcanzado por estas células mostró elevada similitud con aquél alcanzado por las nmHSPCs-EPOc (+). Esta estrategia permitiría reducir la cantidad de hEPO adicionada en los cultivos y, de este modo, el costo asociado.

Ambas estrategias desarrolladas en este trabajo de tesis podrían aplicarse en el futuro para lograr mejoras prácticas en los procesos biotecnológicos destinados a la producción *in vitro* de células eritroides con diversos fines, los cuales se encuentran

actualmente en etapas de desarrollo y optimización. Tales fines incluirían la utilización de eritroblastos como productos alternativos para transfusiones crónicas (aunque su comportamiento *in vivo* aún no se encuentra definido y es posible la ocurrencia de genotoxicidad), así como el empleo de GRs en *kits* diagnósticos, en la entrega sistémica de drogas (en este caso también se podrían emplear células más indiferenciadas), o como productos alternativos para transfusiones en casos particulares. Sin embargo, las dosis terapéuticas no pueden ser producidas con la tecnología actual.



Anexo



Titulación de anticuerpos monoclonales (mAb) para citometría de flujo

Considerando el elevado número de corridas experimentales que implican los experimento de tipo DoE y los análisis inmunofenotípicos reiterados que se efectúan sobre los cultivos de HSPCs, se hace necesario optimizar el consumo de reactivos, por lo que se titularon los anticuerpos utilizados.

- BD Anti hCD34 de ratón-PE. Clon 8G12, concentración 25 µg/ml, isotipo IgG1, κ

A partir de una población celular mixta constituida aproximadamente por un 90% de células eritroblásticas TF-1 (que expresa CD34) y por un 10% de células CHO-K1, que carece de este marcador de superficie y constituirá la población celular negativa, se efectuó la marcación con el mAb indicado en diferentes diluciones: 2/25, 1/25, 1/125, 1/250, 1/1.250 y 1/2.500. Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo, calculando a partir de esto el IT para cada concentración del mAb. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 72.A. En este caso, si bien se produce un incremento en el IT entre la dilución 1/25 (1.000 ng/ml) y 2/25 (2.000 ng/ml), se empleará en los subsiguientes experimentos la dilución 1/25, ya que el porcentaje detectado como eventos positivos resulta muy similar para ambas diluciones y el uso de una concentración de 1.000 ng/ml reduce el consumo del reactivo a la mitad.

- BD Anti hCD71 de ratón-APC. Concentración 1,5 µg/ml, isotipo IgG2a, κ

El procedimiento empleado para la titulación de este mAb fue idéntico al utilizado con el mAb anti hCD34-PE. Los resultados de IT en función de la concentración del anticuerpo se indican en la Figura 72.B. Cabe aclarar que, al igual que para el caso de anti hCD34-PE, se escogió la dilución 1/25 (60 ng/ml), a pesar de que el IT es mayor para la dilución 2/25. Esto permitirá reducir el consumo de anticuerpo e igualmente lograr una muy buena distinción de las poblaciones negativa y positiva.

- BD Anti hCD45 de ratón-FITC. Concentración 6,25 µg/ml, isotipo IgG1, κ

Para la titulación se utilizaron MNCs obtenidas a partir de sangre periférica heparinizada, las cuales se mezclaron con un 10% de células TF-1 (población negativa). En este caso las diluciones que se estudiaron fueron 2/25, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400. Se consideró adecuado continuar realizando las marcaciones celulares con una dilución 1/25 (250 ng/ml) de mAb. Estos resultados se evidencian en la Figura 72.C.

- BD Anti hCD235a de ratón-PE-Cy7. Concentración 3 μ g/ml, isotipo IgG2b, κ

El anticuerpo se tituló usando una mezcla de GRs y MNCs. Las diluciones analizadas fueron las mismas que para anti hCD45-FITC: 2/25, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400. En este caso, la dilución seleccionada para continuar trabajando fue 1/50 (60 ng/ml) y esto se indica en la Figura 72.D.

