

Pilar Sainz de la Maza Arnal

Expansión de células madre y
progenitoras hematopoyéticas a
partir de sangre de cordón
umbilical mediante el uso de
organoides hepáticos humanos de
bioingeniería

Departamento

Instituto de Investigación en Ingeniería [I3A]

Director/es

Lanas Arbeloa, Ángel
aptista, Pedro

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE Y
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS A PARTIR
DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL MEDIANTE
EL USO DE ORGANOIDES HEPÁTICOS HUMANOS
DE BIOINGENIERÍA

Autor

Pilar Sainz de la Maza Arnal

Director/es

Lanas Arbeloa, Ángel
aptista, Pedro

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Instituto de Investigación en Ingeniería [I3A]

2019



Universidad
Zaragoza

**EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE Y
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS A
PARTIR DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL
MEDIANTE EL USO DE ORGANOIDES
HEPÁTICOS HUMANOS DE BIOINGENIERÍA**

Pilar Sainz de la Maza Arnal

Doctorado en Ingeniería Biomédica

Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón

2014-2018



**Universidad
Zaragoza**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA DE ARAGÓN

**EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS
A PARTIR DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL MEDIANTE EL USO DE
ORGANOIDES HEPÁTICOS HUMANOS DE BIOINGENIERÍA**

Memoria presentada por Pilar Sainz de la Maza Arnal

Licenciada en Bioquímica

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Directores: Pedro M. Baptista y Ángel Lanas Arbeloa

El desarrollo y ejecución de esta Tesis Doctoral se han enmarcado dentro del proyecto: “Ex vivo Re-vascularization in Porcine Liver Bioengineering - A Critical First Step Towards Effective Transplantation of Bioengineered Livers”, financiado por el Instituto de Ciencias de la Salud Carlos III de Madrid (PI15/00563) y la ayuda predoctoral DGA concedida a D^a Pilar Sainz de la Maza Arnal, financiada por el Gobierno de Aragón y el Fondo Social y Europeo (C066/2014).

Asimismo agradecemos la generosa aportación de los pacientes en el estudio y la colaboración del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud en el marco del Biobanco de Aragón.



*“Hazlo, comete errores,
vuelve a intentarlo, falla,
manda todo a la mierda y
empieza otra vez si es necesario.
En serio, no pasa nada.”*

AGRADECIMIENTOS

La gente que realmente me conoce sabe que no soy una persona de mostrar los sentimientos y mucho menos de agradecer las cosas. Sin embargo, hoy es una ocasión muy especial y creo que todas las personas que me han ayudado en este largo y arduo camino se merecen que les dé las gracias.

En primer lugar os lo quería agradecer a vosotros, LOS CIBEROS! A la gente que sigue y a la gente que ya no está. No puedo estar más que agradecida de haberos conocido. Cada uno de vosotros habéis ido aportando un granito de arena a este trabajo ya fuera con vuestros consejos, con vuestra ayuda o con una simple sonrisa. Realmente os habéis convertido en una parte muy importante de mi vida. Día a día compartimos muchísimas horas juntos y de corazón puedo decir que gracias a vosotros la tesis ha sido un poco menos dura.

A ti Pedro, por confiar en mí desde el primer momento. No me conocías de nada pero apostaste por mí y ahora mismo solo tengo palabras de agradecimiento. Que sepas que queda pendiente esa partida de ajedrez.

A mis chicas, por todos los bonitos recuerdos que me llevo. No solo me llevo unas compañeras de laboratorio, sino unas amigas. No cambiaría por nada los momentos vividos llenos de risas y lloros. Como ya os dije os voy a echar muchísimo de menos y realmente espero que sigáis formando parte de mi vida.

Especialmente quería dar las gracias a Mark y César. Sinceramente os estoy muy agradecida. Durante estos cuatro años nunca os habéis negado a ayudarme y siempre lo habéis hecho con una sonrisa en la cara. Muchísimas gracias, hace falta mucha más gente como vosotros.

Gracias a toda esa gente que durante mi estancia en Madrid y en Utrecht han invertido parte de su tiempo en enseñarme y formarme, es algo que valoro muchísimo.

Graça, porque aún sin ser mi directora de tesis has formado parte de ella desde el principio. Gracias por guiarme y orientarme en todo momento.

A ti Paula, por estar siempre pendiente de mí. Por levantarme el ánimo en cada momento. Por sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba. GRACIAS.

Y como no a mi FAMILIA. A mis padres y a mi hermano. Ellos son lo que realmente me han visto decaerme en los malos momentos, en aquellos donde lo hubiera dejado todo. Porque para mí no ha sido fácil y realmente ellos siempre han estado allí cuando lo que más necesitaba era un TÚ PUEDES, ERES LA MEJOR (que sepáis que el *copyright* lo tiene mi madre).

Y a ti, José Miguel. Gracias por ser mi compañero de viaje durante este camino. Gracias porque sé que no ha sido sencillo aguantarme y porque, en especial, estos últimos meses no han sido un camino de rosas. Sin embargo, siempre has estado ahí, escuchándome, acompañándome y dándome tu apoyo. Solo te puedo decir GRACIAS.

GRACIAS A TODOS

ÍNDICE

RESUMEN	15
ABREVIATURAS	21
INTRODUCCIÓN	29
1. Enfermedades Hematológicas	31
1.1 Tipos de Neoplasias Hematológicas.....	31
1.2 Tipos de Enfermedades Hematológicas no oncológicas	31
1.3 Tratamientos y Actualidad	32
2. Trasplante con Células Madre Hematopoyéticas.....	33
2.1 Tipos de donante	34
2.2 Tipos de acondicionamiento	35
2.3 Tipos de trasplante según la fuente.....	36
3. Célula Madre.....	40
4. El Sistema Hematopoyético	43
4.1. Estructura del sistema hematopoyético.....	43
4.2. Ontogenia del sistema hematopoyético.....	46
4.3. Nichos hematopoyéticos en la vida fetal y adulta	49
5. Expansión HSC <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i>	56
6. Bioingeniería del hígado.....	60
6.1. Fisiología hepática	60
6.2. Desarrollo embrionario hepático.....	61
6.3. Células Madre Hepáticas	62
6.4. Modelos de bioingeniería hepáticos.....	66
Hipótesis	69
Bibliografía.....	70
CAPÍTULO 1	83
INTRODUCCIÓN	85
OBJETIVOS.....	89
MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
1. Estudio de la hematopoyesis fetal porcina.....	90
2. Descelularización de hígados porcinos	91
3. Estudio Proteómico	93
RESULTADOS.....	96
1. Caracterización de la hematopoyesis fetal porcina.....	96

2. Descelularización de hígados porcinos	97
3. Estudio Proteómico	99
DISCUSIÓN	120
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	128
CAPÍTULO 2	137
INTRODUCCIÓN	139
OBJETIVOS.....	142
MATERIALES Y MÉTODOS.....	143
1. Diferenciación de las ES4 en HB	143
2. Expansión de los HB derivados de las ES4	145
3. Caracterización de los HB derivados de las ES4.....	146
4. Diferenciación Hepatocítica y Colangiocítica de los HB derivados de las ES4	150
5. Expresión de marcadores hematopoyéticos de los HB derivados de las ES4.....	152
RESULTADOS.....	154
1. Expansión y diferenciación de las ES4 en HB	154
2. Expansión de los HB derivados de las ES4	154
3. Caracterización de los HB derivados de las ES4.....	155
4. Diferenciación Hepatocítica y Colangiocítica de los HB derivados de las ES4	157
5. Expresión de marcadores hematopoyéticos de los HB derivados de las ES4.....	159
DISCUSIÓN	161
CONCLUSIONES.....	164
BIBLIOGRAFÍA	165
CAPÍTULO 3	167
INTRODUCCIÓN	169
OBJETIVOS.....	176
MATERIALES Y MÉTODOS.....	177
1. Aislamiento, caracterización y almacenamiento de las células CD34 ⁺ de UCB	177
2. Aislamiento, expansión, caracterización y almacenamiento de las hUVEC	178
3. Aislamiento, expansión, caracterización y almacenamiento de las HpFEC y progenitores hepáticos procedentes de FL humanos	181
4. Inactivación celular de las hUVEC y de las HpFEC	184
5. Formación del nicho hepático fetal	185
6. Expansión y caracterización de las HSC procedentes de SCU empleando organoides hepáticos de bioingeniería	188
RESULTADOS.....	195

1. Caracterización de las células CD34⁺-UCB	195
2. Caracterización de las hUVEC.....	195
3. Caracterización de las HpFEC y de los progenitores hepáticos procedente de FL humanos	197
4. Caracterización del nicho hepático fetal.....	199
5. Expansión y caracterización de las HSC procedentes de UCB empleando organoides hepáticos de bioingeniería	202
DISCUSIÓN	209
CONCLUSIONES.....	215
BIBLIOGRAFÍA	216
APÉNDICE	221

RESUMEN

El trasplante con células madre hematopoyéticas proporciona una salida a una gran variedad de enfermedades hematológicas malignas y no malignas. Sin embargo, alrededor del 70% de los pacientes que necesitan un trasplante no poseen un donante hermano con antígenos leucocitarios humanos compatibles¹. Además, hay que tener en cuenta que existe una gran diversidad en cuanto a los orígenes raciales y étnicos de los respectivos pacientes, por lo que identificar un donante no emparentado compatible hace casi imposible llevar a cabo la intervención en un tiempo razonable².

El uso de células madre/progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical ha aumentado las posibilidades de encontrar donantes compatibles, ya que este tipo de trasplantes poseen un menor riesgo a la hora de inducir enfermedad de injerto contra el huésped y puede ser utilizado incluso cuando solo existe una coincidencia parcial entre el donante y el receptor, reduciendo las probabilidades de transmitir infecciones virales. No obstante, a pesar de los avances realizados *ex vivo* en cuanto a la expansión de células madre/progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical se refiere, el número de células CD34⁺ obtenidas por unidad de sangre, así como la lenta velocidad de injerto, hace que su uso en adultos y adolescentes esté excluido^{3,4}. Además, hay que resaltar la inexistencia de un método robusto para expandir progenitores hematopoyéticos y eritropoyéticos. Todo esto pone de manifiesto la necesidad de generar nuevas tecnologías para la expansión de células madre/progenitoras hematopoyéticas con el objetivo de obtener el número necesario de células hematopoyéticas para el tratamiento de pacientes adultos e incrementar la velocidad de injerto mediante el aumento de progenitores más maduros.

Desde el primer trasplante de sangre de cordón umbilical hace ya más de 20 años⁵, nuevas estrategias han sido desarrolladas con el fin de superar esta limitación. De esta manera, se puede destacar el uso de diferentes combinaciones de factores de crecimiento en presencia o en ausencia de monocapas de células procedentes de la médula ósea o incluso de células estromales hepáticas⁶⁻¹⁰. Recientemente, el uso de monocapas mixtas en cultivos 2D¹¹, matrices acelulares¹², o bio-andamiajes (“*scaffolds*”)¹³ ha contribuido a la expansión de las células madre/progenitoras hematopoyéticas de cordón umbilical, demostrando la gran importancia tanto de la composición como de la estructura del microambiente. Sin embargo, aún sigue siendo

un reto el poder expandir células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a largo plazo, de tal manera que se obtenga un número suficiente de células madre hematopoyéticas como para injertar a un adulto, así como un número apropiado de poblaciones progenitoras que puedan acortar el tiempo de injerto.

Durante el desarrollo embrionario, el hígado es el principal sitio de diferenciación y expansión de las células madre hematopoyéticas y diferenciación de los progenitores eritroides¹⁴. Por lo tanto, dentro del tejido hepático, existen distintos nichos celulares los cuales están promoviendo tanto la división asimétrica como la renovación simétrica, conduciendo de esta manera al mantenimiento y la expansión de las células madre hematopoyéticas, respectivamente^{15,16}. Recientemente, ha sido demostrado que organoides hepáticos 3D construidos con hepatoblastos humanos primarios son capaces de mantener la expansión de las células madre/progenitoras hematopoyéticas *in vitro*¹⁷. Sin embargo, el acceso a esta fuente es bastante limitado, así como su expansión *in vitro* no es nada fácil. Por ello, el objetivo de esta tesis es la expansión de las células madre/progenitoras hematopoyéticas procedentes de cordón umbilical mediante el uso de organoides hepáticos fetales humanos, empleando hepatoblastos derivados de células embrionarias humanas en cultivos 3D.

Con el fin de alcanzar ese objetivo, la tesis fue dividida en tres capítulos:

- 1- Estudiar qué proteínas presentes en la matriz extracelular fetal promueven la expansión y diferenciación de las células madre/progenitoras hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario en el hígado fetal. Para ello, se llevó a cabo un estudio proteómico comparativo sobre la matriz extracelular descelularizada de hígados porcinos fetales y adultos.
- 2- Desarrollar y caracterizar hepatoblastos humanos derivados de células embrionarias humanas, capaces de ser expandidos *in vitro* en 3D.
- 3- Expansión de células madre/progenitoras hematopoyéticas procedentes de cordón umbilical mediante el uso de organoides hepáticos fetales humanos.

Los resultados obtenidos a lo largo de la tesis nos sugieren:

1. El estudio proteómico de las matrices extracelulares fetales y adultas demostró la presencia significativa de diversas proteínas, las cuales podrían tener diferentes papeles e implicaciones sobre la hematopoyesis fetal en el hígado.
2. Los hepatoblastos generados a partir de las células embrionarias humanas demostraron ser capaces de retener de manera estable el fenotipo típico de este tipo celular, manifestaron ser células bipotenciales con la habilidad de diferenciarse a células hepatocíticas y células colangiocíticas y mostraron su habilidad para expresar factores de crecimiento hematopoyéticos específicos.
3. Los organoides hepáticos (fetales) humanos de bioingeniería demostraron tener un papel importante en el mantenimiento de las célula madre hematopoyéticas y de los progenitores eritropoyéticos.

Bibliografía

1. Ballen, K.K., Spitzer, T. R. The great debate: haploidentical or cord blood transplant. *Bone marrow transplantation* **46**, 323-329 (2011).
2. Ballen, K.K., Koreth, J., Chen, Y. B., Dey, B. R., Spitzer, T. R. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood* **119**, 1972-1980 (2012).
3. Tung, S.S., Parmar, S., Robinson, S. N., De Lima, M., Shpall, E. J. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best practice & research. Clinical haematology* **23**, 245-257 (2010).
4. Dahlberg, A., Delaney, C. & Bernstein, I.D. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **117**, 6083-6090 (2011).
5. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., et al.,. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* **321**, 1174-1178 (1989).
6. Dahlberg, A., Delaney, C., Bernstein, I. D. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **117**, 6083-6090 (2011).
7. Broxmeyer, H.E. Insights into the biology of cord blood stem/progenitor cells. *Cell Prolif* **44 Suppl 1**, 55-59 (2011).
8. da Silva, C.L., Goncalves, R., Crapnell, K. B., Cabral, J. M., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol* **33**, 828-835 (2005).
9. McNiece, I., Harrington, J., Turney, J., Kellner, J., Shpall, E. J. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **6**, 311-317 (2004).
10. Almeida-Porada, G., Brown, R. L., MacKintosh, F. R., Zanjani, E. D. Evaluation of serum-free culture conditions able to support the ex vivo expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model. *J Hematother Stem Cell Res* **9**, 683-693 (2000).
11. Choi, Y.S., Lim, D. S., Lim, S. M., Kim, D. I. Effects of mixed feeder cells on the expansion of CD34 cells. *J Biosci Bioeng* **113**, 389-394 (2012).
12. Tiwari, A., Tursky, M. L., Mushahary, D., Wasnik, S., Collier, F. M., Suma, K., Kirkland, M. A., Pande, G. Ex vivo expansion of haematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood on acellular scaffolds prepared from MS-5 stromal cell line. *J Tissue Eng Regen Med* (2012).
13. Mortera-Blanco, T., Mantalaris, A., Bismarck, A., Aqel, N., Panoskaltsis, N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials* **32**, 9263-9270 (2011).
14. Morrison, S.J., Hemmati, H. D., Wandycz, A. M., Weissman, I. L. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10302-10306 (1995).
15. Brummendorf, T.H., Dragowska, W. & Lansdorp, P.M. Asymmetric cell divisions in hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* **872**, 265-272; discussion 272-263 (1999).
16. Mikkola, H.K. & Orkin, S.H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733-3744 (2006).
17. Mokhtari, S., et al. Evaluating Interaction of Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor Cells with Functionally Integrated Three-Dimensional Microenvironments. *Stem cells translational medicine* **7**, 271-282 (2018).

ABREVIATURAS

AFP	α -Fetoproteína
AGM	Aorta-gónada-mesonefros
ALAT	Alanina aminotransferase
ALB	Albúmina
ANG	Angiopoyetina
ASAT	Amino aspartato transferasa
BFU-E	Unidad formadora de brote-eritrocíticas
BM	Médula ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
CAR	Célula reticular abundante
CDM	Medio de diferenciación colangiocítica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia o complementario
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritrocíticas
CFU-GEMM	Unidad formadora de colonias granulocíticas, eritrocíticas, macrofágicas y megacariocíticas
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulocíticas y macrofágicas
CFU-Meg	Unidad formadora de colonias megacariocíticas
CK	Citoqueratina
CLP	Progenitor linfoide común
CMP	Progenitor mieloide común
COL	Colágeno
CV	Vena cava
CXCR4	Receptor de quimioquinas C-X-C 4
DAPI	<i>4',6-diamino-2-fenilindol</i>

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Células endoteliales
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EL	Elastina
EM	Medio de expansión
EpCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
EPO	Eritropoyetina
ESC	Células madre embrionaria
FC	Citometría de flujo
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
FL	Hígado fetal
FIt-3L	Ligando <i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FN	Fibronectina
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GF	Factor de crecimiento
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GMP	Progenitor granulocito-macrófago
GvHD	Enfermedad del injerto contra el huésped
GvT	Injerto contra tumor

H&E	Hematoxilina y eosina
HA	Arteria hepática
HB	Hepatoblastos
HDM	Medio de diferenciación hepatocítica
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
HpFEC	Células fetales hepáticas estromales
HpSC	Célula madre hepática
HSC	Célula madre hematopoyética
HSCT	Trasplante con células madre hematopoyéticas
HSPC	Células madre/progenitoras hematopoyéticas
hUVEC	Células endoteliales humanas de cordón umbilical
HV	Vena hepática
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular
ICV	Vena cava inferior
IDA	Información dependiente de la adquisición
IF	Inmunofluorescencia
IGF-2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
IL	Interleuquina
iPSC	Célula madre pluripotente inducida
Laminina	LN
LDH	Lactato deshidrogenasa
LTC-IC	Cultivos de células iniciadoras de cultivos a largo plazo

LT-HSC	Células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a largo plazo
LT-SRC	Células repobladoras de ratones SCID a largo plazo
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEP	Progenitor megacariocito-eritroide
MG GFR	Matrigel con factores de crecimiento reducidos
MG	Matrigel
MLP	Progenitor multipotente linfoide
MNC	Célula mononucleada
MPP	Progenitor multipotente
MSC	Células madre mesenquimales
NCAM	Moléculas de adhesión de células neuronales
NK	<i>Natural killer</i>
NOD/SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PB	Sangre periférica
PBS	Solución tamponada con fosfatos
PFA	Para-formaldehido
PSC	Célula madre pluripotente
PV	Vena porta
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RBC	Glóbulos rojos
REDMO	Registro español de donantes de médula ósea
RNA	Ácido ribonucleico

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RQI	Indicador de la calidad del ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	Reacción en cadena reversa con transcriptasa inversa
SC	Célula madre
SCF	Factor de células madre
SCID	Diabético no obeso/Inmunodeficiencia severa combinada
SDF-1	Factor derivador de células estromales 1
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNO	Osteoblastos <i>spindle-shaped N</i>
SRC	Células repobladoras de ratones SCID
ST-HSC	Células madre hematopoyéticas con capacidad de autorrenovación a corto plazo
ST-SRC	Células repobladoras de ratones SCID a corto plazo
TEPA	Tetraetilenpentamina
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNC	Células nucleadas totales
TPO	Trombopoyetina
UA	Arteria umbilical
UC	Cordón umbilical
UCB	Sangre de cordón umbilical
UV	Vena umbilical
VA	Arteria vitelina

VEGF Factor de crecimiento vascular endotelial

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades Hematológicas

Las enfermedades hematológicas son un grupo muy heterogéneo de diversa incidencia, pronóstico y etiología.