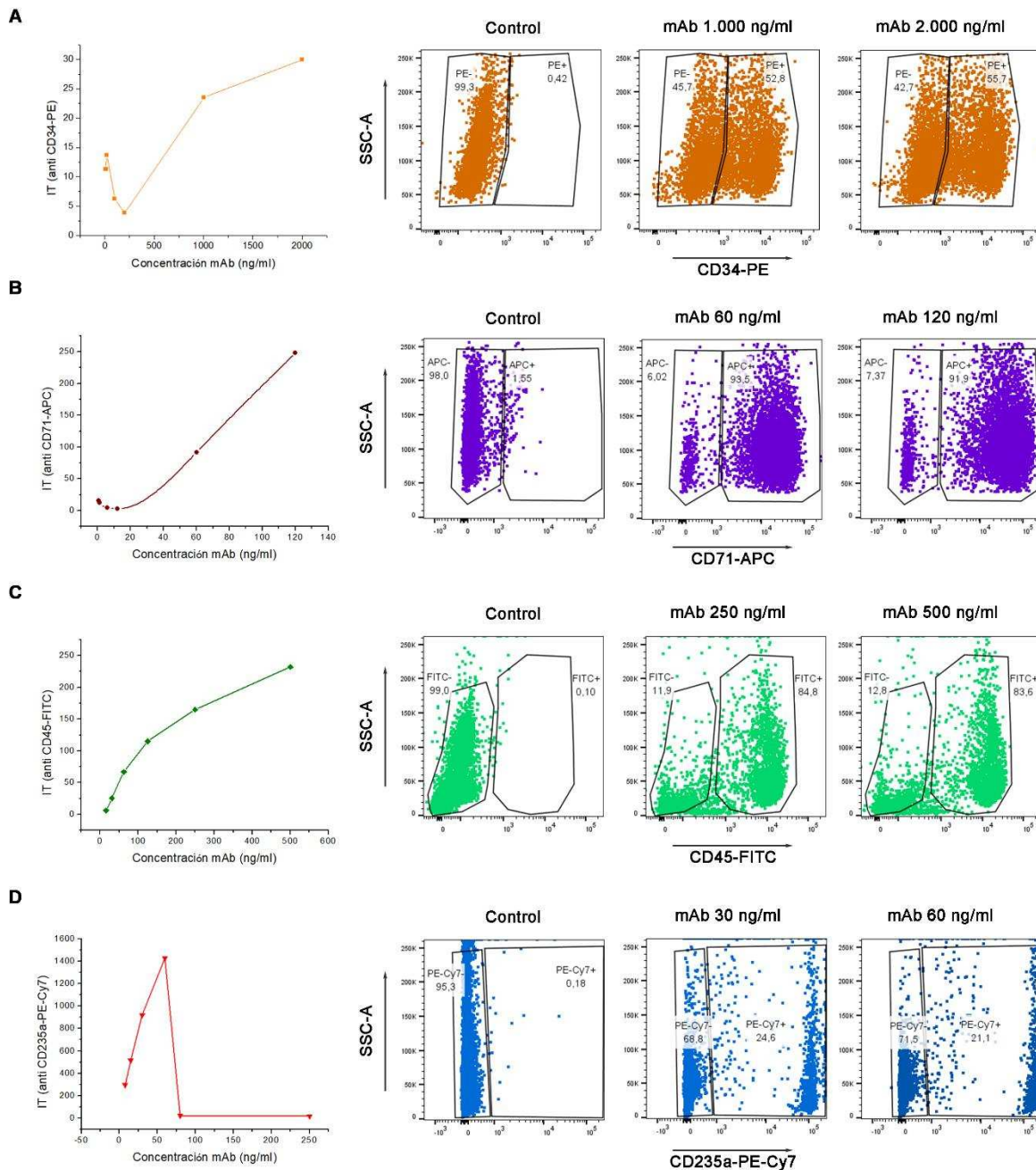


Fig. 72. Índices de tinción y citometrías de flujo. Se observa el IT en función de la concentración de anticuerpo (ng/ml) y dot plots obtenidos para los controles y para las células marcadas con las dos concentraciones de mAbs que permitieron obtener mayores IT: **A.** anti hCD34-PE; **B.** anti hCD71-APC; **C.** anti hCD45-FITC y **D.** anti hCD235a-PE-Cy7. En cada dot plot se muestran las estadísticas correspondientes.



Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- [1] R Burgess (2013) Chapter 1-Introduction to Stem Cells, En: *Stem Cells Handbook* (Ed: Sell S). Springer Science & Business Media, Nueva York, Estados Unidos, p. 1-27.
- [2] O Forostyak, G Dayanithi, S Forostyak (2016) CNS Regenerative Medicine and Stem Cells. *Opera Medica Physiol* 2 (1):55-62.
- [3] JK Biehl, B Russell (2009) Introduction to Stem Cell Therapy. *J Cardiovasc Nurs* 24 (2):98-105.
- [4] J Yang, MV Plikus, NL Komarova (2015) The Role of Symmetric Stem Cell Divisions in Tissue Homeostasis. *PLoS Comput Biol* 11 (12):e1004629.
- [5] Y Yamashita, D Jones, M Fuller (2003) Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301 (5639):1547-1550.
- [6] SJ Morrison, J Kimble (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441 (7097):1068-1074.
- [7] FJ Pitossi (2014) *Qué son las células madre*. Paidós, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- [8] K Takahashi, S Yamanaka (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126 (4):663-676.
- [9] DT Scadden (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441 (7097):1075-1079.
- [10] SJ Morrison, DT Scadden (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505 (7483):327-334.
- [11] SH Orkin, LI Zon (2008) Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132 (4):631-644.
- [12] J Martinez-Agosto (2007) The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* 21 (23):3044-3060.
- [13] SJ Morrison, AC Spradling (2008) Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell* 132 (4):598-611.
- [14] C Magnon, PS Frenette (2008) Hematopoietic stem cell trafficking, En: *StemBook* (Ed. D Scadden). The Stem Cell Research Community, Stembook, Cambridge, MA, p. 1-24. <https://www.stembook.org>. Último acceso: 26 de Mayo de 2018.
- [15] E Hatzimichael, M Tuthill (2010) Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning Adv Appl* 3 (1):105-117.
- [16] D Bryder, DJ Rossi, IL Weissman (2006) Hematopoietic Stem Cells. The

- paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169 (2):338-346.
- [17] FQ Alenzi, BQ Alenazi, SY Ahmad, ML Salem, AA Al-Jabri, RKH Wyse (2009) The Haematopoietic Stem Cell- Between Apoptosis and Self Renewal. *Yale J Biol Med* 82 (1):7-18.
- [18] K Perruccio, E Mastrodicasa, F Arcioni, I Capolsini, C Cerri, GMI Gurdo, M Caniglia (2017). Chapter 5-Exploiting the role of hematopoietic stem cell transplantation as a cure of hematological and non hematological diseases, En: *Toward the future: the new challenges of the cell therapy and potential of regenerative medicine* (Ed: N Daniele, F Zinno). Bentham Science Publishers, Sharjah, Emiratos Árabes Unidos, p. 56-104.
- [19] JN Mehrishi, T Bakács (2013) A novel method of CD34+ cell separation from umbilical cord blood. *Transfusion* 53 (11):2675-2680.
- [20] J Seita, IL Weissman (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2 (6):640-653.
- [21] NE Timmins, LK Nielsen (2009) Blood cell manufacture: current methods and future challenges. *Trends Biotechnol* 27 (7):415-422.
- [22] D Bryder, DJ Rossi, IL Weissman (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169 (2):338-346.
- [23] CJ Eaves (2015) Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 125 (17):2605-2613.
- [24] M Crisan, E Dzierzak (2016) The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development* 143 (24):4571-4581.
- [25] B Dykstra, D Kent, M Bowie, L McCaffrey, M Hamilton, K Lyons, S-J Lee, R Brinkman, C Eaves (2007) Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* 1 (2):218-229.
- [26] R Yamamoto, Y Morita, J Ooehara, S Hamanaka, M Onodera, KL Rudolph, H Ema, H Nakauchi (2013) Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* 154 (5):1112-1126.
- [27] H Ema, Y Morita, T Suda (2014) Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 42 (2):74-82.e2.
- [28] R Schofield (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4 (1-2):7-25.
- [29] S Kumar, H Geiger (2017) HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol Med* 23 (9):799-819.
- [30] P Bianco (2011) Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* 117 (20):5281-5288.

- [31] AJ Lilly, WE Johnson, CM Bunce (2011) The Haematopoietic Stem Cell Niche: New Insights into the Mechanisms Regulating Haematopoietic Stem Cell Behaviour. *Stem Cells Int* 2011: 274564.
- [32] GF Rousseau, C Mazurier, L Douay (2016) Culturing red blood cells from stem cells: a solution to present and future challenges of transfusion medicine? *ISBT Sci Ser* 11 (S1):111-117.
- [33] T Jaatinen, J Laine (2007) Section 2A- Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient, En: *Curr Protoc Stem Cell Biol*. Wiley, USA.
- [34] NE Timmins, S Athanasas, M Gü, P Buntine, LK Nielsen (2011) Ultra-High-Yield Manufacture of Red Blood Cells from Hematopoietic Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods* 17 (11):1131-1137.
- [35] AR Smith, JE Wagner (2009) Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *Br J Haematol* 147 (2):246-261.
- [36] F Barriga, P Ramírez, A Wietstruck, N Rojas (2012) Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol Res* 45 (3):307-316.
- [37] JR Passweg, H Baldomero, P Bader, C Bonini, S Cesaro, P Dreger, RF Duarte, C Dufour, J Kuball, D Farge-Bancel, A Gennery, N Kröger, F Lanza, A Sureda, M Mohty (2016) Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. *Bone Marrow Transplant* 51 (6):789-792.
- [38] L Naldini (2015) Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 526 (7573):351-360.
- [39] S-J Lu, F Li, H Yin, Q Feng, EA Kimbrel, E Hahm, JN Thon, W Wang, JE Italiano, J Cho, R Lanza (2011) Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice. *Cell Res* 21 (3):530-545.
- [40] G Guerriero, R Mattia, U Testa, C Chelucci, I Macioce, Giampiero Casella, P Samoggia, C Peschle, HJ Hassan (2001) Stromal cell-derived factor 1 α increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 97 (9):2587-2595.
- [41] T Matsunaga, I Tanaka, Kobune, Y MKawano, M Tanaka, K Kuribayashi, S Iyama, T Sato, Y Sato, R Takimoto, T Takayama, J Kato, T Ninomiya, H Hamada, Y Niitsu (2006) Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34+ cells. *Stem Cells* 24 (12):2877-2887.
- [42] WHO (2011) Global Database on Blood Safety, Summary Report 2011. En: http://www.who.int/bloodsafety/global_database/GDBS_Summary_Report_2011.pdf. Último acceso: 3 de Junio de 2017.

- [43] EE Bouhassira (2012) Concise Review: Production of Cultured Red Blood Cells from Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 1 (12):927-933.
- [44] G Lippi, M Montagnana, M Franchini (2011) Ex-vivo red blood cells generation: A step ahead in transfusion medicine? *Eur J Intern Med* 22 (1):16-19.
- [45] L Douay, G Andreu (2007) Ex vivo Production of Human Red Blood Cells From Hematopoietic Stem Cells: What Is the Future in Transfusion? *Transfus Med Rev* 21 (2):91-100.
- [46] H Lapillonne, L Kobari, C Mazurier, P Tropel, MC Giarratana, I Zanella-Cleon, L Kiger, M Wattenhofer-Donzé, H Puccio, N Hebert, A Francina, G Andreu, S Viville, L Douay (2010) Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95 (10):1651-1659.
- [47] GF Rousseau, M-C Giarratana, L Douay (2014) Large-scale production of red blood cells from stem cells: what are the technical challenges ahead? *Biotechnol J* 9 (1):28-38.
- [48] A Zeuner, F Martelli, S Vaglio, G Federici, C Whitsett, AR Migliaccio (2012) Concise review: Stem cell-derived erythrocytes as upcoming players in blood transfusion. *Stem Cells* 30 (8):1587-1596.
- [49] JC Zimring, L Welniak, JW Semple, PM Ness, SJ Slichter, SL Spitalnik (2011) Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. *Transfusion* 51 (2):435-441.
- [50] MC Giarratana, H Rouard, A Dumont, L Kiger, I Safeukui, PY Le Pennec, S François, G Trugnan, T Peyrard, T Marie, S Jolly, N Hebert, C Mazurier, N Mario, L Harmand, H Lapillone, JY Devaus, L Douay (2011) Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 118 (19):5071-5079.
- [51] MC Giarratana, L Kobari, H Lapillonne, D Chalmers, L Kiger, T Cynober, MC Marden, H Wajcman, L Douay (2005) Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 23 (1):69-74.
- [52] K Miharada, T Hiroyama, K Sudo, T Nagasawa, Y Nakamura (2006) Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 24 (10):1255-1256.
- [53] AR Migliaccio, C Whitsett, T Papayannopoulou, M Sadelain (2012) The potential of stem cells as an in vitro source of red blood cells for transfusion. *Cell Stem Cell* 10 (2):115-119.
- [54] FC Giani, C Fiorini, A Wakabayashi, LS Ludwig, RM Salem, CD Jobaliya, SN Regan, JC Ulirsch, G Liang, O Steinberg-Shemer, MH Guo, T Esko, W Tong, C Brugnara, JN Hirschhorn, MJ Weiss, LI Zon, ST Chou, DL French, K Musunuru, VG Sankaran (2016) Targeted Application of Human Genetic Variation Can