1.1 Tipos de Neoplasias Hematológicas

Las neoplasias hematológicas pueden afectar al tejido linfoide, médula ósea (BM) y/o sangre. Las neoplasias hematológicas se pueden clasificar en neoplasias mieloides y neoplasias linfoides.

- Neoplasias mieoloides
 - Neoplasia mieloproliferativa crónica: se caracteriza por un incremento en la producción de glóbulos rojos, blancos o plaquetas debido a la presencia de un mayor número de células madre sanguíneas.
 - Síndrome mielodisplásico: se trata de un trastorno adquirido de la BM en el cual las células normales son sustituidas por una clona displásica incapaz de madurar.
 - Leucemia aguda no linfocítica: se caracteriza por la proliferación anormal de células inmaduras no linfocíticas.
- Neoplasias linfoides
 - Leucemia linfocítica crónica: se caracteriza por la producción descontrolada de glóbulos blancos atípicos.
 - Linfoma: se clasifica en Linfoma de Hodgkin y en Linfoma no Hodgkin. Ambos se caracterizan por la producción anormal de linfocitos. Sin embargo, en el linfoma de Hodgkin se debe demostrar la presencia de un tipo de linfocitos anormales denominados células de Reed Sternberg.
 - Neoplasia de células plasmáticas: se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas anormales en la BM.
 - Leucemia linfocítica aguda: se caracteriza por un incremento en la producción de linfocitos.

1.2 Tipos de Enfermedades Hematológicas no oncológicas

Las enfermedades hematológicas no oncológicas son enfermedades de una etiología muy diversa. Pueden estar producidas por una alteración genética, por la falta de algún

mineral o vitamina, por la alteración de algún mecanismo que regule la absorción de minerales o vitaminas o por la producción de anticuerpos contra los glóbulos rojos, blancos, plaquetas o factores de coagulación.

Se pueden clasificar en cuatro categorías: enfermedades de los glóbulos rojos (talasemia, anemias...), enfermedades de los glóbulos blancos (leucopenia, leucocitosis...), enfermedades de las plaquetas (plaquetopenia, trombocitosis...) y enfermedades del plasma (alteración del metabolismo del hierro, de los factores de coagulación o presencia de anticuerpos).

1.3 Tratamientos y Actualidad

El cáncer hematológico es el quinto cáncer más frecuente. Supone entre el 8-10% de todos los tumores malignos, por lo que es la segunda causa de muerte por tumores malignos. Los más comunes son la leucemia, el linfoma y el mieloma.

Mientras que hace unos 30 años sólo se curaban entre el 10-15% de los cánceres hematológicos, en la actualidad la tasa de curación ronda el 50%. No obstante, por cada 100.000 habitantes, 36 son diagnosticados de enfermedades hematológicas malignas cada año en la UE, Noruega, Islandia y Suiza, lo que conlleva a unas 100.000 muertes al año.

Actualmente, los medicamentos para combatirlo abren una nueva esperanza para estos pacientes donde la inmunoterapia se encuentra a la cabeza. Hoy en día, hay en marcha más de 100 ensayos clínicos con receptores de antígeno quimérico. Hasta el momento, esta terapia se ha mostrado efectiva en la leucemia aguda linfoblástica de células B, en el linfoma no Hodgkin B agresivo y en la leucemia linfática crónica. En 2017, la Administración de alimentos y medicamentos aprobó el uso de esta terapia para el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este tipo de terapia puede causar efectos secundarios preocupantes y algunas veces fatales, como por ejemplo, el síndrome de liberación de citoquinas o la muerte en masa de las células B.

En 2017 nació Harmony, como el primer proyecto europeo dedicado a las neoplasias hematológicas. En esta plataforma está previsto que se vuelquen, de manera anónima,

millones de datos clínicos de los pacientes sobre su evolución y tratamiento. Este programa abarca siete grupos de trabajo, uno por cada tipo de neoplasia: leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin y neoplasias hematológicas pediátricas. Con todo ello, se espera poder afinar en las estrategias contra los tumores hematológicos, basándose en el concepto de medicina personalizada.

Sin embargo, cuando las terapias fallan o directamente no existen, el trasplante sigue siendo la única salida para pacientes tanto con enfermedades hematológicas malignas (leucemias agudas, síndromes mieloproliferativos crónicos, síndromes linfoproliferativos, gammapatías monoclonales) como no malignas (insuficiencias medulares). Desde que en 2013 se pusiera en marcha el Plan Nacional de Médula Ósea, las donaciones han aumentado más de un 216% gracias a la existencia de más de 340.000 voluntarios registrados.

2. Trasplante con Células Madre Hematopoyéticas

El trasplante con células madre hematopoyéticas (HSCT) consiste en la infusión intravenosa de células madre hematopoyéticas (HSC) y de células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPC), con el fin de reconstituir el sistema hematopoyético en pacientes con una gran variedad de enfermedades hematológicas malignas y no malignas. Entre ellas se encuentran tumores malignos hematológicos (leucemia, linfoma y mieloma), trastornos de la BM adquiridos no malignos (anemia aplásica) y enfermedades genéticas (talasemia, anemia de células falciformes e inmunodeficiencia combinada grave).

Aunque actualmente, el HSCT proporciona una salida a una gran variedad de enfermedades hematológicas, alrededor del 70% de los pacientes no poseen un donante hermano antígeno leucocitario humano compatible (HLA)¹. Además, la gran diversidad existente en cuanto a los orígenes raciales y étnicos de los respectivos pacientes hace más complicado identificar un donante no emparentado compatible, por lo que es casi imposible llevar a cabo la intervención en un tiempo razonable².

2.1 Tipos de donante

En la actualidad existen unas indicaciones generales establecidas para cada tipo de trasplante, por lo que la elección de uno u otro depende de varios factores. De esta manera el equipo médico valora cuidadosamente el caso y en función del tipo de enfermedad, disponibilidad de un donante compatible, edad y estado del paciente, se recomienda un tipo de trasplante.

- Donante hermano y otros familiares

Dado que todo individuo hereda la mitad de los antígenos HLA de su padre y la otra mitad de su madre, las probabilidades de encontrar un donante hermano compatible son mayores. Esta compatibilidad se valora mediante el estudio HLA presentes en la superficie de todas las células del organismo. Para considerar a un hermano compatible se debe demostrar la coexistencia de 6 antígenos leucocitarios (A, B y DRB1). La probabilidad de que padres o hijos sean compatibles con el paciente es realmente baja, sin embargo, de igual manera se realiza el estudio. En el caso del trasplante entre gemelos homocigotos (trasplante singénico), al no existir diferencias genéticas ni inmunológicas entre ellos no existe la posibilidad de la enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD) por lo que no se requiere inmunosupresión. No obstante, existe una mayor probabilidad de recaída ya que no se produce ningún efecto injerto contra tumor (GvT).

- Donante no emparentado

En el caso de no disponer un hermano emparentado y requerir un trasplante alogénico, se puede recurrir a un trasplante de un donante no emparentado compatible. El grado de compatibilidad entre el donante y el receptor marca el resultado de un trasplante alogénico por que se requiere una coincidencia de 9/10 o 10/10 de los antígenos HLA (A, B, C, DRB1 y DQB1).

- Paciente

Este tipo de trasplante se denomina trasplante autólogo (autotrasplante), ya que el donante es el propio paciente. Una vez recolectadas las células a través de la BM o mediante aféresis, las células vuelven a ser reinfundidas en el paciente tras un tratamiento intensivo de quimioterapia y/o radioterapia ablativa. Al ser células del

propio paciente, no existe la posibilidad de rechazo tras el trasplante. Sin embargo, las principales preocupaciones que conlleva este tipo de trasplante son la calidad variable de las células recolectadas, el mayor aumento en el porcentaje de recaída por enfermedad mínima residual y la no existencia del efecto GvT.

- Trasplante haploidéntico

Este tipo de trasplante es llevado a cabo a partir de un donante 50% compatible (padres, hijos, primos...). Hace años esta modalidad de trasplante era muy compleja debido al elevado riesgo de GvHD, sin embargo, en la actualidad gracias al desarrollo de nuevos métodos para la eliminación de las poblaciones T causantes de la GvHD, los resultados obtenidos van mejorando día a día.

El trasplante alogénico consiste en la sustitución de la población anómala del paciente por una “normal” procedente de un donante sano procedente de su misma especie, ya sea entre hermanos compatibles, no compatibles o haploidénticos. Una de las principales ventajas en este tipo de trasplantes es el efecto GvT, donde los linfocitos T del donante completan la acción de la quimio-radioterapia eliminando las células neoplásicas residuales en el organismo del paciente. No obstante, los linfocitos T del donante además de reconocer como extrañas las células tumorales residuales también pueden reconocer como extrañas las células del propio organismo del paciente, por lo que se puede desencadenar la complicación más temida en los trasplantes alogénicos, el GvHD.

2.2 Tipos de acondicionamiento

El acondicionamiento es el tratamiento que recibe el paciente para eliminar, al máximo posible, sus células enfermas y preparar, al mismo tiempo, su organismo para la recepción de las células del donante.

- Tratamiento convencional o mieloablativo

Consiste en la administración de fuertes dosis de quimioterapia y/o radioterapia para destruir todas las células cancerosas y suprimir el sistema inmunológico del paciente, reduciendo de esta manera las posibilidades de rechazo.

- Tratamiento no mieloablativo

Para algunas personas el tratamiento mieloablativo puede no ser la mejor opción de acondicionamiento, ya que como consecuencia de la edad o de otras afecciones de salud pueden sufrir mayores riesgos al eliminarles todas las células de la BM. Por ello, en estos pacientes se usa un tipo de alotrasplante denominado minitrasplante (trasplante no mieloablativo). Se emplea quimioterapia y/o radioterapia de menor intensidad, menos tóxica, por lo que las células del paciente y las del donante conviven por un periodo de tiempo. Con el transcurso de los meses, las células del donante toman el dominio de la BM desplazando a las del paciente (GvHD). Para reforzar este efecto se administra al paciente una inyección con glóbulos blancos del donante. Sin embargo, puede que este tipo de estrategia no funcione bien en pacientes con demasiadas células cancerosas o en cánceres de rápido crecimiento.

2.3 Tipos de trasplante según la fuente

Las HSC y HSPC se pueden obtener directamente de la BM, sangre periférica (PB) y cordón umbilical (UC) (Figura 1). La fuente tradicional de HSC y HSPC para el uso de trasplante alogénicos ha sido la BM, sin embargo, el uso reciente de la PB como fuente de estas células ha reemplazado a la BM en una proporción bastante significativa en los trasplantes alogénicos³.

Fuentes de Células Madre Hematopoyéticas

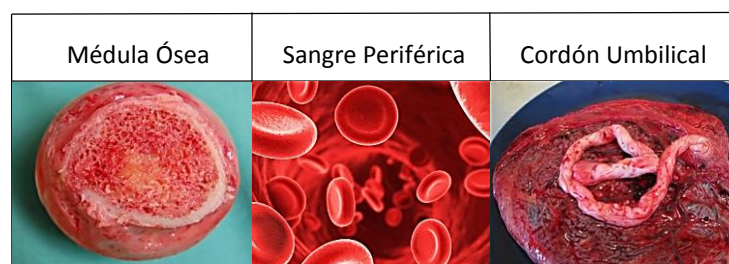


Figura 1: Fuentes de HSC.

- Médula Ósea

Consiste en la extracción de HSC y HSPC procedentes de la BM del donante mediante reiteradas punciones aspirativas. Tras cada aspiración, a nivel de las crestas ilíacas anteriores y posteriores, se vierte el aspirado en un recipiente con medio de cultivo y heparina para evitar cualquier signo de coagulación. A continuación, se pasa a través de

unos filtros y se obtiene una suspensión celular homogénea. Por último, se traspara a unas bolsas de transfusión, en condiciones asépticas, y se infunden al paciente mediante vía intravenosa. El número de células nucleadas totales (TNC) y HSPC obtenidas oscila entre los $3\text{-}5 \times 10^8$ TNC/kg y 3×10^6 HSPC/kg, lo que corresponde a 10 mL/kg del paciente⁴. Esta cantidad representa entre el 1-5% del volumen total de la BM, por lo que no resulta en ninguna alteración sobre el recuento linfocitario ni plaquetario del donante. El procedimiento de esta técnica quedó establecida en 1970 gracias a Thomas y Storb⁵. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes existente aún hoy en día es la manera de obtención, ya que requiere la hospitalización del donante para someterle a una intervención quirúrgica bajo anestesia general. Como alternativa a ello, actualmente las células hematopoyéticas se pueden obtener mediante movilización a la PB y mediante el uso de sangre de cordón umbilical (UCB).

- Sangre periférica

En condiciones normales la cantidad de HSC y HSPC en PB es realmente baja ($0,5\text{-}5$ CD34⁺/uL), por lo que es necesario el empleo de métodos de movilización desde la BM a la PB. Mediante un proceso ambulatorio denominado aféresis, se recolectan las HSPC del donante las cuales han sido movilizadas gracias a la administración del factor de crecimiento granulocitario (G-CSF) durante 4 o 5 días antes de la intervención. Una de las principales ventajas de este procedimiento es la fácil accesibilidad a la fuente, así como la mayor cantidad de progenitores obtenidos, reduciendo de esta forma el periodo de neutropenia asociada al acondicionamiento. Para garantizar el éxito del trasplante no está del todo claro la cantidad de células CD34⁺ necesarias, ya que depende de la enfermedad de base. Sin embargo, se recomienda 5×10^6 CD34⁺/kg del receptor⁶, lo que se traduce en la realización de 1 a 2 aféresis. El trasplante de HSC y HSPC de PB, que nació inicialmente como una alternativa al trasplante de BM autólogo en pacientes con BM defectuosas, se ha convertido en el método de elección en muchos casos tanto para trasplantes de BM autólogos como para trasplantes alogénicos. Aunque se ha postulado que las HSC de PB se encuentran en un estado más diferenciado que las de BM, éstas han demostrado tener mayor rapidez de injerto en el trasplante autólogo⁷. La principal preocupación de este tipo de trasplantes era el posible aumento

de incidencia de la GvDH debido al mayor número de células T infundidas. Sin embargo, con el uso de anticuerpos monoclonales se ha conseguido minimizar el problema.

- Sangre de cordón umbilical

Tras ser clampado y cortado el UC, la UCB se obtiene mediante canulación de la vena umbilical (UV). Se trata de una técnica simple, no invasiva y compatible con la práctica obstétrica rutinaria. El volumen recolectado varía de un cordón a otro, pero suele oscilar entre los 30 y 150 mL. La UCB es criopreservada en las 24 horas siguientes a la recogida, y almacenada en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. En comparación con la BM y PB, la UCB posee un mayor porcentaje de HSPC inmaduros como consecuencia de su autorrenovación y de su mayor capacidad proliferativa^{8,9}. Además, el empleo de esta fuente tiene una serie de ventajas en comparación con las dos anteriores. Una de ellas es un menor requerimiento de compatibilidad entre donante y receptor. Esto se debe a la pureza de los progenitores hematopoyéticos, por lo que se acepta una coincidencia de 4/6, 5/6 o 6/6 de los antígenos leucocitarios HLA-A, HLA-B y DRB1 entre el donante y receptor. Por ello, la rápida disponibilidad de unidades de cordón hace que se convierta en la única alternativa para aquellos pacientes que sin la existencia de un donante emparentado necesitan recibir de manera urgente un alotrasplante. El tiempo requerido para encontrar un donante no relacionado HLA compatible de BM oscila alrededor de los 49 días, mientras que el de UCB es de 19 días¹⁰. Por otro lado, la probabilidad de GvDH se ve reducida debido a la inmadurez de los linfocitos presentes, por lo que la respuesta citotóxica de los linfocitos T es prácticamente nula. Asimismo, la posibilidad de transmisión de infecciones es mínima. Sin embargo, la baja dosis de HSC y HSPC por unidad de cordón está relacionada con un retraso en la recuperación hematopoyética¹¹. Las dosis reportadas de células mononucleadas (MNC) para trasplantes varían en función del receptor. Para adultos se recomienda $1,6-1,7 \times 10^7$ MNC/kg¹², mientras que para pacientes pediátricos este valor oscila entre $0,24-3,6 \times 10^8$ CMN/kg¹³. Por su parte, una unidad de UCB contiene alrededor de $1-8 \times 10^6$ CD34⁺.

En España hay siete Bancos públicos de UCB (Madrid, Barcelona, Galicia, Andalucía, Valencia, Canarias y País Vasco) y, desde la aprobación del antiguo RD 1301/2006 (actualmente sustituido por el RD Ley 9/2014), existen Bancos privados los cuales permiten almacenar unidades de UCB para un uso eventual autólogo. En la actualidad

Aragón está inscrito en el Programa Concordia. Se trata de un programa cooperativo interterritorial para la donación de UCB, el cual se basa en una relación de confianza entre el Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya y los Departamentos de Salud de otras Comunidades Autónomas: Baleares, Aragón, Navarra, Extremadura y Cantabria, y el Principat d'Andorra. Dispone de más de 20.000 unidades de UCB de alta calidad que se encuentran disponibles en los registros nacionales e internacionales para cualquier paciente que las necesite. De esta manera, el 30% de las unidades presentes en bancos españoles han sido empleadas en territorio nacional, mientras que un 48% han sido destinadas a otros países europeos, un 18% a Norteamérica y un 9% a Sudamérica. El Plan Nacional de UCB estimó que debían almacenarse en España alrededor de unas 60.000 unidades. Esta cifra se estableció como óptima a la hora de poder localizar una unidad compatible para cualquier paciente español que necesite un trasplante de UCB. Hoy en día España es, tras Estados Unidos, el país que más unidades posee. Cuando un paciente requiere de un trasplante el Registro Español de Donantes de Médula Ósea (REDMO) lleva a cabo una búsqueda tanto de donantes de BM como de unidades de UCB en territorio nacional e internacional. De este modo, todas las unidades de UCB almacenadas en bancos autólogos que se encuentren ubicados dentro del territorio español quedan a disposición del REDMO y pueden ser utilizadas para tratar a cualquier paciente que necesite un trasplante de UCB. Debido a la legislación vigente si las unidades de UCB se encuentran almacenadas en España y son requeridas para llevar a cabo un trasplante, la familia se ve en la obligación de cederlas. Por ello, los bancos privados suelen recoger la sangre en el momento del nacimiento, transportarla y almacenarla en otros países donde no está permitido el poder reclamarla, convirtiéndose así de uso exclusivo.

Desde que en 1988 se llevó a cabo el primer trasplante en un niño afectado con anemia de Falconi¹⁴, poco a poco este tipo de trasplante se ha ido consolidando como una alternativa viable. El uso de esta fuente ha incrementado las posibilidades de encontrar donantes compatibles, ya que como se ha comentado anteriormente este tipo de trasplantes posee un menor riesgo a la hora de inducir GvDH y puede ser empleado incluso cuando solo existe una coincidencia parcial entre el donante y el receptor, reduciendo de esta manera las probabilidades de transmitir infecciones virales.

Actualmente, el uso de la UCB en trasplantes se está viendo aumentado como resultado de la falta de donantes para trasplantes alogénicos. Sin embargo, el fracaso del injerto sigue siendo una de las mayores preocupaciones debido en gran parte a la baja celularidad presente en una unidad de UCB. Solo una minoría de pacientes adultos posee una unidad de UCB con una celularidad adecuada^{15,16}. Con el objetivo de solventar esta limitación, otras estrategias han sido empleadas como la infusión intraósea de células de UCB, la activación de receptores relacionados con la migración celular, la expansión de estas células sanguíneas o el uso de dos unidades de UCB¹⁵⁻¹⁷. No obstante, cuando dos o más unidades de UCB son trasplantadas en un mismo paciente es muy común que solamente una se injerte, a lo que hay que sumar la disminución de velocidad de injerto y la mayor incidencia de GvDH¹⁵⁻¹⁷. Hay que tener en cuenta que la administración de dos o más unidades de UCB lleva asociado consigo un aumento sustancial de los costos, por lo que una posible solución para mejorar los resultados y aumentar la aplicabilidad del trasplante de UCB es a través de la expansión de estas células¹⁸. Así, una de las estrategias que se está estudiando es la de poder expandir una parte de estas células antes de realizar el trasplante. Mientras que en estas tres últimas décadas ha habido un gran avance en cuanto a la expansión de las HSC, todavía no existe a día de hoy un método estandarizado para su expansión *ex vivo*. No obstante, los avances realizados durante los últimos años sobre la biología de las células madre (SC) hace pensar que la expansión *ex vivo* de las HSC humanas será posible en un futuro no muy lejano. Por todo ello, a pesar de los progresos en cuanto a la expansión de las HSC y HSPC *ex vivo* se refiere, la baja celularidad presente, así como la lenta velocidad de renovación, excluye de momento su uso en adolescentes y por consiguiente en adultos^{19,20}.

3. Célula Madre

Una SC es aquella que se caracteriza por tener la capacidad ilimitada de autorrenovación, división y diferenciación en otros tipos celulares maduros²¹. Mediante un proceso de división asimétrica una SC da lugar a dos células hijas, una de las cuales tiene las mismas propiedades y características que la SC original mientras que la otra,

mediante un proceso de determinación, se diferencia en distintos tipos celulares especializados (Figura 2).

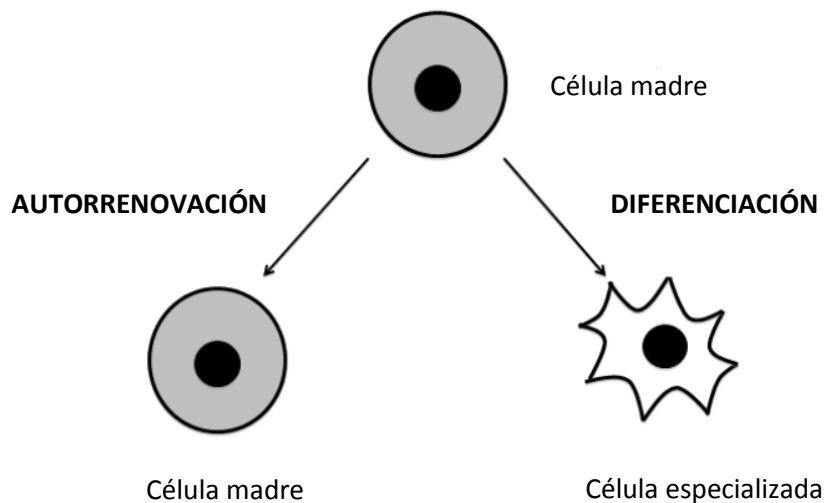


Figura 2: División asimétrica de una SC.

Las SC pueden ser clasificadas en función de su potencia:

- Célula madre totipotente: es aquella célula que puede dar lugar a un organismo completo, tanto a los componentes embrionarios (las tres capas embrionarias) como a los extraembrionarios (placenta). La SC totipotente por excelencia es el cigoto.
- Célula madre pluripotente (PSC): es aquella célula que da lugar a cualquier célula perteneciente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo).
- Célula madre multipotente: es aquella célula que solo puede generar células de su misma capa embrionaria.
- Célula madre unipotente: es aquella que solo puede producir un tipo celular.

Además, las SC se pueden clasificar en función de su origen.

- Célula madre embrionaria (ESC): es aquella célula que forma parte de la masa celular interna de un embrión de 4-5 días. Estas SC son células pluripotentes ya que pueden dar origen a las tres capas germinales. Fueron obtenidas por primera vez de la masa celular interna de un blastocito de ratón²² y en 1998 fueron derivadas de humano²³.

- Célula madre adulta: es aquella célula que se encuentra en los tejidos y órganos adultos, y puede dar lugar a las células adultas del tejido en el que se localizan.

Debido a los problemas éticos que conllevaba y conlleva trabajar con ESC, se intentaron conseguir poblaciones de PSC a partir de células somáticas, utilizando para ello alguno de los factores de transcripción que sobreexpresaban las ESC. Estas células denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSC) fueron obtenidas mediante un proceso de reprogramación celular, en el cual Takahashi y Yamanaka demostraron que solo era necesario la transfección de 4 factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4, y c-Myc) en fibroblastos adultos de ratón²⁴. Un año más tarde, en 2007, fue posible reprogramar fibroblastos adultos humanos empleando los mismos factores de transcripción descritos anteriormente para fibroblastos adultos de ratón²⁵. Ese mismo año Yu *et al.* demostraron que la combinación de Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 era más que suficiente para reprogramar células somáticas humanas en PSC²⁶.

Diferentes estudios de expresión génica y de modificación de histonas han revelado que las iPSC y las ESC son células con un alto grado de similitud en su expresión génica, en la reactivación del cromosoma X y en la actividad de la telomerasa²⁷⁻³⁰. Sin embargo, las principales diferencias entre ellas se localizan a nivel epigenético^{31,32}. Por su parte, la mejora continua en la generación de iPSC está haciendo que su uso se haya incrementado tanto para la obtención de nuevos candidatos, modelaje de enfermedades y cribado de fármacos así como para su uso en medicina regenerativa y terapia celular. Teóricamente, la obtención de iPSC a partir de células autólogas reduciría las probabilidades de rechazo inmunitario. No obstante, la baja eficiencia de reprogramación de las iPSC así como los riesgos relacionados con la aparición de teratomas hace que su implementación en medicina regenerativa sea un poco complicado³³.

Por lo tanto, en la actualidad las células PSC (ESC e iPSC) se han convertido en unos candidatos perfectos para la generación de distintos modelos *in vitro* con el objetivo de estudiar diversos aspectos embriológicos, celulares, moleculares y/o toxicológicos.

4. El Sistema Hematopoyético

4.1. Estructura del sistema hematopoyético

La hematopoyesis consiste en la producción y mantenimiento de las células sanguíneas. Se trata de un sistema altamente jerarquizado donde un número reducido de PSC denominadas HSC son capaces de dar lugar a todos los linajes hematopoyéticos (Figura 3).

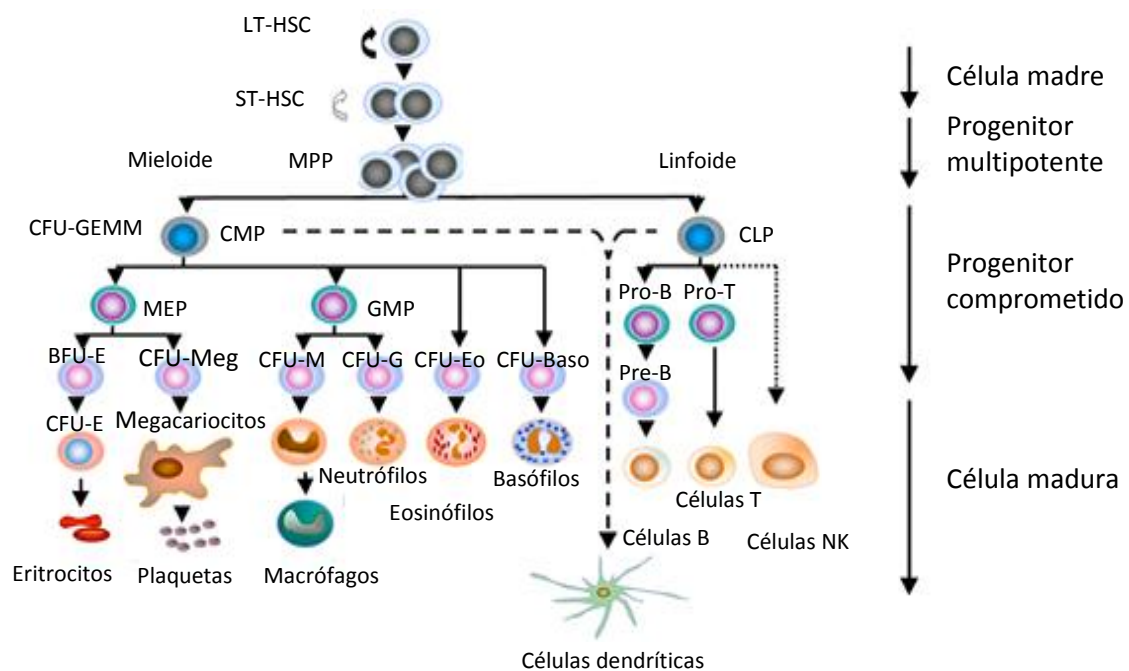


Figura 3: Jerarquía del sistema hematopoyético.

El sistema hematopoyético se compone de dos líneas de diferenciación: la línea mieloide compuesta por eritrocitos, monocitos, granulocitos y megacariocitos y la línea linfóide formada por linfocitos T, linfocitos B y células *natural killer* (NK).

El tejido hematopoyético se puede clasificar también en:

- Compartimento de células madre: son células morfológicamente irreconocibles, multipotentes, con elevada capacidad de autorrenovación y baja tasa de proliferación.
- Compartimento de progenitores comprometido: son células morfológicamente irreconocibles con una elevada capacidad proliferativa pero con una baja capacidad de autorrenovación. En este estadio, el futuro de cada tipo celular ya

se encuentra definido dando lugar a una progenie homogénea³⁴. La estimulación con ciertos factores solubles en ensayos clonogénicos, da lugar a la formación de colonias con una morfología características^{35,36}, permitiendo su clasificación en:

- Precusores eritroides primitivos (BFU-E) y comprometidos (CFU-E)³⁷
 - Precusores gránulo-macrofágicos (CFU-GM)^{38,39}
 - Precusores megacariocíticos (CFU-Meg)⁴⁰⁻⁴²
- Células de morfología reconocible: incluye células en maduración y células maduras funcionales. Se caracterizan por tener una nula o baja capacidad de proliferación y autorrenovación.

La frecuencia de las HSC en la BM adulta humana es realmente baja oscilando alrededor del 0,01%⁴³, donde la mayoría de estas células se encuentran en un estado quiescente (G₀). Existen diferentes ensayos cuyo objetivo era la identificación de esta población celular *in vitro*, como los cultivos de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC)⁴⁴ y las células formadoras de áreas de empedrado⁴⁵. Inicialmente se creyó que la HSC era la unidad formadora de colonias esplénicas en ratones irradiados y trasplantados con células hematopoyéticas. Sin embargo, el ensayo que actualmente mejor define a una HSC es el ensayo de repoblación competitiva⁴⁶. En él, se pretende la reconstitución hematopoyética a largo plazo de receptores trasplantados, los cuales anteriormente han sido tratados con altas dosis de radiación. Para ello los ratones son trasplantados con una mezcla de células congénicas. De esta manera, si una de las dos poblaciones posee un potencial de repoblación superior a la otra, se observará una predominancia de esa población en los receptores trasplantados⁴⁶⁻⁴⁸.

Actualmente no existe ningún marcador específico y exclusivo de las HSC, sin embargo, sí que se ha descrito la expresión de ciertas proteínas de membrana las cuales pueden ser empleadas como marcadores de HSPC (Tabla 1). El marcador más conocido para la identificación de HSPC es la glucoproteína de superficie celular CD34, ausente en las células sanguíneas maduras. La mayoría de las células CD34⁺ no expresan los llamados marcadores de linaje (Lin) expresados en células sanguíneas maduras (CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b y CD235). La población de células CD34⁺ es bastante heterogénea en la expresión de otros marcadores como CD38, CD45RA, CD90 y CD49f, diferenciándolas en su potencial de reconstitución hematopoyética. Para

el estudio de las HSC humanas es bastante recurrente el uso de modelos de xenotrasplante donde estas células son introducidas en ratones inmunodeficientes. De esta manera, las células que fueron capaces de reconstituir la hematopoyesis en ratones con el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID) pasaron a ser llamadas células repobladoras de ratones SCID (SRC)^{49,50}. Además, desde los primeros estudios se demostró la importancia que tenía el marcador CD34^{51,52}. Posteriormente, se identificaron dos poblaciones: CD34⁺CD38⁻ y linCD34⁻CD38⁻, las cuales poseían capacidad SRC⁵³ y donde linCD34⁻CD38⁻ era una población celular más primitiva que CD34⁺CD38⁻. Un estudio más a fondo de la fracción celular con capacidad SRC, reveló la presencia de dos poblaciones celulares: células con capacidad de repoblación a corto plazo (ST-SRC) y células con capacidad de repoblación a largo plazo (LT-SRC)⁵⁴.

Subconjunto Celular	Marcadores
Célula Madre Hematopoyética (HSC)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻ CD90 ⁺ CD49f ⁺
Progenitor Multipotente (MPP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻ CD90 ⁺ CD49f ⁺
Progenitor Multipotente Linfoide (MLP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁺ CD90 ⁻
Progenitor Mieloide Común (CMP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁻
Progenitor Megacariocito-Eritroide (MEP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{lo} CD45RA ⁻
Unidad formadora de colonias megacariocíticas (CFU-Meg)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD45RA ⁻
Unidad formadora de brote-eritrocíticas (BFU-E)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁻
Progenitor Granulocito-Macrófago (GMP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ⁺ CD45RA ⁺
Progenitor Linfoide Común (CLP)	Lin ⁻ CD34 ⁺ CD38 ^{-/lo} CD45RA ⁺ CD90 ⁻

Tabla 1: Marcadores de los distintos subconjuntos celulares del sistema hematopoyético.
Fuente: STEMCELL Technologies.

Como se ha comentado anteriormente, la funcionalidad de las SC adultas es dar soporte al tejido en el que se encuentran. Sin embargo, en los últimos años ha surgido el término de plasticidad⁵⁵⁻⁵⁸, por el cual las HSC pueden dar lugar a otros tipos celulares de diferentes tejidos adultos como músculo esquelético^{59,60}, músculo cardíaco⁶¹, hígado^{58,62,63} o tejido epitelial⁶⁴. Este fenómeno conocido como transdiferenciación

ocurre en situaciones extraordinarias con una frecuencia muy baja. No obstante, ciertos autores señalan que este proceso no es más que el resultado de la fusión de células hematopoyéticas con células diferenciadas procedentes de los tejidos diana⁶⁵⁻⁶⁹.

4.2. Ontogenia del sistema hematopoyético

Se denomina nicho al área específica de un tejido en el cual residen las poblaciones de SC. Estos nichos proporcionan el microambiente necesario tanto como para el mantenimiento de las mismas mediante autorrenovación como para su activación y consiguiente diferenciación²¹.

Durante el desarrollo embrionario en mamíferos, la formación de células hematopoyéticas se produce en diversos emplazamientos o nichos, separados espacial y temporalmente⁷⁰, haciendo particularmente complejo describir la ontogenia de la hematopoyesis⁷¹. De esta manera, la producción de células hematopoyéticas conlleva la participación de diversos sitios anatómicos como son el saco vitelino, un área que rodea la aorta dorsal denominada región aorta-gonadal-mesonefros (AGM), la placenta y el hígado (Figura 4). Tras el nacimiento, se produce una colonización total de las HSC en la BM.

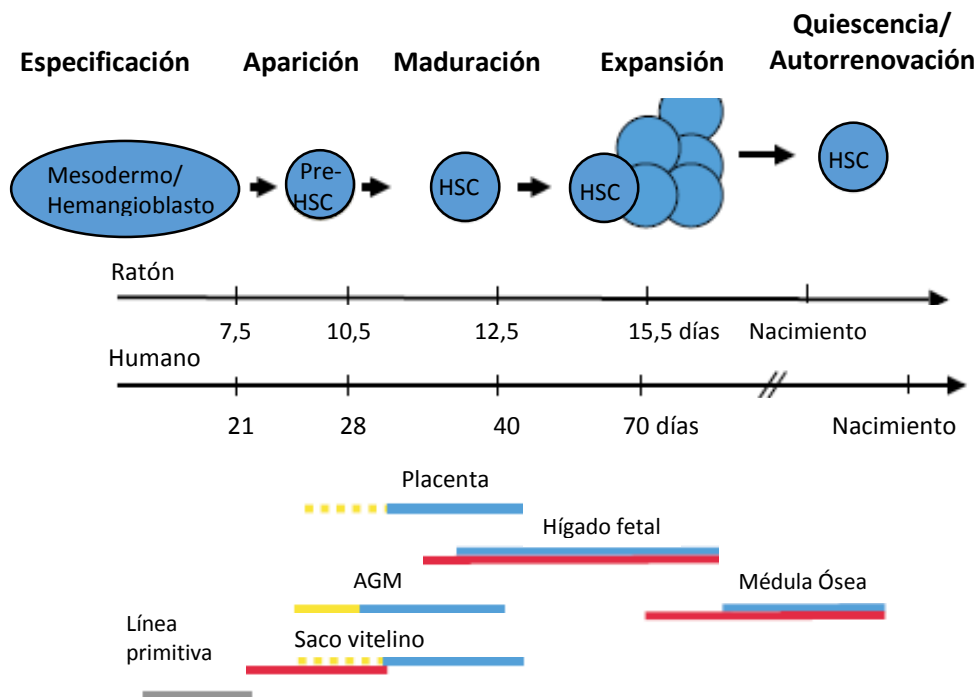


Figura 4: Establecimiento de las HSC. La barra roja, indica diferenciación hematopoyética activa; la azul, presencia de las HSC funcionales de tipo adulto; la amarilla, génesis de las HSC y las

amarillas punteadas, indican una génesis de las HSC *de novo* pero sin haberse probado experimentalmente. Fuente: H. K. A. Mikkola y S. H. Orkin, The journey of developing hematopoietic stem cells, *Development*, 2006⁷².

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre la ontogenia del sistema hematopoyético se han realizado en ratones, sin embargo, en diversos aspectos sirve como modelo del sistema hematopoyético humano⁷³⁻⁷⁵. La hematopoyesis en ratones empieza tras la gastrulación, en el mesodermo ventral⁷⁶, cuando un conjunto de células de origen mesodermal denominadas hemangioblastos migran hacia el saco vitelino. Éstas se diferencian en progenitores hematopoyéticos o endoteliales comprometidos, generando los islotes sanguíneos^{77,78}. Estos islotes producen las células rojas cuya principal propiedad es la expresión de globinas embrionarias. Este proceso se denomina hematopoyesis primitiva y su principal función no es otra más que proporcionar el aporte de oxígeno necesario a los diferentes tejidos embrionarios en formación. Rápidamente la hematopoyesis primitiva es sustituida por la hematopoyesis definitiva, empezando en la región AGM. Múltiples estudios coinciden en que la AGM es una fuente de HSC definitivas⁷⁹⁻⁸², así como las arterias umbilicales (UA) y las vitelinas (VA)⁸³. Recientemente, la placenta ha comenzado a tener un papel importante en la hematopoyesis fetal, ya que se han encontrado HSC en dicho tejido⁸⁴⁻⁸⁶. En la placenta las HSC han podido generarse *de novo* o ésta ha podido ser colonizada a través de la circulación sanguínea. Finalmente, las HSC acaban invadiendo el hígado, timo y bazo⁸⁷⁻⁸⁹. El hígado fetal (FL) termina convirtiéndose en el principal órgano en cuanto a la expansión y diferenciación de las HSPC se refiere. La primera oleada de células hematopoyéticas compuesta por progenitores mieloeritoroides que llega al hígado procede del saco vitelino. A continuación, le siguen las HSC procedentes, lo más probable, de la AGM y de la placenta a través de los vasos umbilicales. Conforme la gestación avanza, el microambiente presente en el FL va cambiando y con ello el foco de la diferenciación hematopoyética. Al comienzo éste es rico en CFU-E y proeritroblastos lo cual se traduce en una eritropoyesis definitiva activa, mientras que los progenitores mieloides y linfoides se concentran al final del desarrollo embrionario (Figura 5).