- Improve Red Blood Cell Production from Stem Cells. *Cell Stem Cell* 18 (1):73-78.
- [55] AR Migliaccio, E Masselli, L Varricchio, C Whitsett (2012) Ex-vivo expansion of red blood cells: How real for transfusion in humans? *Blood Rev* 26 (2):81-95.
- [56] ER Macari, CH Lowrey (2011) Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. *Blood* 117 (22):5987-5997.
- [57] AR Migliaccio, D Rotili, A Nebbioso, G Atweh, A Mai (2008) Histone deacetylase inhibitors and hemoglobin F induction in β -thalassemia. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (11):2341–2347.
- [58] PA Tamez, H Liu, S Fernandez-Pol, K Haldar, A Wickrema (2009) Stage-specific susceptibility of human erythroblasts to *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Blood* 114 (17):3652-3655.
- [59] L Jiang, MJ López-Barragána, H Jiang, J Mua, D Gaura, K Zhaob, G Felsenfeldc, LH Millera (2009) Epigenetic control of the variable expression of a *Plasmodium falciparum* receptor protein for erythrocyte invasion. *Proc Natl Acad Sci* 107 (5):2224–2229.
- [60] G Migliaccio, AR Migliaccio (2010) Getting personal with B19 parvovirus. *Blood* 115 (5):922-923.
- [61] AY Chen, W Zhang, Elizabeth Yan Guan, F Cheng, S Kleiboeker, J Yankee, Thomas M. Qiu (2010) The small 11kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood* 115 (5):1070-1080.
- [62] A Chang, M Stephan, M Sadelain (2006) Stem cell-derived erythroid cells mediate long-term systemic protein delivery. *Nat Biotechnol* 24 (8):1017-1021.
- [63] E Dzierzak, S Philipsen (2013) Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3 (4):a011601
- [64] AR Migliaccio (2010) Erythroblast enucleation. *Haematologica* 95 (12):1985-1988.
- [65] VK Singh, A Saini, M Kalsan, N Kumar, R Chandra (2016) Stage-Specific Regulation of Erythropoiesis and Its Implications in Ex-Vivo RBCs Generation. *J Stem Cells* 11 (3):149-169.
- [66] G Keerthivasan, A Wickrema, JD Crispino (2011) Erythroblast Enucleation. *Stem Cells Int* 2011(Artículo 139851):9 páginas
- [67] JA Chasis, N Mohandas (2008) Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 112 (3):470-478.
- [68] J Hu, J Liu, F Xue, G Halverson, M Reid, A Guo, L Chen, A Raza, N Galili, J Jaffray, J Lane, JA Chasis, N Taylor, N Mohandas, X An (2013) Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications

- for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* 121 (16):3246-3253.
- [69] K Kaushansky, M Lichtman, J Prchal, MM Levi, O Press, L Burns, M Caligiuri (2016) *Williams Hematology 9th Edition* (Ed; K Kaushansky, MM Levi). McGraw-Hill Education, Nueva York, Estados Unidos.
- [70] VK Singh, A Saini, R Chandra (2014) Role of Erythropoietin and Other Growth Factors in Ex Vivo Erythropoiesis. *Adv Regen Med* 2014 (Artículo 426520):8 páginas.
- [71] J Vandekerckhove, G Courtois, S Coulon, J-A Ribeil, O Hermine (2009) Chapter 2-Regulation of erythropoiesis, En: *European School of Haematology (ESH) Handbook on Disorders of Iron Metabolism* (Ed. ESH), p. 44-87.
- [72] R Sasaki (2003) Pleiotropic Functions of Erythropoietin. *Intern Med* 42 (2):142-149.
- [73] JW Fisher (2003) Erythropoietin: Physiology and Pharmacology Update. *Exp Biol Med* 228 (1):1-14.
- [74] MJ Koury, MC Bondurant (1990) Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248 (4953):378-381.
- [75] W Jelkmann (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 43 (8):649-659.
- [76] G Melli, SC Keswani, A Höke (2006) Chapter 1-History and Biology of Erythropoietin in Hematopoietic and Non-Neural Tissues, En: *Erythropoietin and the Nervous System* (Ed: A Höke). Springer, New York, Estados Unidos, p. 1-13.
- [77] G Migliaccio, R Di Pietro, V di Giacomo, A Di Baldassarre, AR Migliaccio, L Maccioni, R Galanello, T Papayannopoulou (2002) In Vitro Mass Production of Human Erythroid Cells from the Blood of Normal Donors and of Thalassemic Patients. *Blood Cells Mol Dis* 28 (2):169-180.
- [78] T Papayannopoulou, JL Abkowitz, AD D'Andrea, AR Migliaccio (2009) Biology of Erythropoiesis, Erythroid Differentiation and Maturation, En: *Hematology: Basic Principles and Practice* (Ed: R Hoffman, E Benz, S Shattil, B Furie, L Silberstein, P McGlave, H Heslop). Elsevier, Philadelphia, PA, USA, p. 276-299.
- [79] CE Severn, H Macedo, MJ Eagle, P Rooney, A Mantalaris, AM Toye (2016) Polyurethane scaffolds seeded with CD34+ cells maintain early stem cells whilst also facilitating prolonged egress of haematopoietic progenitors. *Sci Rep* 6 (1):32149.
- [80] B Psaila, N Barkas, D Iskander, A Roy, S Anderson, N Ashley, VS Caputo, J Lichtenberg, S Loaiza, DM Bodine, A Karadimitris, AJ Mead, I Roberts (2016)