Sin embargo, hay que destacar que poco se sabe hasta la fecha sobre de los nichos que promueven la expansión y diferenciación de las HSPC en el FL. Se ha demostrado que las

propiedades de las HSC varían en función del lugar en el que se encuentren, sugiriendo de esta manera la existencia de diferentes nichos que dan soporte a su expansión y a su diferenciación durante el desarrollo embrionario⁸⁷. Cabe resaltar que las HSC fetales poseen una alta capacidad proliferativa en comparación con las adultas, ya que la mayoría de las HSC fetales se encuentran en división simétrica donde las células hijas mantienen las propiedades de autorrenovación y multipotencia, resultando en una expansión neta de las HSC⁹⁰. Sin embargo, la mayoría de las HSC presentes en la BM se encuentran en un estado quiescente (G_0), donde rara vez se dividen con el fin de mantener un número adecuado de células sanguíneas y HSC⁹¹. Esto es posible debido a la existencia de los diferentes nichos especializados, gracias a los cuales la multipotencia de las HSC es mantenida durante las distintas divisiones celulares⁹².

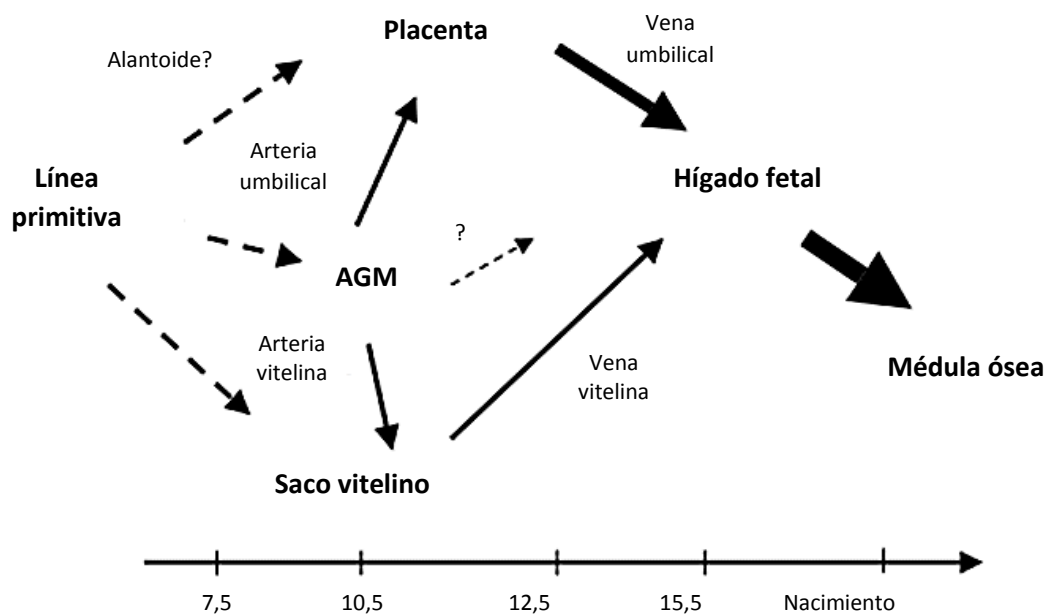


Figura 5: Rutas migratorias y circulatorias que conectan los diferentes sitios hematopoyéticos fetales. Las flechas rotas indican la migración de precursores de HSC y las flechas continuas indican la circulación de las HSC a través de la vasculatura. Las flechas negras más grandes indican un tráfico importante de HSC. Fuente: H. K. A. Mikkola y S. H. Orkin, The journey of developing hematopoietic stem cells, *Development*, 2006⁷².

Tras la expansión de las HSC en el FL, éstas migran desde sus respectivos nichos hepáticos hasta la BM gracias a la expresión de varias señales como el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de células madre (SCF), N-cadherina, la molécula de adhesión celular vascular,

selectinas y/o fibronectinas (FN)⁹³⁻⁹⁸. Sin embargo, la señalización intracelular que impulsa esta transición de las HSC se encuentra vagamente definida⁹³⁻⁹⁵.

Khan *et al.* pusieron de manifiesto que los pericitos Nestin⁺NG2⁺ asociados a los vasos porta forman un nicho que promueven la expansión de las HSC⁹⁹, al contrario de lo que ocurre en la BM¹⁰⁰. Tras el cierre de la UV al nacimiento, los vasos portales experimentan una transición de Neuropilina-1⁺Efrina-B2⁺ a Efrina-B4⁺, pasando de un fenotipo arterial a uno venoso. Este fenómeno va asociado a una pérdida periportal de las células Nestin⁺NG2⁺ y por consiguiente, a una emigración de las HSC⁹⁹. Sin embargo, este modelo no concuerda con el hecho de que la emigración de las HSC se produzca tras el nacimiento, sino que conforme se acerca el final de la etapa prenatal existe un flujo continuo hacia la BM.

Recientemente, Shao *et al.* han demostrado que es necesario el complejo 2 de la proteína homóloga verprolina del síndrome Wiskott-Aldrich para la transición de las HSC desde el FL a la BM¹⁰¹.

4.3. Nichos hematopoyéticos en la vida fetal y adulta

Las HSC residen, como se ha mencionado anteriormente, en microambientes especializados denominados nichos. Estos nichos son los responsables de proporcionar las señales necesarias para el mantenimiento de las características intrínsecas de las SC (multipotencia, autorrenovación y quiescencia).

4.3.1 Médula Ósea

La BM constituye el mayor foco hematopoyético dentro del organismo humano adulto. Dentro de la BM existen dos tipos de nichos, los nichos endosteales y los nichos vasculares, divididos a su vez en componentes arteriulares y sinusoidales¹⁰²⁻¹¹⁰. Ambos nichos han sido reconocidos como moderadores tanto de la autorregulación como de la función de las HSC, lo cual está basado en parte en la composición celular y en los factores solubles secretados (Figura 6).

La localización de las HSC en la BM sigue siendo hoy en día un tema de debate. Kiel *et al.* mostraron que la mayoría de las HSC se encontraban en contacto con el endotelio sinusoidal en lugares distantes al hueso¹¹⁰, lo cual es coherente con diversos estudios

que demuestran que la mayoría de las HSC se encuentran en contacto directo perivascular con las células reticulares abundantes (CAR), a través de SDF-1¹¹¹, y con las células estromales Nestin⁺¹⁰³. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la mayoría de las HSC murinas se localizan en lugares perivascuales en contacto cercano a los sinusoides o arteriolas^{100,105,108,112}. Sin embargo, una publicación reciente sugirió que tanto las HSC como las HSPC se encuentran localizadas cerca del endotelio pero con una mayor preferencia por la región endosteal¹¹³. Estos datos son consistentes con la preferencia mostrada por las HSC a un subgrupo de osteoblastos inmaduros *spindle-shaped N* (SNO) cadherina⁺ en el endosteo¹⁰².

En conjunto, estos resultados sugieren que la mayoría de las HSC quiescentes se encuentran alrededor de las arteriolas y más cerca del endosteo en la BM, mientras que por su parte las HSC activadas se cree que residen próximas a los sinusoides^{100,114-116}.

Nicho endosteal: está localizado en la superficie del hueso por lo que las HSC están en contacto directo con los osteoblastos, además de fibroblastos, macrófagos, células endoteliales (EC) y adipocitos. Las células pertenecientes al linaje osteoblástico producen diversas citoquinas como G-CSF¹¹⁷, trombopoyetina (TPO)^{118,119} y SDF-1¹²⁰ implicadas en la regulación de las HSC. Sin embargo, mientras que los osteoblastos maduros parecen no jugar un papel importante *in vivo*, las células inmaduras pertenecientes a este linaje contribuyen al mantenimiento de las HSC. N-cadherina es una molécula de adhesión presente en las células pertenecientes al linaje osteoblástico, sobretodo, en las células más inmaduras. Como se ha mencionado anteriormente, una parte de las HSC se encuentran localizadas cerca de las células SNO^{102,114,121}, donde se ha visto que N-cadherina es la responsable de la adhesión celular. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la molécula N-cadherina no es necesaria para una normal función de las HSC¹²²⁻¹²⁴, sin embargo, es importante resaltar que a pesar de estos resultados no es posible descartar cierto papel sobre la regulación de las HSC. La cantidad de adipocitos presentes en la BM es directamente proporcional a la edad. Naveiras *et al.* demostraron que una BM rica en adipocitos posee un número menor de HSC en comparación con una BM pobre en adipocitos¹²⁵. Además, en ratones con una adipogénesis alterada se ha visto que la actividad hematopoyética aumenta en sitios de BM que son ricos en adipocitos¹²⁵. Estos datos sugieren que los adipocitos juegan un

papel inhibitorio en el mantenimiento de las HSC. El gradiente de oxígeno presente en la región endosteal guía la localización de las HSC. Éstas muestran una redistribución selectiva sobre la región endosteal donde las células más maduras y comprometidas con el linaje se distribuyen selectivamente hacia la región central de la BM, por lo que la diferenciación hematopoyética parece avanzar radialmente hacia el eje longitudinal de la BM¹²⁶. Este hecho está relacionado con el gradiente de oxígeno presente en la BM puesto que las HSC se localizan en la región más hipóxica, característica fundamental en la regulación de las SC¹²⁷. Además, las HSC con valores celulares más bajos de especies reactivas de oxígeno (ROS), poseen un mayor potencial de autorrenovación¹²⁸.

Nicho vascular: está localizado adyacentemente a los sinusoides de la BM. Tanto las EC como las estromales expresan SDF-1, mientras que las HSC expresan el receptor de quimioquinas C-X-C 4 (CXCR-4). Se sabe que el sistema SDF-1/CXCR-4 es esencial para la supervivencia, proliferación y regulación de la movilización de las HSC. La ubicación perivascular de la mayoría de las HSC ha centrado recientemente la atención en las células del estroma que residen en dicha región. Además de EC, la región perivascular contiene células madre mesenquimales (MSC) y una población muy heterogénea de células estromales caracterizadas por una alta expresión de SDF-1: CAR, células estromales Nestin⁺ y células estromales positivas para receptores de leptinas. Las CAR son progenitores mesenquimales con potencial adipogénico y osteogénico *in vitro*¹²⁹. Además, constituyen la mayor fuente de SCF y de SDF-1 en la BM. Las células estromales Nestin⁺ son definidas como células estromales perivasculares, las cuales expresan ciertos genes implicados en el mantenimiento de las HSC: SDF-1, SCF y angiopoyetina (ANG). Por su parte, las células estromales positivas para receptores de leptinas al igual que las CAR expresan altos niveles de CXCL-12 y SCF. Por lo tanto, estos resultados sugieren que estos tres tipos celulares son un componente celular muy importante en el nicho hematopoyético de la BM y la supresión de alguno de estos tres tipos celulares conllevaría a una reducción importante en el número de HSC. Las EC presentes en la BM, expresan diversos genes implicados en el mantenimiento de las HSC como SDF-1, SCF y ANG¹³⁰. La eliminación de una molécula específica de adhesión endotelial, E-selectina, conlleva a un incremento en la quiescencia de las HSC, sugiriendo que las EC promueven la proliferación de las mismas¹³¹. Sin embargo, la supresión de SCF por parte de las EC

resulta en una pérdida de HSC¹⁰⁸. Todo esto, sugiere que las EC son también una pieza importante en el nicho hematopoyético de la BM. En 2011, Yamazaki *et al.* demostraron que las células de Schwann no mielinizantes poseían un papel importante en la regulación de las HSC¹³², ya que son la principal fuente del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en la BM. El TGF- β es un importante regulador de la función de las HSC, ya que induce la quiescencia de las HSC *in vitro*¹³³ y la pérdida de señalización de TGF- β en las HSC, da como resultado una alteración en la actividad de repoblación a largo plazo¹³².

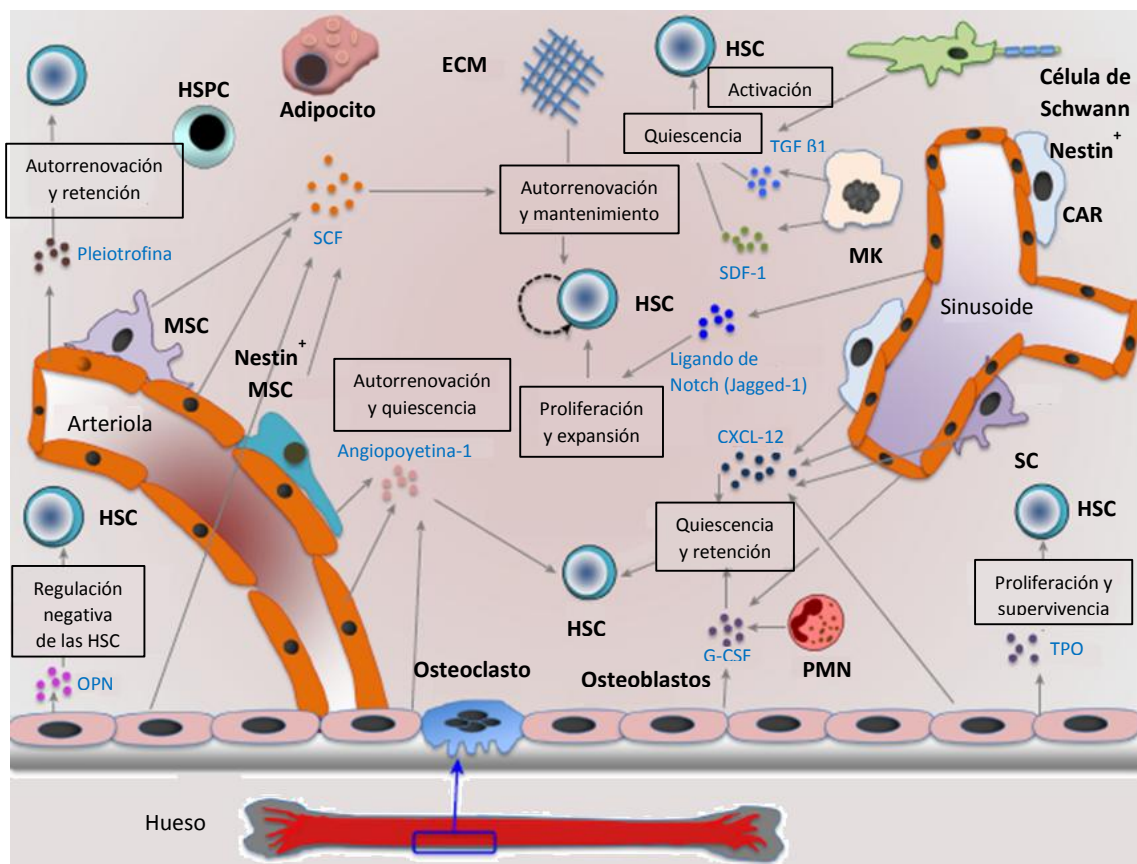


Figura 6: Nicho de las HSC dentro de la BM. Fuente: Sachin Kumar y Hartmut Geiger, HSC niche biology and HSC expansion *ex vivo*, Trends in Molecular Medicine, 2017¹³⁴.

4.3.2 Hígado

Durante el desarrollo embrionario, el hígado es el principal órgano hematopoyético. Mientras que la base celular del nicho de las células HSC en la BM está bien caracterizada, la naturaleza del nicho en el FL no ha sido aún esclarecida. A pesar de ello,

el estudio de las distintas poblaciones presentes como son las células estromales y las EC puede proporcionar pistas acerca del microambiente hematopoyético.

En 2010 Chou *et al.* aislaron, de FL murinos una población altamente homogénea de células estromales primarias, las cuales probablemente podrían apoyar a la expansión de las HSC en el FL¹³⁵. Esta población representaba un 2% de las células hepáticas fetales positivas para los marcadores de superficie SCF⁺DLK⁺ y era capaz de expresar un conjunto de factores importantes para la expansión de las HSC tales como ANG-3, factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2), SCF y TPO¹³⁵. Asimismo, esta población era la principal fuente hepática fetal que expresaba SDF-1 y α -fetoproteína (AFP)¹³⁵.

Yong *et al.* definieron la existencia de una población CD34^{lo}CD133^{lo} en el FL humano que daba lugar a células pertenecientes al linaje hepático¹³⁶. Esta población expresaba marcadores tanto endodérmicos como mesodérmicos y poseía la capacidad de diferenciarse en hepatocitos y en células del linaje mesenquimal mediante ensayos de diferenciación *ex vivo*¹³⁷. Además, expresaban GF necesarios para la expansión de las HSC como SCF, IGF-2, SDF-1 y factores de la familia de las ANG¹³⁷. Por lo tanto, esta población no solo serviría como PSC para el desarrollo del hígado, sino que también sería un componente esencial en el nicho de las HSC en el FL.

En 1963, Lind sugirió que mientras que la UV irrigaba las porciones izquierda y central del FL humano, la vena porta (PV) lo hacía en el lóbulo derecho¹³⁸. De esta manera, el lóbulo derecho recibiría un aporte considerablemente menor de oxígeno, ya que la saturación venosa portal es solo del 30% mientras que la saturación venosa umbilical ronda el 80-85%. Apoyando esta afirmación se encuentra el hecho de que el lóbulo hepático derecho en el feto, posee una mayor actividad hematopoyética que el izquierdo¹³⁹.

Recientemente, ha sido demostrada la existencia de cuatro estadios de hematopoyesis hepática en embriones humanos¹⁴⁰, de la misma manera que ya había sido descrito por Sasaki y Sonoda¹⁴¹ en ratones (Figura 7). Los primeros signos de hematopoyesis se observaron a las diez semanas de gestación mientras que los últimos signos de actividad hematopoyética se registraron a la semana treinta y nueve. El Estadio I abarca las primeras nueve semanas y en él apenas hay signos claros de hematopoyesis.

Básicamente está formado por HB en desarrollo que ocupan los sinusoides. El Estadio II comprende desde la semana diez hasta la semana doce y se caracteriza por la proliferación inicial de focos hematopoyéticos los cuales alcanzan hasta un 20-30% del parénquima hepático. Estos focos son pequeños sin una forma regular y localizados, en su gran mayoría, entre los HB y la luz sinusoidal lo cual probablemente dará lugar al espacio de Disse. En esta etapa los focos están compuestos por precursores eritroides, organizados en línea, y por precursores más inmaduros eritroides o líneas monomiocíticas. El Estadio III comienza sobre la semana trece y termina la semana veintidós, donde las células hematopoyéticas ocupan alrededor de un 70% del parénquima hepático. En este momento los focos se encuentran ya bien definidos con una forma elipsoidal y compuestos por células pertenecientes al linaje eritrocítico. Sin embargo, también hay presencia de granulocitos maduros lo cual sugiere la presencia de células mieloides en estado indiferenciado, así como de megacariopoyesis debido a la presencia de megacarioblastos y megacariocitos. Por último, el Estadio IV precede al Estadio III y finaliza en la semana treinta y nueve. Esta etapa está marcada por la involución de la hematopoyesis, donde la distancia entre los distintos focos empieza a ser cada vez mayor.

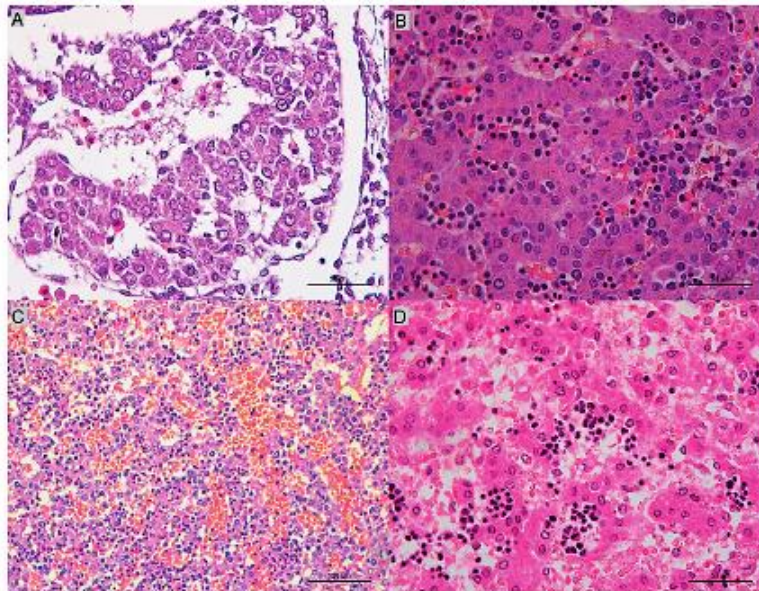


Figura 7: Los cuatro estadios de la hematopoyesis hepática en embriones humanos: Fuente: D. Fanni, F. Angotzi, F. Lai, C. Gerosa, G. Senes, V. Fanos y G. Faa, Four stages of hepatic hematopoiesis in human embryos and fetuses, *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine*, 2017¹⁴⁰.

Durante la etapa fetal, el principal aporte sanguíneo procede de la UV (80-85 %), mientras que el resto procede de la PV (15-20 %) ¹⁴². Barclay *et al.* sugirieron que la UV suministraba flujo sanguíneo a los lóbulos centrales e izquierdo del hígado, mientras que la PV lo hacía al lóbulo derecho en corderos. Más adelante se planteó un patrón de flujo sanguíneo similar en fetos humanos ¹³⁸. Esto implicaría que el lóbulo derecho recibe menos oxígeno ya que la saturación de oxígeno venoso portal es solo alrededor del 30% en comparación con el de la UV (80 a 85%) ¹⁴³ (Figura 8). En apoyo a esta afirmación está la observación de que durante el desarrollo embrionario, el lóbulo hepático derecho posee una mayor actividad hematopoyética que el lóbulo izquierdo ¹³⁹.

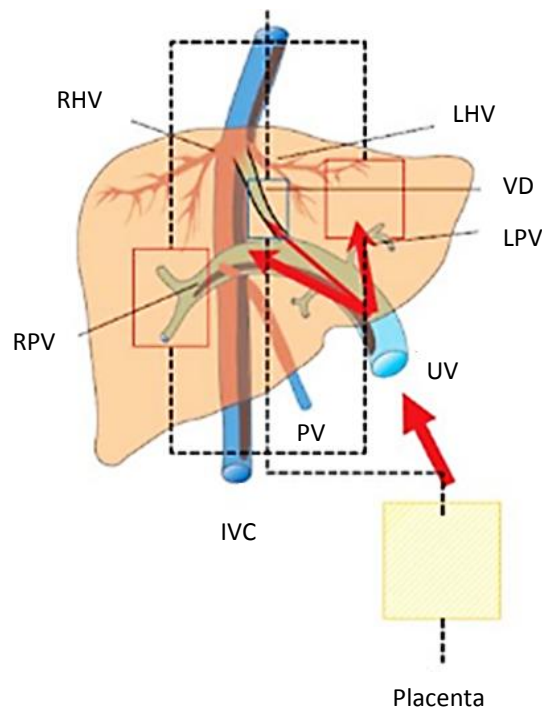


Figura 8: Circulación fetal. VD: ducto venoso, IVC: vena cava inferior, RHV: vena hepática derecha, LHV: vena hepática izquierda, LPV: rama izquierda de la vena porta intrahepática, RPV: rama derecha de la vena porta intrahepática. Fuente: M. Tchirikov, H .J. Schroder, y K. Hecher, Ductus venosus shunting in the fetal venous circulation: regulatory mechanisms, diagnostic methods and medical importance, *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 2006 ¹⁴⁴.

Por lo que la recreación *in vitro* de este microambiente sería una buena táctica para expandir las HSC procedentes de UCB con el objetivo de tratar las distintas neoplasias malignas y no malignas que no disponen de un trasplante en un tiempo razonable.

5. Expansión de las HSC *ex vivo* e *in vitro*

Como se ha comentado anteriormente la UCB es una fuente prometedora de HSC para el trasplante alogénico. Sin embargo, el rechazo de injerto así como el tiempo necesario para que se produzca el injerto siguen siendo los mayores inconvenientes a tener en cuenta. Estas limitaciones están relacionadas con la baja celularidad de HSC y HSPC presente por unidad de UCB. Por ello, se ha sugerido la expansión de las HSC *ex vivo* como una posible solución a los problemas causados por el reducido número de células hematopoyéticas.

En 2010 varios investigadores definieron los requerimientos que debían ser cumplidos al considerar la expansión de las HSC *in vitro*: 1) Las HSC deben poder expandirse a mayor escala sin sacrificar su capacidad de autorrenovación; 2) La expansión de las HSC debe de ser segura y trasplantable, libre de células alimentadoras, proteínas séricas o agentes microbianos¹⁴⁵.

Desde el primer trasplante de UCB hace ya más de 20 años para tratar a un paciente con Anemia de Fanconi¹⁴, se han desarrollado nuevas estrategias para superar las limitaciones que presenta este tipo de trasplante. Como por ejemplo el uso de diferentes combinaciones de GF en presencia o ausencia de monocapas de células procedentes de la BM o incluso de células estromales hepáticas¹⁴⁶⁻¹⁵¹.

En la década de los 90 se llevaron a cabo los primeros intentos de expansión de las HSC procedentes de UCB. Para ello, se emplearon distintas combinaciones de citoquinas hematopoyéticas¹⁵². Estos estudios demostraron que era necesario la presencia de citoquinas para un crecimiento óptimo de las HSPC, por lo que los protocolos actuales, destinados a la expansión de esta población, incluyen la administración de citoquinas como parte de las condiciones de cultivo independientemente de la presencia de otras moléculas y/o células adyuvantes.

Entre las diferentes citoquinas, SCF, TPO y el ligando *FMS-like tyrosine kinase 3* (Flt-3L) han mostrado ser esenciales en la expansión de las células hematopoyéticas más primitivas *in vitro*¹⁵³⁻¹⁵⁵. Por ejemplo, Piacibello *et al.* manifestaron como al poner en cultivo células CD34⁺ procedentes de UCB en presencia de Flt-3L y TPO se producía un aumento de $1,46 \times 10^5$ veces en el número de células CD34⁺¹⁵³. La adición de otras

citoquinas como interleuquina (IL) 3 o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) parecían tener también un efecto positivo en la generación de progenitores comprometidos, mientras que la eritropoyetina (EPO) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) contribuían generalmente a la producción de células más maduras^{156,157}. De esta manera, la adición de IL-3 y EPO favorecían la producción de progenitores eritroides, mientras que la combinación de GM-CSF, G-CSF y/o M-CSF promovían la producción de progenitores mieloides¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Por lo tanto, se puede concluir que las citoquinas hematopoyéticas recombinantes son clave tanto para la expansión *ex vivo* de HSPC como para la producción de células más maduras. Sin embargo, la administración de citoquinas no es suficiente para una producción significativa de HSC *ex vivo*. La presencia de otros elementos presentes en el nicho como células estromales y/o moléculas implicadas en las interacciones entre células es necesaria para conseguir una expansión eficiente¹⁵⁹⁻¹⁶². En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia no solo de la composición del microambiente sino de la estructura gracias al uso de monocapas mixtas 2D de MSC procedentes de BM y UC¹⁶³, matrices acelulares de líneas de células estromales de BM murinas¹⁶⁴ o matrices sintéticas¹⁶⁵.

De acuerdo con el hecho de que durante el desarrollo *in vivo*, las HSC y HSPC se encuentran en estrecha asociación con las células del microambiente^{105,166-169}, se han desarrollado nuevos sistemas para expandir las poblaciones hematopoyéticas más primitivas que emplean células estromales como capas alimentadoras. Entre las distintas monocapas de células alimentadoras empleadas destacan el estroma de la BM^{148,170,171}, EC¹⁷², líneas células OP3 y AFT024¹⁷³ y MSC, procedentes de diversos tejidos¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. Estos estudios han demostrado que las células estromales, particularmente las MSC, son capaces de promover la expansión de las células más primitivas *ex vivo* en un proceso que se debe no solo al contacto células-célula sino también a la secreción de diversas citoquinas. Se ha puesto de manifiesto que las MSC producen una gran variedad de citoquinas hematopoyéticas, incluidos algunos factores estimulantes de colonias, varias interleuquinas y algunas quimioquinas^{178,179}. Por lo tanto, la combinación de cultivos basados en MSC y citoquinas recombinantes dan lugar a incrementos mayores en el número de células CD34^{+161,162}.

La manipulación de distintas vías de señalización como Notch¹⁸⁰, Wnt y HOXB4 han demostrado tener un efecto positivo en la expansión de las HSC *ex vivo*^{145,181}. Milner *et al.* fueron los primeros en describir el papel del gen Notch1 en las HSC CD34⁺¹⁸². A continuación, se puso de manifiesto que la manipulación de la vía de señalización Notch jugaba un papel muy importante en la expansión de las PSC. Duncan *et al.* confirmaron, usando ratones transgénicos para Notch, que la señalización de Notch era activa en HSC *in vivo* pero sin embargo se encontraba disminuida en HSC diferenciadas¹⁸³. Varios estudios han coincidido en que esta vía de señalización puede aumentar hasta 100 veces el número de precursores *in vitro*¹⁴⁵. Delaney *et al.* cultivaron células CD34⁺ procedentes de UCB en presencia de IL-3, IL-6, TPO, Flt-3L, SCF y el ligando de Notch, y observaron un aumento de 222 veces en el número de células CD34⁺¹⁸⁴. De hecho, ahora mismo está en proceso un ensayo clínico en fase 1 en el que los pacientes, acondicionados de manera mieloablativa, van a recibir dos unidades de UCB donde la primera no ha sido manipulada pero la segunda se ha sometido a un proceso de expansión mediada por Notch²⁰. El gen HOXB4 ha sido demostrado ser un regulador de la diferenciación hematopoyética¹⁸⁵. Actualmente, es el factor de transcripción más estudiado por su potencial para incrementar las propiedades de autorrenovación de las HSC. Además, su sobreexpresión conduce a la expansión de HSC y HSPC murinas y humanas. Al tratar células CD34⁺ humanas procedentes de UCB con proteínas de fusión HOXB4 se produjo un aumento de 2,5 veces en células de repoblación a largo plazo¹⁸⁵. El uso de una forma más estable de esta proteína podría ser una estrategia a seguir para la expansión *ex vivo*. Por otra parte, se conoce que la vía de señalización Wnt estimula la expansión *in vitro* de las HSC/HSPC¹⁸⁶. Aguila *et al.* mostraron que la sobreexpresión de determinados genes como SALL4, tenía la capacidad de incrementar el número de HSC/HSPC *in vitro*¹⁸⁷. La transducción con SALL4 resultó en una expansión tanto de las células CD34⁺CD38⁻ como CD34⁺CD38⁺ resultando en un aumento de la capacidad de injerto y de la repoblación a largo plazo en ratones diabéticos no obesos con una inmunodeficiencia severa combinada (NOD-SCID)¹⁸⁷.

Se ha demostrado que el cobre celular participa en la regulación tanto de la proliferación como de la diferenciación de las HSC y HSPC¹⁸⁸. De acuerdo a esto, Peled *et al.* purificaron células hematopoyéticas CD133⁺ de UCB y las cultivaron durante tres

semanas en medio líquido suplementado con SCF, Flt-3L, TPO, IL-6 y en presencia del agente quelante de cobre tetraetilenpentamina (TEPA)¹⁸⁹. Observaron un incremento significativo en el número de células CD34⁺, así como de CD34⁺CD38⁻. Además, el poder de injerto de las células expandidas en ratones NOD-SCID fue significativamente mayor respecto a la población no expandida.

Una de las mayores limitaciones en el cultivo de células hematopoyéticas primitivas es la rápida generación de células diferenciadas, las cuales producen y secretan al medio una gran cantidad de moléculas, muchas de las cuales ejercen señales inhibitorias que afectan al crecimiento de las HSPC¹⁹⁰. Con el fin de solventar esta limitación, Zandstra y su grupo desarrollaron un sistema automatizado cerrado, el cual realizaba cambios de mitad de medio diariamente^{191,192}. Un aspecto clave de este novedoso enfoque experimental era la eliminación continua de células diferenciadas, por lo que de esta manera se evitaba la acumulación de reguladores negativos. Además, observaron un incremento significativo en el número de TNC, de células CD34⁺ así como de LTC-IC.

Los resultados obtenidos en el laboratorio llevaron a la traducción de algunas de las condiciones experimentales *in vitro* en protocolos clínicos destinados a incrementar la celularidad presente en la UCB. Inicialmente, se llevaron a cabo dos estudios preliminares para evaluar la viabilidad de las células expandidas en pacientes con enfermedades hematológicas, cáncer de mama y en algunos otros trastornos metabólicos^{193,194}. En ambos estudios, las células procedentes de la UCB fueron cultivadas durante 10-12 días en medios líquidos en presencia de citoquinas recombinantes (Flt-3L, SCF, TPO y EPO). La infusión de las células expandidas en los pacientes no alteró significativamente ni el injerto mieloide, eritroide o plaquetario. Sin embargo, ambos estudios sirvieron para concluir que este procedimiento era viable y seguro. De Lima *et al.* combinaron el uso de citoquinas recombinantes y TEPA para la expansión durante 21 días de una parte de una unidad de UCB. Finalmente, la fracción manipulada se trasplantó 24 h después de la fracción no manipulada¹⁹⁵. Las células expandidas se injertaron, sin embargo, no se observaron cambios en el tiempo de injerto de neutrófilos o plaquetas, en comparación con el trasplante de células no expandidas. Asimismo, no se observó enfermedad aguda de injerto contra huésped grado 3-4, y la supervivencia a los 100 días fue del 90%.

Sin embargo, hasta la fecha la mayoría de avances están restringidos a modelos murinos. Mientras que los estudios que emplean células CD34⁺ trasplantadas en ratones NOD/SCID mostraron resultados positivos de injerto¹⁹⁶, es necesario un modelo de animal mayor para demostrar de verdad el injerto multilinaje a largo plazo. Algunos investigadores creen que el uso de lentivirus es una herramienta muy poderosa para la expansión de HSC. Sin embargo, sería necesario clarificar y evaluar los riesgos mutagénicos por inserción. Además, el aumento del período de cultivo promueve el aumento de divisiones celulares lo cual incrementa las probabilidades de mutaciones espontáneas o anormalidades citogenéticas.

6. Bioingeniería del hígado

6.1. Fisiología hepática

El hígado es la glándula interna más grande presente en el cuerpo. Posee un papel fundamental en la homeostasis metabólica ya que proporciona muchas funciones esenciales metabólicas exocrinas y endocrinas, como son la desintoxicación y eliminación de muchas sustancias, el mantenimiento de la homeostasis sanguínea, la regulación de los niveles de glucosa y la producción de numerosos productos como lípidos, proteínas, vitaminas y carbohidratos. Además, el hígado posee una capacidad regenerativa única, pudiendo regenerar la mayor parte de su función tras la pérdida de hasta tres cuartas partes de su masa como consecuencia de una lesión tóxica o una hepatectomía parcial.

El hígado está dividido en lóbulos donde cada lóbulo está formado por cordones de hepatocitos los cuales están revestidos por capilares sinusoidales que desembocan en una vena eferente central (ECV) (Figura 9). Cada lóbulo hepático posee una morfología hexagonal, donde cada vértice posee una triada portal formada por una PV, una arteria hepática (HA) y un ducto biliar. Los sinusoides son capilares específicos del hígado revestidos por EC fenestradas, células de ito y macrófagos residentes (células de kupffer).

El hígado posee un aporte doble de sangre, uno a través de la PV y el otro por la HA. La PV libera la sangre venosa procedente de los intestinos, páncreas y bazo. Mientras que

por su parte, la HA suministra oxígeno al hígado. La sangre fluye desde una triada portal, a través de un capilar sinusoidal hasta una ECV. Los hepatocitos son las células parenquimatosas principales, los cuales llevan a cabo la mayoría de las funciones metabólicas, presentando un 60% de la población total y un 80% del volumen del hígado.

Los hepatocitos son células epiteliales polarizadas, donde su superficie basolateral se enfrenta a las EC fenestradas facilitando de esta manera el intercambio de materiales entre los hepatocitos y los flujos sanguíneos. Por su parte, las sales biliares producidas se excretan a los canaliculos los cuales se unen a los conductos biliares en la triada portal.

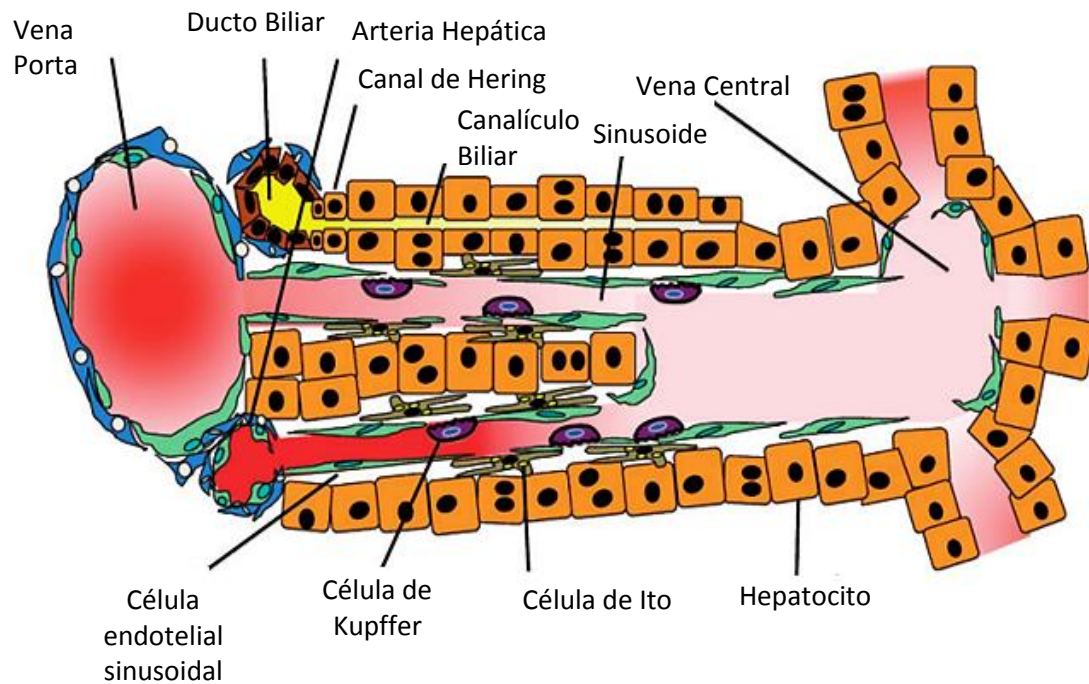


Figura 9: Arquitectura del hígado. Fuente: M. Tanaka, T. Itoh, N. Tanimizu, y A. Miyajima, Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms, Journal of biochemistry, 2011¹⁹⁷.

6.2. Desarrollo embrionario hepático

En la tercera semana de gestación comienza el desarrollo y la organización hepática, continuando hasta la etapa posnatal. La porción anterior del divertículo hepático da lugar al hígado y al árbol biliar intrahepático, mientras que la porción posterior forma la vesícula biliar y los conductos biliares extrahepáticos.

Los hepatocitos se originan a partir del endodermo definitivo durante el desarrollo embrionario, después gracias al endodermo ventricular anterior adquieren competencia hepática para terminar especificándose, estas células epiteliales, en células del endodermo^{198,199}. Las células primordiales hepáticas se convierten en un fenotipo celular no polarizado llamado HB, el cual posteriormente da lugar a los brotes hepáticos.

Los HB son células bipotentes que expresan genes hepáticos fetales, genes asociados tanto al linaje hepatocítico y colangiocítico y pueden diferenciarse a ambos tipos celulares²⁰⁰. La determinación del linaje depende de las vías de señalización Notch y TGF- β , los cuales promueven la diferenciación biliar²⁰¹⁻²⁰³. La baja regulación de estas dos vías promueve la especificación de los HB hacia el linaje hepatocítico²⁰⁴⁻²⁰⁶.