- Single-cell profiling of human megakaryocyte-erythroid progenitors identifies distinct megakaryocyte and erythroid differentiation pathways. *Genome Biol* 17 (1):83.
- [81] A Attar (2014) Changes in the Cell Surface Markers During Normal Hematopoiesis: A Guide to Cell Isolation. *Glob J Hematol Blood Transfus* 1:20-28.
- [82] D Marsee, G Pinkus, H Yu (2010) CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 134 (3):429-435.
- [83] T Nakahata, N Okumura (1994) Cell surface antigen expression in human erythroid progenitors: erythroid and megakaryocytic markers. *Leuk Lymphoma* 13 (5-6):401-409.
- [84] K Chen, J Liu, S Heck, JA Chasis, X An, N Mohandas (2009) Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (41):17413-17418.
- [85] MJ Koury, VH Haase (2015) Anaemia in kidney disease harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat Rev Nephrol* 11 (7):394-410.
- [86] HO Kim (2014) In-Vitro Stem Cell Derived Red Blood Cells for Transfusion: Are We There Yet? *Yonsei Med J* 55 (2):304-309.
- [87] E Fibach, E Rachmilewitz (1990) Proliferation and differentiation of erythroid progenitors in liquid culture: analysis of progenitors derived from patients with polycythemia vera. *Am J Hematol* 35 (3):151-156.
- [88] H Dolznig, F Grebien, EM Deiner, K Stangl, A Kolbus, B Habermann, MA Kerenyi, M Kieslinger, R Moriggl, H Beug, EW Müllner (2006) Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR. *Oncogene* 25 (20):2890-2900.
- [89] B Panzenbock, P Bartunek, MY Mapara, M Zenke (1998) Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 92 (10):3658-3668.
- [90] M von Lindern, W Zauner, G Mellitzer, P Steinlein, G Fritsch, K Huber, B Löwenberg, H Beug (1999) The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood* 94 (2):550-559.
- [91] K Muta, SB Krantz, MC Bondurant, A Wickrema (1994) Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *J Clin Invest* 94 (1):34-43.
- [92] TMA Neildez-Nguyen, H Wajcman, MC Marden, M Bensidhoum, V Moncollin, MC

- Giarratana, L Kobari, D Thierry, L Douay (2002) Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat Biotechnol* 20 (5):467-472.
- [93] A Fujimi, T Matsunaga, M Kobune, Y Kawano, T Nagaya, I Tanaka, S Iyama, T Hayashi, T Sato, K Miyanishi, T Sagawa, Y Sato, R Takimoto, T Takayama, J Kato, S Gasa, H Sakai, E Tsuchida, K Ikebuchi, H Hamada, Y Niitsu (2008) Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol* 87 (4):339-350.
- [94] C Leberbauer, F Boulmé, G Unfried, J Huber, H Beug, EW Müllner (2005) Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood* 105 (1):85-94.
- [95] R Mabaera, CA Richardson, K Johnson, M Hsu, S Fiering, CH Lowrey (2007) Developmental- and differentiation-specific patterns of human γ - and β -globin promoter DNA methylation. *Blood* 110 (4):1343-1352.
- [96] GW Carlile, DH Smith, M Wiedmann (2004) Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood* 103 (11):4310-4316.
- [97] P Chaurasia, D Berenzon, R Hoffman (2011) Chromatin-modifying agents promote the ex vivo production of functional human erythroid progenitor cells. *Blood* 117 (17):4632-4641.
- [98] M Vlaski, X Lafarge, J Chevaleryre, P Duchez, J Boiron, Z Ivanovic (2009) Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Exp Hematol* 37 (5):573-584.
- [99] EJ Baek, H-S Kim, J-H Kim, NJ Kim, HO Kim (2009) Stroma-free mass production of clinical-grade red blood cells (RBCs) by using poloxamer 188 as an RBC survival enhancer. *Transfusion* 49 (11):2285-2295.
- [100] S Capellera-Garcia, J Pulecio, K Dhulipala, K Siva, V Rayon-Estrada, S Singbrant, MNE Sommarin, CR Walkley, S Soneji, G Karlsson, A Raya, VG Sankara, J Flygare (2017) Defining the Minimal Factors Required for Erythropoiesis through Direct Lineage Conversion. *Cell Rep* 15 (11):2550-2562.
- [101] T Hiroyama, K Miharada, K Sudo, I Danjo, N Aoki, Y Nakamura (2008) Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS One* 3 (2):e1544.
- [102] R Kurita, N Suda, K Sudo, K Miharada, T Hiroyama, H Miyoshi, K Tani, Y Nakamura (2013) Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS One* 8 (3):e59890.
- [103] S Hirose, N Takayama, S Nakamura, K Nagasawa, K Ochi, S Hirata, S Yamazaki,