6.3. Células Madre Hepáticas

El hígado está compuesto por distintos linajes de células hepáticas que van madurando. Esta maduración comienza, extrahepáticamente, en el conducto común hepatopancreático, cercano al duodeno, e intrahepáticamente en la zona 1 a la altura de las triadas portales. Los nichos extrahepáticos de las SC son las glándulas peribiliares dentro de las paredes de los conductos biliares y los nichos intrahepáticos se localizan en las placas ductales en los FL y en los canales de Hering en los hígados posnatales²⁰⁰. Intrahepáticamente hay al menos 8 etapas de maduración de las células madre hepáticas (HpSC) las cuales van desde la zona 1 (periportal) hasta la zona 3 (pericentral) pasando a través de la zona 2²⁰⁷. Finalmente, en la zona 3 se concentran las células más maduras y apoptóticas (Figura 10).

- Células madre hepáticas

Las HpSC son PSC ubicadas en las placas ductales de los hígados fetales y neonatales, y en los canales de Hering en los hígados pediátricos y adultos^{200,208-212}. Este compartimento representa el vínculo anatómico y fisiológico entre el sistema canalículo-intralobular de los hepatocitos y árbol biliar. Las HpSC constituyen aproximadamente el 0,5-2% del parénquima, poseen un tamaño que oscila entre 7-10 μm de diámetro y tienen una alta relación núcleo-citoplasma. Su fenotipo incluye la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), la molécula de adhesión de células neuronales (NCAM), CD133, CXCR4, SOX9, SOX17, FOX2, las citoqueratinas (CK) 8/18/19, la proteína

Hedgehog, Claudina 3 y una baja expresión de albúmina (ALB). No expresan AFP, la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) o marcadores típicos de células hematopoyéticas, endoteliales o mesenquimales. Estas células pueden ser aisladas de hígados, de todas las edades, mediante una doble inmunoselección EpCAM⁺/NCAM⁺. Sin embargo, en hígados adultos con poblaciones de HB escasas basta con la selección de EpCAM⁺^{200,213}. En cultivo las HpSC forman colonias con capacidad autorreplicativa²¹⁴ y de diferenciación a células más maduras^{200,215}. La expansión *ex vivo* es llevada a cabo en colágeno (COL) tipo III, en un hidrogel de hialuronano o en combinación de ambos^{216,217}, en un medio libre de suero denominado Kubota, el cual solo contiene insulina, transferrina, lípidos y es bajo en calcio²¹⁸.

- Hepatoblastos

Los HB son células bipotentes diploides que dan lugar al linaje hepatocítico y al linaje colangiocítico. Residen sobre todo en el parénquima de hígados fetales y neonatales o como pequeños agregados en los canales de Hering en los hígados adultos²⁰⁸. El porcentaje de estas células, en hígados posnatales, disminuye hasta un <0,01% de las parenquimatosas^{200,208}. Por el contrario experimentan una gran expansión durante ciertos procesos regenerativos asociados con ciertas enfermedades como la cirrosis. Los HB pueden ser aislados mediante una doble inmunoselección EpCAM⁺/ICAM-1⁺. Además, poseen un enorme potencial de expansión cuando son cultivados en medio Kubota, especialmente si se complementa con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y en sustratos tratados con COL tipo IV, laminina (LN), hialuronano o en combinación^{216,219,220}. Los HB poseen un tamaño mayor que las HpSC (10-12 μm) así como cantidades mayores de citoplasma, sin embargo, poseen un perfil antigénico que se solapan^{200,213,221}. Comparten la expresión de CXCR4, CD133, SOX17, CK8/18/19, proteínas Hedgehog y la no expresión de marcadores hematopoyéticos, endoteliales o mesenquimales. Las diferencias se encuentran en la reducción de los niveles de expresión de EpCAM, en la presencia de altos niveles de ALB con discretos empaquetamientos citoplasmáticos, el cambio de expresión de NCAM por ICAM-1 y una fuerte expresión de AFP, entre otros.

- Progenitores comprometidos

Son células diploides y con un tamaño que oscila entre 12-15 μm . Estos precursores son células unipotentes, ya que solo pueden dar lugar a un tipo de célula madura. Han perdido la expresión de la mayoría de los genes pertenecientes al linaje de las SC y por contrapartida, expresan marcadores hepatocíticos o biliares, abundando en tejidos fetales y neonatales o en enfermedades hepáticas crónicas²²². Los progenitores hepatocíticos comprometidos, también llamados hepatocitos intermedios, expresan ALB, enzimas asociadas con la síntesis de glucógeno y carecen de la expresión de marcadores biliares y de AFP. Se localizan asociados a precursores endoteliales en las placas entre los HB y los hepatocitos adultos diploides. Por su parte, los progenitores colangiocíticos (*colangiocitos pequeños*) poseen una forma cúbica con una alta proporción núcleo-citoplasma, un retículo endoplásmico pequeño^{223,224} y se encuentran asociados a precursores de células estrelladas hepáticas²¹⁶. Colocalizan con las HpSC en el mismo nicho, que recubre los conductos de Hering, los conductos biliares intrahepáticos y los conductos biliares con un diámetro interno por debajo de los 15 μm .

- Células adultas diploides

Son las únicas células parenquimatosas con capacidad proliferativa significativa tanto en condiciones de *in vitro* como *in vivo*. Los hepatocitos adultos diploides pueden someterse a 6-7 rondas de división en 3 semanas en cultivo, pero tienen una capacidad de subcultivo limitada²¹⁸. Los colangiocitos, junto con las células estrelladas, tienen forma columnar, muestran un pequeño núcleo, un notorio citoplasma conspicuo y un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso abundantes²²⁴⁻²²⁶. Los colangiocitos se alinean alrededor de los conductos interlobulares localizados en las triadas portales. Expresan acuaporina 4 y 8, receptores de secretina, somatostatina y neuropéptidos, transportadores de fármacos, proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos y el transportador de ácido biliar dependiente de sodio. Cuando por alguna razón los colangiocitos se ven dañados, se observa una proliferación de los *colangiocitos pequeños* los cuales adquieren características fenotípicas y funcionales de los *colangiocitos grandes*^{227,228}. Esto sugiere que la población de colangiocitos pequeños, que recubren los conductos de Hering y los ductos, representa una población de precursores de colangiocitos maduros. Por lo tanto, mientras que los linajes de células hepatocíticas proceden desde las áreas periportales hacia la vena

central, los colangiocitos proceden en la dirección opuesta desde los canales de Hering hacia los conductos más grandes.

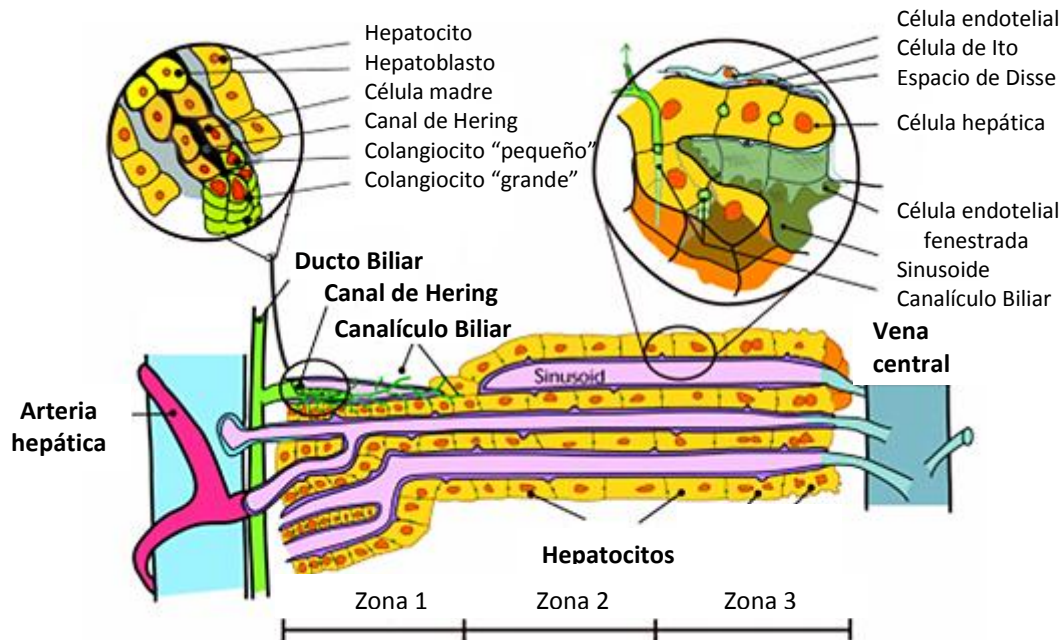


Figura 10: Esquema de los linajes madurativos intrahepáticos. Fuente: R. Turner, O. Lozoya, Y. Wang, V. Cardinale, E. Gaudio, G. Alpini, G. Mendel, E. Wauthier, C. Barbier, D. Alvaro, L. M. Reid, Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology, *Hepatology*, 2011²⁰⁷.

Existen dos formas distintas de regeneración hepática, la que se produce tras una hepatectomía parcial y la que ocurre tras una pérdida selectiva de células pericentrales. Tras una hepatectomía parcial la vía de señalización retroalimentaria se encuentra intacta. Por lo tanto, se lleva a cabo la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) a través de las placas hepáticas pero solo una porción de las células experimenta citocinesis, lo cual da lugar a un mayor número de células poliploides, un mayor número de células apoptóticas y una tasa de recambio más rápida con una restauración de los perfiles normales de ploidía en semanas²²⁹. En el caso de la pérdida selectiva de células pericentrales se produce un silenciamiento de la señalización retroalimentaria lo cual activa la división celular de las células pertenecientes a la etapas tempranas del linaje^{212,230}. En respuesta, las células periportales sufren un crecimiento hiperplásico rápido (división celular completa) seguido de un proceso de diferenciación. Este fenómeno conocido como "respuesta de células ovals" en roedores o "reacciones

ductulares” en humanos, tras una necrosis hepática masiva, implica la expansión de las poblaciones de células madre/progenitoras hepáticas²¹². Sin embargo, tras una lesión hepática grave y crónica, la proliferación de hepatocitos se ve afectada^{231,232}. Raven *et al.* describieron un modelo de lesión hepática combinada y de inhibición de la proliferación de los hepatocitos, donde se demostró que la células biliares daban lugar a niveles fisiológicamente significativos de hepatocitos funcionales²³³.

6.4. Modelos de bioingeniería hepáticos

Como se ha mencionado anteriormente, durante el desarrollo embrionario el hígado es el principal sitio de expansión de las HSPC. La mayoría de los modelos *in vitro* emplean ES y iPSC^{234,235}. Sin embargo, estos modelos no recapitulan por completo la diferenciación simultánea de los progenitores hepáticos en hepatocitos y colangiocitos. La formación de ductos biliares maduros *in vitro* es particularmente laborioso^{236,237}, por lo que se necesita la presencia de un entorno 3D para conseguir una polarización celular eficaz y adecuada^{238,239}.

La descellularización de órganos y tejidos es una técnica que consiste en la obtención de bio-andamiajes (“*scaffolds*”), gracias a la eliminación de todo componente celular, permitiendo su posterior uso en medicina regenerativa o en ingeniería de tejidos. Wang *et al.* confirmaron que los *scaffolds* hechos partir de la ECM hepática poseían esa atmósfera requerida²¹⁵. En 2011 fue demostrado que el cultivo de progenitores hepáticos humanos en ECM procedente de hígados de hurones, era capaz de originar estructuras características tanto de la estirpe hepatocítica como biliar²⁴⁰, lo cual indicaba la existencia de una preservación en cuanto a las señales de diferenciación celular de la ECM entre las distintas especies. Recientemente, Vyas *et al.* mostraron como células progenitoras fetales de hígados humanos cultivadas sobre la ECM procedente de hígados acelulares, eran capaces de formar organoides 3D hepáticos. Estos imitaban diversos aspectos de la organogénesis hepatobiliar dando como resultado la formación concomitante de hepatocitos progresivamente más diferenciados y estructuras biliares²⁴¹. En este estudio tras tres semanas en cultivo, se produjo un cambio claro en el fenotipo de los HB humanos, lo cual sugería una especificación en paralelo hacia el linaje hepatocítico y colangiocítico. Por lo tanto, los

scaffolds procedentes de tejido hepático contenían determinadas moléculas procedentes de la ECM que regulaban la diferenciación celular, función, expansión y regeneración²⁴².

En 2013 Takebe *et al.* mostraron, por primera vez, la generación de un hígado humano funcional a partir de iPSC humanas *in vitro*. En él, se producía una reorganización de los progenitores hepáticos imitando de esta manera las interacciones organogenéticas entre las EC y MSC y era capaz de realizar funciones específicas del hígado como la producción de diversas proteínas y el metabolismo de específicos fármacos. A continuación, se trasplantó en un modelo murino de insuficiencia hepática letal inducida por fármacos. A las 48 h se produjo la formación de una vasculatura funcional, lo cual estimuló la maduración de las células rescatándolo de la insuficiencia hepática²⁴³.

Como se ha mencionado anteriormente, durante el desarrollo embrionario el hígado es el principal órgano hematopoyético. Sin embargo poco se sabe sobre la base celular del nicho celular, por ello un buen modelo de estudio de la hematopoyesis fetal sería la recreación del microambiente hepático mediante la creación de organoides hepáticos humanos de bioingeniería *in vitro*.

Recientemente, Mokhtari *et al.* estudiaron las interacciones de las HSPC en un entorno similar al hepático fetal *in vitro*²⁴⁴. Compararon la expansión de las HSC cuando éstas eran sembradas en combinación con HB humanos y estroma hepático sobre unas estructuras hepáticas de bioingeniería hechas a partir de ECM 3D o sobre cultivos 2D. Demostraron que era necesaria la inclusión de los distintos tipos celulares en las estructuras 3D para el mantenimiento de las HSPC. Además, estas estructuras fueron capaces de mantener una subpoblación más primitiva de las HSPC (CD34⁺CD38⁻), donde el estroma hepático mostró ser un componente esencial tanto para la preservación de la población más primitiva como para la diferenciación celular²⁴⁴.

Las células hepáticas humanas procedentes tanto de hígados fetales y posnatales poseen la capacidad de autorreplicarse y diferenciarse^{200,208}. Sin embargo, la disponibilidad de HB humanos es muy limitada ya que no están disponibles comercialmente. Además, hay que tener en cuenta que el aislamiento de estos progenitores hepáticos no es nada sencillo a lo que hay que sumar las dificultades para

mantenerlos en cultivo. Por todo ello, el uso de PSC hace que se convierta en una atractiva fuente de HB humanos.

Hipótesis

El uso de la UCB como fuente de HSPC para el trasplante hematopoyéticos ha aumentado las posibilidades de que los pacientes encuentren un donante compatible en un tiempo razonable. Sin embargo, el uso de esta fuente es limitado en adultos y en adolescentes debido al bajo número de células CD34⁺ y a la baja velocidad de injerto.

Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que una expansión de las HSC procedentes de UCB puede ser lograda en unas condiciones más funcionales y eficientes mediante el uso de construcciones hepáticas humanas de bioingeniería.

Objetivos

- 1- Estudiar qué proteínas presentes en la matriz extracelular fetal promueven la expansión y diferenciación de las células madre/progenitoras hematopoyéticas durante el desarrollo embrionario en el hígado fetal. Para ello, se llevó a cabo un estudio proteómico comparativo sobre la matriz extracelular descelularizada de hígados porcinos fetales y adultos.
- 2- Desarrollar y caracterizar hepatoblastos humanos derivados de células embrionarias humanas, capaces de ser expandidos *in vitro* en 3D.
- 3- Expansión de células madre/progenitoras hematopoyéticas procedentes de cordón umbilical mediante el uso de organoides hepáticos fetales humanos.

Bibliografía

1. Ballen, K.K., Spitzer, T. R. The great debate: haploidentical or cord blood transplant. *Bone marrow transplantation* **46**, 323-329 (2011).
2. Ballen, K.K., Koreth, J., Chen, Y. B., Dey, B. R., Spitzer, T. R. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood* **119**, 1972-1980 (2012).
3. Schrier, S.L. & Angelucci, E. New strategies in the treatment of the thalassemias. *Annual review of medicine* **56**, 157-171 (2005).
4. Hequet, O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. *Journal of blood medicine* **6**, 55-67 (2015).
5. Thomas, E.D. & Storb, R. Technique for human marrow grafting. *Blood* **36**, 507-515 (1970).
6. Scheid, C., *et al.* Using at least 5x10(6)/kg CD34+ cells for autologous stem cell transplantation significantly reduces febrile complications and use of antibiotics after transplantation. *Bone marrow transplantation* **23**, 1177-1181 (1999).
7. Waters, T.M., *et al.* Economic analyses of bone marrow and blood stem cell transplantation for leukemias and lymphoma: what do we know? *Bone marrow transplantation* **21**, 641-650 (1998).
8. Broxmeyer, H.E., *et al.* Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4109-4113 (1992).
9. Carow, C.E., Hangoc, G. & Broxmeyer, H.E. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary CFU-GEMM: an effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* **81**, 942-949 (1993).
10. Barker, J.N., *et al.* Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **8**, 257-260 (2002).
11. Rocha, V., *et al.* Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *The New England journal of medicine* **342**, 1846-1854 (2000).
12. Sanz, G.F., *et al.* Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* **98**, 2332-2338 (2001).
13. Rocha, V., *et al.* Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* **97**, 2962-2971 (2001).
14. Gluckman, E., Broxmeyer, H. A., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., *et al.*, Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* **321**, 1174-1178 (1989).
15. Brunstein, C.G., *et al.* Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood* **110**, 3064-3070 (2007).
16. Ballen, K.K., *et al.* Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **13**, 82-89 (2007).
17. Barker, J.N., *et al.* Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* **105**, 1343-1347 (2005).

18. Schuster, J.A., *et al.* Expansion of hematopoietic stem cells for transplantation: current perspectives. *Experimental hematology & oncology* **1**, 12 (2012).
19. Tung, S.S., Parmar, S., Robinson, S. N., De Lima, M., Shpall, E. J. Ex vivo expansion of umbilical cord blood for transplantation. *Best practice & research. Clinical haematology* **23**, 245-257 (2010).
20. Dahlberg, A., Delaney, C. & Bernstein, I.D. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **117**, 6083-6090 (2011).
21. Weissman, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-168 (2000).
22. Evans, M.J. & Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156 (1981).
23. Thomson, J.A., *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
24. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
25. Takahashi, K., *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
26. Yu, J., *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
27. Maherali, N., *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* **1**, 55-70 (2007).
28. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317 (2007).
29. Mikkelsen, T.S., *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49-55 (2008).
30. Marion, R.M., *et al.* Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **4**, 141-154 (2009).
31. Deng, J., *et al.* Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nature biotechnology* **27**, 353-360 (2009).
32. Doi, A., *et al.* Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature genetics* **41**, 1350-1353 (2009).
33. Li, J.Y., Christophersen, N.S., Hall, V., Soulet, D. & Brundin, P. Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends in neurosciences* **31**, 146-153 (2008).
34. Metcalf, D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* **339**, 27-30 (1989).
35. Morrison, S.J., Uchida, N. & Weissman, I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* **11**, 35-71 (1995).
36. Martin, G.M., Sprague, C.A. & Epstein, C.J. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **23**, 86-92 (1970).
37. Gregory, C.J. & Eaves, A.C. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* **51**, 527-537 (1978).
38. Pluznik, D.H. & Sachs, L. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *Journal of cellular physiology* **66**, 319-324 (1965).
39. Bradley, T.R. & Metcalf, D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *The Australian journal of experimental biology and medical science* **44**, 287-299 (1966).
40. Metcalf, D., MacDonald, H.R., Odartchenko, N. & Sordat, B. Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 1744-1748 (1975).

41. McLeod, D.L., Shreve, M.M. & Axelrad, A.A. Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature* **261**, 492-494 (1976).
42. Nakeff, A. & Daniels-McQueen, S. In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **151**, 587-590 (1976).
43. Jones, R.J., Wagner, J.E., Celano, P., Zicha, M.S. & Sharkis, S.J. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* **347**, 188-189 (1990).
44. Lemieux, M.E., Rebel, V.I., Lansdorp, P.M. & Eaves, C.J. Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood* **86**, 1339-1347 (1995).
45. Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S. & Brons, N.H. An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* **74**, 2755-2763 (1989).
46. Harrison, D.E. Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* **55**, 77-81 (1980).
47. Harrison, D.E., Jordan, C.T., Zhong, R.K. & Astle, C.M. Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Experimental hematology* **21**, 206-219 (1993).
48. Szilvassy, S.J., Humphries, R.K., Lansdorp, P.M., Eaves, A.C. & Eaves, C.J. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 8736-8740 (1990).
49. McCune, J.M., *et al.* The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hemolymphoid differentiation and function. *Science* **241**, 1632-1639 (1988).
50. Kamel-Reid, S. & Dick, J.E. Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* **242**, 1706-1709 (1988).
51. Civin, C.I., *et al.* Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **14**, 2224-2233 (1996).
52. Larochelle, A., *et al.* Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nature medicine* **2**, 1329-1337 (1996).
53. Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I. & Dick, J.E. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature medicine* **4**, 1038-1045 (1998).
54. Guenechea, G., Gan, O.I., Dorrell, C. & Dick, J.E. Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nature immunology* **2**, 75-82 (2001).
55. Graf, T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* **99**, 3089-3101 (2002).
56. Herzog, E.L., Chai, L. & Krause, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* **102**, 3483-3493 (2003).
57. Krause, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene therapy* **9**, 754-758 (2002).
58. Theise, N.D., *et al.* Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-240 (2000).
59. Gussoni, E., *et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-394 (1999).
60. Jackson, K.A., Mi, T. & Goodell, M.A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14482-14486 (1999).

61. Jackson, K.A., *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *The Journal of clinical investigation* **107**, 1395-1402 (2001).
62. Petersen, B.E., *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-1170 (1999).
63. Lagasse, E., *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine* **6**, 1229-1234 (2000).
64. Krause, D.S., *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-377 (2001).
65. Quintana-Bustamante, O., *et al.* Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* **43**, 108-116 (2006).
66. Terada, N., *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-545 (2002).
67. Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P. & Smith, A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545-548 (2002).
68. Vassilopoulos, G., Wang, P.R. & Russell, D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-904 (2003).
69. Wang, X., *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901 (2003).
70. Moore, M.A. & Metcalf, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British journal of haematology* **18**, 279-296 (1970).
71. Dzierzak, E. & Speck, N.A. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nature immunology* **9**, 129-136 (2008).
72. Mikkola, H.K. & Orkin, S.H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733-3744 (2006).
73. Tavian, M. & Peault, B. Analysis of hematopoietic development during human embryonic ontogenesis. *Methods in molecular medicine* **105**, 413-424 (2005).
74. Tavian, M. & Peault, B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. *Experimental hematology* **33**, 1062-1069 (2005).
75. Tavian, M. & Peault, B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *The International journal of developmental biology* **49**, 243-250 (2005).
76. Murry, C.E. & Keller, G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* **132**, 661-680 (2008).
77. Ferkowicz, M.J. & Yoder, M.C. Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Experimental hematology* **33**, 1041-1047 (2005).
78. Ueno, H. & Weissman, I.L. Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Developmental cell* **11**, 519-533 (2006).
79. Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F. & Dzierzak, E. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**, 291-301 (1994).
80. Medvinsky, A. & Dzierzak, E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* **86**, 897-906 (1996).
81. Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F. & Godin, I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* **86**, 907-916 (1996).
82. Godin, I. & Cumano, A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nature reviews. Immunology* **2**, 593-604 (2002).
83. de Bruijn, M.F., Speck, N.A., Peeters, M.C. & Dzierzak, E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *The EMBO journal* **19**, 2465-2474 (2000).
84. Alvarez-Silva, M., Belo-Diabangouaya, P., Salaun, J. & Dieterlen-Lievre, F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* **130**, 5437-5444 (2003).

85. Gekas, C., Dieterlen-Lievre, F., Orkin, S.H. & Mikkola, H.K. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental cell* **8**, 365-375 (2005).
86. Ottersbach, K. & Dzierzak, E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Developmental cell* **8**, 377-387 (2005).
87. Orkin, S.H. & Zon, L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-644 (2008).
88. Dieterlen-Lievre, F., Godin, I.E., Garcia-Porrero, J.A. & Marcos, M.A. Initiation of hemopoiesis in the mouse embryo. *Annals of the New York Academy of Sciences* **718**, 140-146 (1994).
89. Tavassoli, M. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood cells* **17**, 269-281; discussion 282-266 (1991).
90. Lessard, J., Faubert, A. & Sauvageau, G. Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion. *Oncogene* **23**, 7199-7209 (2004).
91. Cheshier, S.H., Morrison, S.J., Liao, X. & Weissman, I.L. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 3120-3125 (1999).
92. Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology* **6**, 93-106 (2006).
93. Ciriza, J., Thompson, H., Petrosian, R., Manilay, J.O. & Garcia-Ojeda, M.E. The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: lessons learned and possible clinical applications. *Experimental hematology* **41**, 411-423 (2013).
94. Zhou, Y., Lewallen, M. & Xie, T. Stem cells' exodus: a journey to immortality. *Developmental cell* **24**, 113-114 (2013).
95. Coskun, S., *et al.* Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell reports* **9**, 581-590 (2014).
96. Zanjani, E.D., Ascensao, J.L. & Tavassoli, M. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* **81**, 399-404 (1993).
97. Ara, T., *et al.* Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* **19**, 257-267 (2003).
98. Papayannopoulou, T., Priestley, G.V., Nakamoto, B., Zafiroopoulos, V. & Scott, L.M. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood* **98**, 2403-2411 (2001).
99. Khan, J.A., *et al.* Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science* **351**, 176-180 (2016).
100. Kunisaki, Y., *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **502**, 637-643 (2013).
101. Shao, L., *et al.* The Wave2 scaffold Hem-1 is required for transition of fetal liver hematopoiesis to bone marrow. *Nature communications* **9**, 2377 (2018).
102. Zhang, J., *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841 (2003).
103. Mendez-Ferrer, S., *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834 (2010).
104. Calvi, L.M., *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
105. Ding, L. & Morrison, S.J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231-235 (2013).
106. Acar, M., *et al.* Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* **526**, 126-130 (2015).
107. Birbrair, A. & Frenette, P.S. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1370**, 82-96 (2016).

108. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G. & Morrison, S.J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-462 (2012).
109. Itkin, T., *et al.* Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* **532**, 323-328 (2016).
110. Kiel, M.J., *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**, 1109-1121 (2005).
111. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988 (2006).
112. Asada, N., *et al.* Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nature cell biology* **19**, 214-223 (2017).
113. Nombela-Arrieta, C., *et al.* Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature cell biology* **15**, 533-543 (2013).
114. Xie, Y., *et al.* Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* **457**, 97-101 (2009).
115. Sugimura, R., *et al.* Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* **150**, 351-365 (2012).
116. Ehninger, A. & Trumpp, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine* **208**, 421-428 (2011).
117. Taichman, R.S. & Emerson, S.G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1677-1682 (1994).
118. Qian, H., *et al.* Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* **1**, 671-684 (2007).
119. Yoshihara, H., *et al.* Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell* **1**, 685-697 (2007).
120. Jung, Y., *et al.* Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* **38**, 497-508 (2006).
121. Wilson, A., *et al.* c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development* **18**, 2747-2763 (2004).
122. Kiel, M.J., Acar, M., Radice, G.L. & Morrison, S.J. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell stem cell* **4**, 170-179 (2009).
123. Bromberg, O., *et al.* Osteoblastic N-cadherin is not required for microenvironmental support and regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **120**, 303-313 (2012).
124. Greenbaum, A.M., Revollo, L.D., Woloszynek, J.R., Civitelli, R. & Link, D.C. N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* **120**, 295-302 (2012).
125. Naveiras, O., *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259-263 (2009).
126. Nilsson, S.K., Johnston, H.M. & Coverdale, J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**, 2293-2299 (2001).
127. Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.A., Sackstein, R. & Down, J.D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5431-5436 (2007).
128. Jang, Y.Y. & Sharkis, S.J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **110**, 3056-3063 (2007).

129. Omatsu, Y., *et al.* The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* **33**, 387-399 (2010).
130. Chute, J.P., *et al.* Molecular profile and partial functional analysis of novel endothelial cell-derived growth factors that regulate hematopoiesis. *Stem cells* **24**, 1315-1327 (2006).
131. Winkler, I.G., *et al.* Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nature medicine* **18**, 1651-1657 (2012).
132. Yamazaki, S., *et al.* Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **147**, 1146-1158 (2011).
133. Yamazaki, S., *et al.* TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* **113**, 1250-1256 (2009).
134. Kumar, S. & Geiger, H. HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends in molecular medicine* **23**, 799-819 (2017).
135. Chou, S. & Lodish, H.F. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7799-7804 (2010).
136. Chen, Q., *et al.* Human fetal hepatic progenitor cells are distinct from, but closely related to, hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem cells* **31**, 1160-1169 (2013).
137. Yong, K.S., *et al.* Human CD34(lo)CD133(lo) fetal liver cells support the expansion of human CD34(hi)CD133(hi) hematopoietic stem cells. *Cellular & molecular immunology* **13**, 605-614 (2016).
138. Lind, J. Changes in the Liver Circulation at Birth. *Annals of the New York Academy of Sciences* **111**, 110-120 (1963).
139. Emery, J.L. Functional Asymmetry of the Liver. *Annals of the New York Academy of Sciences* **111**, 37-44 (1963).
140. Fanni, D., *et al.* Four stages of hepatic hematopoiesis in human embryos and fetuses. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet*, 1-7 (2017).
141. Sasaki, K. & Sonoda, Y. Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Archives of histology and cytology* **63**, 137-146 (2000).
142. Rudolph, A.M. Hepatic and ductus venosus blood flows during fetal life. *Hepatology* **3**, 254-258 (1983).
143. Mavrides, E., Moscoso, G., Carvalho, J.S., Campbell, S. & Thilaganathan, B. The anatomy of the umbilical, portal and hepatic venous systems in the human fetus at 14-19 weeks of gestation. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **18**, 598-604 (2001).
144. Tchirikov, M., Schroder, H.J. & Hecher, K. Ductus venosus shunting in the fetal venous circulation: regulatory mechanisms, diagnostic methods and medical importance. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **27**, 452-461 (2006).
145. Lu, J., Pompili, V.J. & Das, H. Hematopoietic stem cells: ex-vivo expansion and therapeutic potential for myocardial ischemia. *Stem cells and cloning : advances and applications* **3**, 57-68 (2010).
146. Dahlberg, A., Delaney, C., Bernstein, I. D. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **117**, 6083-6090 (2011).
147. Broxmeyer, H.E. Insights into the biology of cord blood stem/progenitor cells. *Cell Prolif* **44 Suppl 1**, 55-59 (2011).
148. da Silva, C.L., Goncalves, R., Crapnell, K. B., Cabral, J. M., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G. A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo

- expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol* **33**, 828-835 (2005).
149. McNiece, I., Harrington, J., Turney, J., Kellner, J., Shpall, E. J. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **6**, 311-317 (2004).
 150. Almeida-Porada, G., Brown, R. L., MacKintosh, F. R., Zanjani, E. D. Evaluation of serum-free culture conditions able to support the ex vivo expansion and engraftment of human hematopoietic stem cells in the human-to-sheep xenograft model. *J Hematother Stem Cell Res* **9**, 683-693 (2000).
 151. Flores-Guzman, P., Fernandez-Sanchez, V. & Mayani, H. Concise review: ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. *Stem cells translational medicine* **2**, 830-838 (2013).
 152. Mayani, H. & Lansdorp, P.M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem cells* **16**, 153-165 (1998).
 153. Piacibello, W., *et al.* Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* **89**, 2644-2653 (1997).
 154. Gilmore, G.L., DePasquale, D.K., Lister, J. & Shadduck, R.K. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* **28**, 1297-1305 (2000).
 155. Tanavde, V.M., *et al.* Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Experimental hematology* **30**, 816-823 (2002).
 156. Mayani, H., Dragowska, W. & Lansdorp, P.M. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* **81**, 3252-3258 (1993).
 157. Flores-Guzman, P., Gutierrez-Rodriguez, M. & Mayani, H. In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of medical research* **33**, 107-114 (2002).
 158. Metcalf, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**, 485-491 (2008).
 159. Douay, L. Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Journal of hematotherapy & stem cell research* **10**, 341-346 (2001).
 160. Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P. & Roberts, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews* **20**, 161-171 (2006).
 161. Kirouac, D.C., *et al.* Cell-cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. *Molecular systems biology* **5**, 293 (2009).
 162. Peerani, R. & Zandstra, P.W. Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering. *The Journal of clinical investigation* **120**, 60-70 (2010).
 163. Choi, Y.S., Lim, D. S., Lim, S. M., Kim, D. I. Effects of mixed feeder cells on the expansion of CD34 cells. *J Biosci Bioeng* **113**, 389-394 (2012).
 164. Tiwari, A., Tursky, M. L., Mushahary, D., Wasnik, S., Collier, F. M., Suma, K., Kirkland, M. A., Pande, G. Ex vivo expansion of haematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood on acellular scaffolds prepared from MS-5 stromal cell line. *J Tissue Eng Regen Med* (2012).
 165. Mortera-Blanco, T., Mantalaris, A., Bismarck, A., Aqel, N., Panoskaltzis, N. Long-term cytokine-free expansion of cord blood mononuclear cells in three-dimensional scaffolds. *Biomaterials* **32**, 9263-9270 (2011).
 166. Mayani, H., Guilbert, L.J. & Janowska-Wieczorek, A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *European journal of haematology* **49**, 225-233 (1992).
 167. Scadden, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075-1079 (2006).
 168. Morrison, S.J. & Spradling, A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598-611 (2008).

169. Nagasawa, T., Omatsu, Y. & Sugiyama, T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends in immunology* **32**, 315-320 (2011).
170. Ando, K., *et al.* Extensive generation of human cord blood CD34(+) stem cells from Lin(-)CD34(-) cells in a long-term in vitro system. *Experimental hematology* **28**, 690-699 (2000).
171. Goncalves, R., *et al.* Kinetic analysis of the ex vivo expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Biotechnology letters* **28**, 335-340 (2006).
172. Rosler, E., Brandt, J., Chute, J. & Hoffman, R. Cocultivation of umbilical cord blood cells with endothelial cells leads to extensive amplification of competent CD34+CD38- cells. *Experimental hematology* **28**, 841-852 (2000).
173. Lewis, I.D., *et al.* Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. *Blood* **97**, 3441-3449 (2001).
174. McNiece, I., Harrington, J., Turney, J., Kellner, J. & Shpall, E.J. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **6**, 311-317 (2004).
175. Robinson, S.N., *et al.* Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone marrow transplantation* **37**, 359-366 (2006).
176. Madkaikar, M., Ghosh, K., Gupta, M., Swaminathan, S. & Mohanty, D. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells. *Acta haematologica* **118**, 153-159 (2007).
177. Fei, X.M., *et al.* Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. *Cytotherapy* **9**, 338-347 (2007).
178. Wagner, W., *et al.* Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem cells* **25**, 2638-2647 (2007).
179. Jang, Y.K., *et al.* Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Annals of hematology* **85**, 212-225 (2006).
180. Lai, E.C. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-973 (2004).
181. Aggarwal, R., Pompili, V.J. & Das, H. Genetic modification of ex-vivo expanded stem cells for clinical application. *Frontiers in bioscience* **15**, 854-871 (2010).
182. Milner, L.A., Kopan, R., Martin, D.I. & Bernstein, I.D. A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* **83**, 2057-2062 (1994).
183. Duncan, A.W., *et al.* Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nature immunology* **6**, 314-322 (2005).
184. Delaney, C., *et al.* Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nature medicine* **16**, 232-236 (2010).
185. Jackson, M., *et al.* HOXB4 can enhance the differentiation of embryonic stem cells by modulating the hematopoietic niche. *Stem cells* **30**, 150-160 (2012).
186. Ge, X. & Wang, X. Role of Wnt canonical pathway in hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology* **3**, 33 (2010).
187. Aguila, J.R., *et al.* SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells. *Blood* **118**, 576-585 (2011).
188. Peled, T., *et al.* Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34+ cells. *British journal of haematology* **116**, 655-661 (2002).

189. Peled, T., *et al.* Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded *ex vivo* with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy* **6**, 344-355 (2004).
190. Madlambayan, G.J., *et al.* Dynamic changes in cellular and microenvironmental composition can be controlled to elicit *in vitro* human hematopoietic stem cell expansion. *Experimental hematology* **33**, 1229-1239 (2005).
191. Madlambayan, G.J., *et al.* Clinically relevant expansion of hematopoietic stem cells with conserved function in a single-use, closed-system bioprocess. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **12**, 1020-1030 (2006).
192. Csaszar, E., *et al.* Rapid expansion of human hematopoietic stem cells by automated control of inhibitory feedback signaling. *Cell stem cell* **10**, 218-229 (2012).
193. Shpall, E.J., *et al.* Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **8**, 368-376 (2002).
194. Jaroscak, J., *et al.* Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with *ex vivo*-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood* **101**, 5061-5067 (2003).
195. de Lima, M., *et al.* Transplantation of *ex vivo* expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone marrow transplantation* **41**, 771-778 (2008).
196. Horn, P.A., *et al.* Lentivirus-mediated gene transfer into hematopoietic repopulating cells in baboons. *Gene therapy* **9**, 1464-1471 (2002).
197. Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N. & Miyajima, A. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *Journal of biochemistry* **149**, 231-239 (2011).
198. Zaret, K.S. From Endoderm to Liver Bud: Paradigms of Cell Type Specification and Tissue Morphogenesis. *Current topics in developmental biology* **117**, 647-669 (2016).
199. Zaret, K.S. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nature reviews. Genetics* **9**, 329-340 (2008).
200. Schmelzer, E., *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1973-1987 (2007).
201. Tanimizu, N. & Miyajima, A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *Journal of cell science* **117**, 3165-3174 (2004).
202. Decaens, T., *et al.* Stabilization of beta-catenin affects mouse embryonic liver growth and hepatoblast fate. *Hepatology* **47**, 247-258 (2008).
203. Clotman, F., *et al.* Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes & development* **19**, 1849-1854 (2005).
204. Huch, M., *et al.* *In vitro* expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* **494**, 247-250 (2013).
205. Huch, M., *et al.* Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* **160**, 299-312 (2015).
206. Nantasanti, S., *et al.* Disease Modeling and Gene Therapy of Copper Storage Disease in Canine Hepatic Organoids. *Stem cell reports* **5**, 895-907 (2015).
207. Turner, R., *et al.* Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* **53**, 1035-1045 (2011).
208. Zhang, L., Theise, N., Chua, M. & Reid, L.M. The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* **48**, 1598-1607 (2008).
209. Kuwahara, R., *et al.* The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* **47**, 1994-2002 (2008).

210. Saxena, R. & Theise, N. Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Seminars in liver disease* **24**, 43-48 (2004).
211. Stachelscheid, H., *et al.* Isolation and characterization of adult human liver progenitors from ischemic liver tissue derived from therapeutic hepatectomies. *Tissue engineering. Part A* **15**, 1633-1643 (2009).
212. Zhou, H., Rogler, L.E., Teperman, L., Morgan, G. & Rogler, C.E. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology* **45**, 716-724 (2007).
213. Schmelzer, E., Wauthier, E. & Reid, L.M. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem cells* **24**, 1852-1858 (2006).
214. McClelland, R., *et al.* Ex vivo conditions for self-replication of human hepatic stem cells. *Tissue engineering. Part C, Methods* **14**, 341-351 (2008).
215. Wang, Y., *et al.* Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* **53**, 293-305 (2011).
216. Wang, Y., *et al.* Paracrine signals from mesenchymal cell populations govern the expansion and differentiation of human hepatic stem cells to adult liver fates. *Hepatology* **52**, 1443-1454 (2010).
217. Turner, W.S., *et al.* Nuclear magnetic resonance metabolomic footprinting of human hepatic stem cells and hepatoblasts cultured in hyaluronan-matrix hydrogels. *Stem cells* **26**, 1547-1555 (2008).
218. Kubota, H. & Reid, L.M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12132-12137 (2000).
219. Kubota, H., Yao, H.L. & Reid, L.M. Identification and characterization of vitamin A-storing cells in fetal liver: implications for functional importance of hepatic stellate cells in liver development and hematopoiesis. *Stem cells* **25**, 2339-2349 (2007).
220. Turner, W.S., *et al.* Human hepatoblast phenotype maintained by hyaluronan hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **82**, 156-168 (2007).
221. Theise, N.D., *et al.* The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* **30**, 1425-1433 (1999).
222. Tan, J., *et al.* Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases. *Liver* **22**, 365-373 (2002).
223. Alvaro, D., *et al.* Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology* **132**, 415-431 (2007).
224. Glaser, S., *et al.* Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World journal of gastroenterology : WJG* **12**, 3523-3536 (2006).
225. Alvaro, D., *et al.* Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *The Journal of clinical investigation* **100**, 1349-1362 (1997).
226. Ueno, Y., *et al.* Evaluation of differential gene expression by microarray analysis in small and large cholangiocytes isolated from normal mice. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **23**, 449-459 (2003).
227. LeSage, G.D., *et al.* Acute carbon tetrachloride feeding induces damage of large but not small cholangiocytes from BDL rat liver. *The American journal of physiology* **276**, G1289-1301 (1999).
228. Mancinelli, R., *et al.* After damage of large bile ducts by gamma-aminobutyric acid, small ducts replenish the biliary tree by amplification of calcium-dependent signaling and de novo acquisition of large cholangiocyte phenotypes. *The American journal of pathology* **176**, 1790-1800 (2010).