- T Yamaguchi, M Otsu, S Sano, N Takahashi, A Sawaguchi, M Ito, T Kato, H Nakauchi, K Eto (2013) Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 1 (6):499-508.
- [104] EJ Baek, J You, MS Kim, S-Y Lee, S-J Cho, E Kim, HO Kim (2010) Enhanced production of red blood cells in suspension by electrostatic interactions with culture plates. *Tissue Eng Part C Methods* 16 (6):1325-1334.
- [105] GJ Housler, T Miki, E Schmelzer, C Pekar, X Zhang, L Kang, V Voskianarian-Berse, S Abbot, K Zeilinger, JC Gerlach (2012) Compartmental Hollow Fiber Capillary Membrane Based Bioreactor Technology for in vitro Studies on Red Blood Cell Lineage Direction of Hematopoietic Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods* 18 (2):133-142.
- [106] M Lim, N Panoskaltsis, H Ye, A Mantalaris (2011) Optimization of in vitro erythropoiesis from CD34+ cord blood cells using design of experiments (DOE). *Biochem Eng J* 55 (2011):154-162.
- [107] M Lim, C Shunjie, N Panoskaltsis, A Mantalaris (2012) Systematic experimental design for bioprocess characterization: Elucidating transient effects of multi-cytokine contributions on erythroid differentiation. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 17 (1):218-226.
- [108] L Vera Candiotti, MM De Zan, MS Cámara, HC Goicoechea (2014) Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124:123-138.
- [109] J Antony (2014) *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Elsevier Science, Oxford.
- [110] RH Myers, DC Montgomery, CM Anderson-Cook (2009) *Response Surface Methodology- Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (Ed: DJ Balding, NAC Cressie, GM Fitzmaurice, IM Johnstone, G Molenberghs, DW Scott, AFM Smith, RS Tsay, S Weisberg). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- [111] AI Khuri, JA Cornell (1996) *Response Surfaces: Designs and Analyses* (Ed: CRC Press). Taylor & Francis.
- [112] PJ Whitcomb, MJ Anderson (2004) *RSM Simplified: Optimizing Processes Using Response Surface Methods for Design of Experiments* (Ed: PJ Whitcomb, MJ Anderson). Productivity Press, Nueva York, Estados Unidos.
- [113] DC Montgomery (2017) *Design and Analysis of Experiments* (Ed: John Wiley & Sons). John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, Estados Unidos.
- [114] AC Logan, C Lutzko, DB Kohn (2002) Advances in lentiviral vector design for

- gene-modification of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 13 (5):429-436.
- [115] SJ Horton, O Williams (2006) The Mechanism of Hematopoietic Progenitor Cell immortalization by MLL-ENL. *Cell Cycle* 5 (4):360-362.
- [116] C-H Huang, P-M Chen, T-C Lu, W-M Kung, T-J Chiou, M-H Yang, J-Y Kao, K-J Wu (2010) Purified recombinant TAT-homeobox B4 expands CD34(+) umbilical cord blood and peripheral blood progenitor cells ex vivo. *Tissue Eng Part C Methods* 16 (3):487-496.
- [117] AH Chang, M Sadelain (2007) The Genetic Engineering of Hematopoietic Stem Cells: the Rise of Lentiviral Vectors, the Conundrum of the LTR, and the Promise of Lineage-restricted Vectors. *Mol Ther* 15 (3):445-456.
- [118] SE Sellers, B Dumitriu, MJ Morgan, W Hughes, CO Wu, N Raghavarchari, Y Yang, N Uchida, JF Tisdale, DS An, IS Chen, P Hematti, RE Donahue, A Larochele, NS Young, RT Calado, CE Dunbar (2013) No Impact of Lentiviral Transduction on Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Telomere Length or Gene Expression in the Rhesus Macaque Model. *Mol Ther* 22 (1):52-58.
- [119] M Bukrinsky (2004) A hard way to the nucleus. *Mol Med* 10 (1-6):1-5.
- [120] L Ailles, M Schmidt, FR Santoni de Sio, H Glimm, S Cavalieri, S Bruno, W Piacibello, C Von Kalle, L Naldini (2002) Molecular Evidence of Lentiviral Vector-Mediated Gene Transfer into Human Self-Renewing, Multi-potent, Long-Term NOD/SCID Repopulating Hematopoietic Cells. *Mol Ther* 6 (5):615-626.
- [121] PA Horn, KA Keyser, LJ Peterson, T Neff, BM Thomasson, J Thompson, H-P Kiem (2004) Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood* 103 (10):3710-3716.
- [122] H Hanawa, P Hematti, K Keyvanfar, ME Metzger, A Krouse, RE Donahue, S Kepes, J Gray, CE Dunbar, DA Persons, AW Nienhuis (2004) Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* 103 (11):4062-4069.
- [123] F Géronimi, E Richard, I Redonnet-Vernhet, I Lamrissi-Garcia, M Lalanne, C Ged, F Moreau-Gaudry, H de Verneuil (2003) Highly Efficient Lentiviral Gene Transfer in CD34+ and CD34+/38-/lin- Cells from Mobilized Peripheral Blood after Cytokine Prestimulation. *Stem Cells* 21 (4):472-480.
- [124] AC Logan, SJ Nightingale, DL Haas, GJ Cho, KA Pepper, DB Kohn (2004) Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15 (10):976-988.
- [125] SP Zielske, SL Gerson (2003) Cytokines, including stem cell factor alone,

- enhance lentiviral transduction in nondividing human LTCIC and NOD/SCID repopulating cells. *Mol Ther* 7 (3):325-333.
- [126] T Sakuma, MA Barry, Y Ikeda (2012) Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 443 (3):603-618.
- [127] M Geraerts, S Willems, V Baekelandt, Z Debyser, R Gijssbers (2006) Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* 6:34.
- [128] A Ramezani, TS Hawley, RG Hawley (2000) Lentiviral Vectors for Enhanced Gene Expression in Human Hematopoietic Cells. *Mol Ther* 2 (5):458-469.
- [129] RH Zubler (2006) Ex vivo expansion of haematopoietic stem cells and gene therapy development. *Swiss Med Wkly* 136:795-799.
- [130] <https://www.mirusbio.com/assets/figures/lentivirus-production-mirus-bio-recombinant.png>. Último acceso: 6 de Junio de 2018.
- [131] A Pfeifer, T Lim, K Zimmermann (2010) Lentivirus transgenesis. *Methods Enzymol* 477:3-15.
- [132] J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989a) Appendix E.5. Spectrophotometric determination of the amount of DNA or RNA, En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual* (Ed: C Nolan). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Estados Unidos.
- [133] J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) Appendix A-Bacterial media, antibiotics and bacterial strains, En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual* (Ed: C Nolan). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Estados Unidos.
- [134] FL Graham, J Smiley, WC Russell, R Nairn (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36 (1):59-74.
- [135] T Kitamura, T Tange, T Terasawa, S Chiba, T Kuwaki, K Miyagawa, Y -F Piao, K Miyazono, A Urabe, F Takaku (1989) Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol* 140 (2):323-334.
- [136] TT Puck, SJ Cieciura, A Robinson (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108 (6):945-956.
- [137] A Adan, G Alizada, Y Kiraz, Y Baran, A Nalbant (2017) Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37 (2):163-176.
- [138] JA Cook, JB Mitchell (1989) Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179 (1):1-7.
- [139] T Hasegawa (1996) Chapter 2 - History and Evolution of Culture Maintenance and Preservation Techniques, En: *Maintaining cultures for biotechnology and industry* (Ed: JC Hunter-Cevera, A Belt). Academic Press, San Diego, Estados Unidos, p.

- 15-27.
- [140] R Freshney (2000a) Chapter 16-Cryopreservation, En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss, Inc, New Jersey, Estados Unidos, p. 297-308.
- [141] R Freshney (2000b) Chapter 13-Cloning and selection, En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, Estados Unidos, p. 195-213.
- [142] RJ Hay (1986) Chapter 4-Preservation and characterisation, En: *Animal cell culture. A practical approach* (Ed: RI Freshney). IRL Press, Oxford, Inglaterra, p. 71-112.
- [143] JE Lovelock, MW Bishop (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183 (4672):1394-1395.
- [144] SP Leibo, P Mazur (1971) The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology* 8 (5):447-452.
- [145] AE Greene, B Athreya, HB Lehr, LL Coriell (1967) Viability of cell cultures following extended preservation in liquid nitrogen. *Proc Soc Exp Biol Med* 124 (4):1302-1307.
- [146] R Freshney (2000c) Chapter 12-Cell lines, En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique* 177-193. Wiley Liss Inc, New Jersey, Estados Unidos, p. 177-193
- [147] MG Macey (1988) Flow cytometry: principles and clinical applications. *Med Lab Sci* 45 (2):165-173.
- [148] MJ Wilkerson (2012) Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 42 (1):53-71.
- [149] I Oshiro, T Takenaka, J Maeda (1982) New method for hemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS). *Clin Biochem* 15 (2):83-88.
- [150] WC Stadie (1920) A method for the determination of methemoglobin in blood. *J Biol Chem* 41 (2):237-241.
- [151] DL Drabkin, JH Austin (1935) Spectrophotometric studies: ii. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin . *J Biol Chem* 112 (1):51-65.
- [152] A Fuselli, L Cappellino, C Prieto, R Kratje (2017) Design of a platform for the expression, purification and in vitro assessment of soluble glycosylated recombinant human stem cell factor produced in HEK293 cells. *25th European Society for Animal Cell Technology Meeting*. Lausana, Suiza, 14-17 de Mayo de 2017, p. 276.
- [153] NN Iscove, F Sieber (1975) Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected

- by macroscopic colony formation in culture. *Exp Hematol* 3 (1):32-43.
- [154] L Naldini, U Blomer, P Gallay, D Ory, R Mulligan, FH Gage, IM Verma, D Trono (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272 (5259):263-267.
- [155] T Dull, R Zufferey, M Kelly, RJ Mandel, M Nguyen, D Trono, L Naldini (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72 (11):8463-8471.
- [156] PL Felgner, TR Gadek, M Holm, R Roman, HW Chan, M Wenz, JP Northrop, GM Ringold, M Danielsen (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (21):7413-7417.
- [157] P Hawley Nelson, V Ciccarone, G Gebevehu, J Jessee (1993) A new polycationic liposome reagent with enhanced activity for transfection. *FASEB J* 7:A167.
- [158] R Zuqueli (2006) Tesis Doctoral: Desarrollo de una tecnología de producción de interferón β recombinante humano en células eucariontes.
- [159] CV Ichim, RA Wells (2011) Generation of high-titer viral preparations by concentration using successive rounds of ultracentrifugation. *J Transl Med* 9:137.
- [160] M Mattio, N Ceaglio, M Oggero, N Perotti, I Amadeo, G Orozco, G Forno, R Kratje, M Etcheverrigaray (2011) Isolation and characterization of a subset of erythropoietin glycoforms with cytoprotective but minimal erythropoietic activity. *Biotechnol Prog* 27 (4):1018-1028.
- [161] F Milano (2001) Tesina de Licenciatura en Biotecnología: Diseño y validación de bioensayos para la valoración biológica in vitro de fármacos.
- [162] HM García Pérez (2000) Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag* 1 (2): 31-41.
- [163] DR Sutherland, A Keating, R Nayar, S Anania, AK Stewart (1994) Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol* 22 (10):1003-1010.
- [164] HH Jabara, SE Boyden, J Chou, N Ramesh, MJ Massaad, H Benson, W Bainter, D Fraulino, F Rahimov, C Sieff, Z-J Liu, SH Alshemmari, BK Al-Ramadi, H Al-Dhekri, R Arnaout, M Abu-Shukair, A Vatsayan, E Silver, S Ahuja, EG Davies, M Sola-Visner, TK Ohsumi, NC Andrews, LD Notarangelo, MD Fleming, W Al-Herz, LM Kunkel, RS Geha (2015) A missense mutation in TFRC, encoding transferrin receptor 1, causes combined immunodeficiency. *Nat Genet* 48:74-78.
- [165] JF Magallanes, AC Olivieri (2010) The effect of factor interactions in Plackett Burman experimental designs. Comparison of Bayesian-Gibbs analysis and genetic algorithms. *Chemom Intell Lab Syst* 102 (1):8-14.
- [166] A Díaz (2009) Supuestos y alternativas del análisis de varianza, En: *Diseño*

- estadístico de experimentos* (Ed: Editorial Universidad de Antioquía). Editorial Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, p. 70-94.
- [167] Rockefeller College, University at Albany (2007) Outliers and DFBETA. En: <https://www.albany.edu/faculty/kretheme/PAD705/SupportMat/DFBETA.pdf>.
Último acceso: 26 de mayo de 2018.
- [168] TJ Robinson (2014) Box-Behnken Designs. *Wiley StatsRef Stat Ref Online*, 1-7
- [169] PR Sarma (1990) Chapter 152-Red Cell Indices, En: *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (Ed: HK Walker, WD Hall, Jw Hurst). Butterworths, Boston, Estados Unidos, p. 720-723.
- [170] MR Loken, V 0 Shah, KL Dattilio, CI Civin (1987) Flow Cytometric Analysis of Human Bone Marrow: I. Normal Erythroid Development. *Blood* 69 (1):255-263.
- [171] A Croset, L Delafosse, JP Gaudry, C Arod, L Glez, C Losberger, D Begue, A Krstanovic, F Robert, F Vilbois, L Chevalet, B Antonsson (2012) Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol* 161 (3):336-348.
- [172] T Kekarainen, S Mannelin, J Laine, T Jaatinen (2006) Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biol* 7:30.
- [173] VH Haase (2010) Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol - Ren Physiol* 299 (1):F1-F13.
- [174] EJ Baek, HS Kim, S Kim, H Jin, TY Choi, HO Kim (2008) In vitro clinical-grade generation of red blood cells from human umbilical cord blood CD34+ cells. *Transfusion* 48 (10):2235-2245.
- [175] P Ji (2015) New Insights into the Mechanisms of Mammalian Erythroid Chromatin Condensation and Eucleation. *Int Rev Cell Mol Biol* 316:159-182.
- [176] N Robinson, S Giraud, C Saudan, N Baume, L Avois, P Mangin, M Saugy (2006) Erythropoietin and blood doping. *Br J Sport Med* 40 (S1):30-34.
- [177] M Silva, D Grillot, A Benito, C Richard, G Nunez, JL Fernandez-Luna (1996) Erythropoietin Can Promote Erythroid Progenitor Survival by Repressing Apoptosis Through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 88 (5):1576-1582.
- [178] JG Quigley, RTJ Means, B Glader (2014) Chapter 6- The Birth, Life and Death of Red Blood Cells: Erythropoiesis, the Mature Red Blood Cell and Cell Destruction, En: *Wintrobe's Clinical Hematology* (Ed: JP Greer, DA Arber, B Glader, AF List, RTJ Means, F Paraskevas, GM Rodgers). Lippincott Williams & Wilkins (LWW), Wolters Kluwer, Philadelphia, Estados Unidos, p. 83-125.
- [179] J Sheu, J Beltzer, B Fury, K Wilczek, S Tobin, D Falconer, J Nolta, G Bauer (2015) Large-scale production of lentiviral vector in a closed system hollow fiber

- bioreactor. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2:15020.
- [180] M Cesani, T Plati, L Lorioli, F Benedicenti, D Redaelli, F Dionisio, L Biasco, E Montini, L Naldini, A Biffi (2015) Shedding of clinical-grade lentiviral vectors is not detected in a gene therapy setting. *Gene Ther* 22 (6):496-502.
- [181] S Scaramuzza, L Biasco, A Ripamonti, MC Castiello, M Loperfido, E Draghici, RJ Hernandez, F Benedicenti, M Radrizzani, M Salomoni, M Ranzani, CC Bartholomae, E Vicenzi, A Finocchi, R Bredius, M Bosticardo, M Schmidt, C von Kalle, E Montini, A Biffi, MG Roncarolo, L Naldini, A Villa, A Aiuti (2012) Preclinical Safety and Efficacy of Human CD34+ Cells Transduced With Lentiviral Vector for the Treatment of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Mol Ther* 21 (1):175-184.
- [182] MC Milone, U O'Doherty (2018) Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*.