229. Sigal, S.H., *et al.* Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *The American journal of physiology* **276**, G1260-1272 (1999).
230. Roskams, T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* **25**, 3818-3822 (2006).
231. Richardson, M.M., *et al.* Progressive fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: association with altered regeneration and a ductular reaction. *Gastroenterology* **133**, 80-90 (2007).
232. Marshall, A., *et al.* Relation between hepatocyte G1 arrest, impaired hepatic regeneration, and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **128**, 33-42 (2005).
233. Raven, A., *et al.* Corrigendum: Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature* **555**, 402 (2018).
234. Lancaster, M.A. & Knoblich, J.A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **345**, 1247125 (2014).
235. Medvinsky, A. & Livesey, F.J. On human development: lessons from stem cell systems. *Development* **142**, 17-20 (2015).
236. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P. & Duncan, S.A. Organogenesis and development of the liver. *Developmental cell* **18**, 175-189 (2010).
237. Navarro-Alvarez, N., Soto-Gutierrez, A. & Kobayashi, N. Hepatic stem cells and liver development. *Methods in molecular biology* **640**, 181-236 (2010).
238. Ader, M. & Tanaka, E.M. Modeling human development in 3D culture. *Current opinion in cell biology* **31**, 23-28 (2014).
239. Chistiakov, D.A. Liver regenerative medicine: advances and challenges. *Cells, tissues, organs* **196**, 291-312 (2012).
240. Baptista, P.M., *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* **53**, 604-617 (2011).
241. Vyas, D., *et al.* Self-assembled liver organoids recapitulate hepatobiliary organogenesis in vitro. *Hepatology* (2017).
242. Maher, J.J. & Bissell, D.M. Cell-matrix interactions in liver. *Seminars in cell biology* **4**, 189-201 (1993).
243. Takebe, T., *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**, 481-484 (2013).
244. Mokhtari, S., *et al.* Evaluating Interaction of Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor Cells with Functionally Integrated Three-Dimensional Microenvironments. *Stem cells translational medicine* **7**, 271-282 (2018).

CAPÍTULO 1

**ESTUDIO PROTEÓMICO COMPARATIVO
DE LA COMPOSICION DE LA MATRIZ
EXTRACELULAR HEPÁTICA PORCINA
FETAL Y ADULTA DESCELULARIZADA**

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, tanto el campo de la medicina regenerativa como el de la ingeniería de tejidos han registrado importantes avances gracias al uso de diferentes métodos de descelularización de tejidos y de órganos, permitiendo el trabajo con distintas ECM¹⁻⁶.

La ECM es un ambiente dinámico y altamente complejo compuesto por todos los productos secretados por las células residentes en cada tejido y órgano. Estos productos se pueden clasificar en 3 clases de biomoléculas: proteoglicanos, proteínas especializadas (LN, FN...) y proteínas estructurales (COL, elastina (EL)...). Estas biomoléculas proporcionan una ultraestructura única para cada tejido, además de mantener y condicionar el comportamiento y el fenotipo celular. Por todas estas razones, la ECM representa un excelente biomaterial para la bioingeniería de órganos y tejidos^{7,8}.

Centrándonos en el hígado, el número de técnicas de descelularización y tratamientos disponibles actualmente es muy amplio. Estos procedimientos pueden ser clasificados en tres categorías dependiendo de los agentes empleados: químicos (solución alcalina/ácida, solución hipotónica/hipertónica, detergentes no iónicos, iónicos y zwitteriónicos), enzimáticos (tripsina, endonucleasas) y físicos (agitación mecánica, ciclos de congelación y descongelación)⁹. Normalmente estos métodos son usados en combinación para intentar lograr la máxima eficiencia del proceso de descelularización¹⁰⁻¹³. Aunque el objetivo del proceso de descelularización es preservar la composición y la ultraestructura 3D de la ECM, se sabe que la mayoría de las técnicas de descelularización producen rotura y pérdida de la estructura y composición del *scaffold*.

Durante estos últimos años, han sido varios los grupos que han ido mejorando las distintas técnicas de descelularización (Tabla 1). En 2010, Uygun *et al.* llevaron a cabo la descelularización de hígados procedentes de ratas isquémicas. Para ello, perfundieron distintas concentraciones de Dodecilsulfato sódico (SDS) a través de la PV: 0.01% durante 24 h seguido de 0.1% SDS durante 24 h y 1% SDS durante 24 h. Tras el proceso, los autores obtuvieron un *scaffold* totalmente transparente y descelularizado⁴. A continuación, Baptista *et al.* descelularizaron distintos modelos de animales (ratones,

ratas, hurones, conejos y cerdos). Emplearon un procedimiento distinto de perfusión en función del tamaño y estructura del hígado, el cual se basaba en la perfusión de agua destilada a través de la PV seguido de 1% Tritón X-100 con 0.1% Hidróxido de amonio^{1,2,14}. Tras el proceso de descelularización, el parénquima hepático era transparente haciendo visible el árbol vascular visible¹. Ese mismo año, De Kock *et al.* lograron descelularizar hígados de rata en 60 min a través de la perfusión por la VP con un detergente suave. Perfundieron durante 30 min una solución al 1% de Tritón, seguido de una solución al 1% SDS durante 30 min¹⁵. Soto-Gutiérrez *et al.* para obtener hígados de rata descelularizados emplearon una combinación agentes enzimáticos, biológicos y mecánicos¹⁶. El proceso fue llevado a cabo a través de la vena cava (CV) (perfusión retrógrada) comenzando con una solución al 0.02% Tripsina/0.05% Ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) durante 2 h a 37°C. Posteriormente, perfundieron agua desionizada y una solución tamponada con fosfatos (PBS) seguido de 3% Tritón X-100/0.05% EGTA durante 18-24 h. Tras esto, el hígado fue lavado con agua y PBS y perfundido con 0.1% (v/v) Ácido peracético/4% Etanol durante 1 h. Finalmente, el tejido fue neutralizado con PBS y agua desionizada. Con este proceso no solo consiguieron preservar la macroestructura y ultraestructura 3D, sino también hasta el 50% de los factores de crecimiento. Más recientemente, Mazza *et al.* publicaron un protocolo para llevar a cabo la descelularización del lóbulo hepático izquierdo humano en tan solo 14 días, o el hígado completo en 6 semanas. En ambos casos, el protocolo comenzaba con una etapa de congelación/descongelación. Tras esto, se procedía a una perfusión por la vena hepática (HV) y por la vena cava inferior (ICV). En el caso de lóbulo izquierdo, cada día era perfundido un agente diferente. La combinación de reactivos empleados estuvo compuesta por agua destilada, 0,0025% Tripsina-Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 3% Tritón X-100, 0,01 %, 0,1%, y 1% SDS, PBS/5% antibiótico antimicótico, 0,01% Ácido peracético/4% Etanol. Finalmente, era perfundido PBS. En el caso del hígado completo, el procedimiento era completamente igual pero estaba compuesto por con tres ciclos, de tal manera que el protocolo duraba 6 semanas¹¹.

Primer Autor	Protocolo de Descelularización			Flujo	Modelo animal	Referencia
	Agentes físicos	Agentes químicos	Agentes biológicos			
Uygun	-80°C 4 h	SDS	-	VP	Ratas	4
De Kock	-	TX100 y SDS	-	VP	Ratas	15
Baptista	-80°C 24 h	TX100 + NH ₄ OH	-	VP	Ratones, ratas, hurones, conejos y cerdos	1
Soto-Gutiérrez	-80°C 24 h	TX100	Tripsina y EGTA	VCI	Ratas	16
Mazza	-80°C 24 h	TX100 and SDS	Tripsina-EDTA	VH and VCI	Humanos	11

NH₄OH: Hidróxido de amonio; TX100: Tritón X-100;

Tabla 1: Resumen de los trabajos más relevantes en el campo de la descelularización hepática.

Las técnicas de descelularización representan, hoy en día, una técnica bastante popular para generar *scaffolds* de manera natural. La principal ventaja de esta técnica reside en la preservación de la ultraestructura y de la composición de la ECM nativa. Además, en el caso de una descelularización hepática, se produce una preservación de la red vascular y del sistema de conductos biliares^{1,2,17}. Estas propiedades convierten a los *scaffolds* en una nueva herramienta muy poderosa, puesto son capaces de recrear e imitar el microambiente hepático.

Hoy en día, las estructuras 3D generadas a partir de la ECM han demostrado proporcionar un excelente entorno para el crecimiento de múltiples células hepáticas *in vitro*¹⁸. Pueden ser recelularizados con diferentes tipos celulares (parenquimatosas y no parenquimatosas, células progenitoras fetales, líneas celulares inmortalizadas o iPSC) con el objetivo de crear órganos funcionales capaces de ser trasplantados en animales receptores y, a largo plazo, en pacientes con insuficiencia hepática terminal^{17,19}. Además, estos organoides hepáticos también pueden ser considerados como una posible herramienta para evaluar los cambios celulares que conducen a la tumorigénesis y a la progresión del cáncer o para la detección y el análisis de nuevos fármacos.

Por otra parte, para la implementación clínica de la ingeniería tisular basada en *scaffolds* descelularizados, es crucial comprender el proceso de eliminación tanto celular como de material inmunogénico del tejido donante. Los criterios actuales para evaluar la descelularización de un órgano completo se basan principalmente en la presencia o no de ácidos nucleicos, ya que éstos son fáciles de cuantificar. No obstante, pueden existir numerosas proteínas con efectos inmunogénicos por lo que sería recomendable poder cuantificarlas y así poder determinar la eficacia del proceso de descelularización. Con este objetivo, Li *et al.* realizaron un análisis proteómico en cuatro tipos de *scaffolds* biológicos²⁰. Aunque revelaron una eliminación significativa de las proteínas celulares, identificaron un gran número de proteínas remanentes además de una alta preservación de la mayoría de las proteínas estructurales de la ECM. Por lo tanto, la eliminación del DNA no asegura una eliminación total del material celular, haciendo necesario un análisis proteómico para caracterizar mejor el proceso de descelularización²¹.

Finalmente, es también importante caracterizar que proteínas extracelulares permanecen en estos *scaffolds* después de la descelularización para mejor entender el microambiente a que las células sembradas van a estar expuestas y así percibir su comportamiento. En esta línea, y con el objetivo de generar hígados fetales de bioingeniería, se analizarán las diferencias entre el proteoma de la ECM de hígados fetales y adultos descelularizados y su potencial impacto en la hematopoyesis y eritropoyesis fetal.

OBJETIVOS

Actualmente, la base molecular y celular del nicho hepático fetal sobre la cual las HSPC experimentan una gran expansión y diferenciación durante el desarrollo embrionario hasta el final del segundo trimestre, no se encuentra totalmente caracterizada.

Con el objetivo de intentar caracterizar un poco más el microambiente hepático fetal, se pretende llevar a cabo un estudio proteómico de la ECM. Para ello, a partir de hígados fetales y adultos porcinos descelularizados, se realizará un estudio proteómico comparativo entre las dos matrices con el fin de identificar nuevas moléculas con un papel potencial sobre la hematopoyesis fetal.

Por lo tanto, los objetivos de este capítulo son los siguientes:

- 1- Estudio de la hematopoyesis fetal porcina.
- 2- Descelularización eficaz de hígados fetales y adultos.
- 3- Estudio comparativo de la ECM entre hígados fetales y adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio de la hematopoyesis fetal porcina

La gestación porcina son tres meses, tres semanas y tres días o lo que es lo mismo aproximadamente 115 días. Teniendo en cuenta la descripción de los cuatro estadios hematopoyéticos en humanos²², el culmen de la hematopoyesis fetal humana se localiza en el Estadio III comenzando en la semana trece y terminando sobre la semana veintidós. Esto correspondería, más o menos, entre el día 40 y día 64 de la gestación porcina. Por lo tanto, para conocer con mayor precisión el día de gestación con una mayor hematopoyesis/eritropoyesis, se llevó a cabo un estudio sobre la hematopoyesis porcina. Sin embargo, debido a la inmadurez y poca consistencia de los tejidos y en concreto del hígado, el estudio hematopoyético se llevó a cabo entre los días 60 y 81 de gestación.

Para ello, se recogieron distintas muestras procedentes de abortos espontáneos pertenecientes a los 60, 72 y 81 días de gestación en fincas productoras de estos animales. Además, se añadió al estudio un neonato muerto de 115 días.

Recolección de las muestras hepáticas porcinas

Se llevó a cabo una incisión abdominal de manera longitudinal y se diseccionó un trozo de hígado sobre las distintas muestras a los 60, 72, 81 y 115 días de gestación.

Se estudió también si realmente existían diferencias significativas entre los distintos lóbulos hepáticos. Para ello, se recolectaron muestras de los distintos lóbulos (lóbulo izquierdo, lóbulo izquierdo central, lóbulo derecho central y lóbulo derecho) de fetos de 72 días de gestación.

Fijación y procesamiento

Las muestras se fijaron con para-formaldehído (PFA) al 4% durante toda la noche a temperatura ambiente (RT). A continuación, se procesaron en un procesador de tejidos (Sakura, Tissue-Tek Xpress x50), se embebieron en Parafina (Thermo Fisher, 6774060) y se montaron en un *cassette* (Simport, M498). Las muestras se cortaron con un grosor de 3 μ m en un microtomo (Thermo Scientific, HM 355S).

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Las muestras se tiñeron con Hematoxilina (Sigma, 517-28-2) y Eosina (Sigma, E4009) siguiendo la siguiente secuencia: Xileno (Merck, 108685), Etanol 100 % (Thermo Fisher, BP2818), Etanol 96 % (Thermo Fisher, 15518181), Etanol 70 % (Thermo Fisher, 15420665), Agua corriente, Hematoxilina, Agua corriente, Eosina, Etanol 70 %, Etanol 96 %, Etanol 100 % y Xileno. Finalmente, las muestras se montaron con Medio de montaje (Eukitt, 920100) y se analizaron al microscopio (Leica DM 2500).

2. Descelularización de hígados porcinos

Para el estudio de la ECM, se llevó a cabo la descelularización de hígados porcinos fetales (72 días de gestación) e hígados porcinos adultos (30-40 kg). En cada caso se seleccionó el método de descelularización más adecuado, con el objetivo de eliminar la mayor parte de los compuestos celulares y preservar al máximo la composición y arquitectura de las ECM nativa.

Estos agentes de descelularización incluyeron agua destilada hipotónica para lizar las células por choque osmótico; Cloruro de sodio para mantener las condiciones fisiológicas; Tritón X-100 (detergente no iónico) y SDS (detergente aniónico) para alterar las interacciones proteína-DNA, lípido-proteína, lípido-lípido y proteína-proteína; e hidróxido de sodio para lizar las membranas celulares¹.

2.1 Descelularización de hígados porcinos fetales

Los fetos usados fueron obtenidos a partir de abortos espontáneos en fincas productoras y en animales sacrificados usados en las clases de Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza (n=3).

Se llevó a cabo una incisión abdominal de manera longitudinal y se cortó transversalmente la UV. Una vez visualizado el hígado, se diseccionó y se cortó transversalmente la PV, al igual que los ligamentos falciformes y cardíacos. A continuación, se seccionó la CV por arriba y por debajo del hígado. Finalmente, se eliminó cualquier tipo de adhesión con el hígado y se extrajo con la cápsula intacta. Se canularon la PV y la UV con una cánula de 20 G (BD, BD393224). Antes de comenzar la descelularización del hígado, se vació y lavo la vesícula biliar para eliminar cualquier contenido biliar y conseguir una mejor descelularización.

Las cánulas de la PV y de la UV fueron conectadas a una bomba peristáltica (Masterflex L/S, Cole Parmer) mediante unos tubos de silicona L/S14 (Cole Parmer, 96410-14). Para el proceso de descelularización, primero se lavó el hígado con Agua miliQ a 0,6 mL/min durante aproximadamente 2 h a 4°C. Posteriormente, se perfundió alrededor de 1,5-2 L de 1% Tritón X-100 (Panreac, A1388) con 0,1% Hidróxido de amonio (Panreac, 1411301612) a 0,6 mL/min a 4°C. A continuación, se realizó un lavado de 500 mL con Cloruro de sodio 3,4M (Panreac, 131659) en Agua miliQ y finalmente un lavado de 3-4 L al 0,9 % en Agua miliQ a 4°C, con el objetivo de retener la mayor cantidad de COL. El volumen del último lavado depende de la cantidad de detergente que se haya pasado, de tal manera que se usa el doble para eliminarlo. Las muestras se fijaron, se procesaron y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) (*véase sección 1.1*).

Extracción y cuantificación del DNA

Para verificar el proceso de descelularización se llevó a cabo la cuantificación del DNA remanente. Para ello, se aislaron 3 muestras procedentes de *bioscaffolds* distintos y otras 3 de hígados nativos.

Reactivos:

FGF2

30 mM Tris-HCl (Sigma T5941) pH 8,5; 40% (m/v); GuHCl (Sigma, G3272); 30 mM EDTA (Sigma, E6758).

Las muestras se liofilizaron (LyoQuest, Telstar) durante 24 h y a continuación, se pesaron. Se procedió a la digestión del tejido con FG2 + Proteinasa Q (Qiagen, 19157) y se incubaron las muestras durante toda la noche a 65°C. Al día siguiente, se añadió Isopropanol (Panreac, 131090) y se centrifugó a 10.000xg 5 min a RT. Se lavó el pellet con Etanol 70% y se centrifugó a 10.000xg 5 min a RT. Se dejó secar el pellet un par de minutos, se añadió Tris (Sigma, T6066) 10 mM pH=8 y se incubó a 65°C durante aproximadamente 1 h para facilitar la rehidratación de las muestras. Finalmente se cuantificó la cantidad de DNA en el Nanodrop (ThermoScientific, Nanodrop 2000) y se almacenó a 4°C. El ratio 260/280 de las absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm indican la pureza del DNA obtenido y el valor del ratio 260/280 debe estar entre 1,7 y 2,0.

2.2 Descelularización de hígados porcinos adultos

La descelularización de hígados porcinos adultos se llevó a cabo a partir de muestras cadavéricas de entre 30-40 kg (n=3).

Se llevó a cabo una incisión abdominal de manera longitudinal y una vez visualizado el hígado, se diseccionó y se cortó transversalmente la PV, al igual que los ligamentos falciformes y cardíacos. Por su parte, la CV se seccionó por arriba y por debajo del hígado. Finalmente, cualquier adhesión con el hígado fue eliminada y fue extraído con la cápsula intacta. Se canuló la PV con un *fitting* PP 6,4 mm (Masterflex, 30612-55). Debido a las grandes dimensiones de los hígados adultos, para llevar a cabo la descelularización, se realizó una hepatectomía. Para ello, se ligaron los pedículos del segmento central (incluida la vesícula) y de los segmentos laterales izquierdos y de las venas suprahepáticas. Una vez ligado todo, se seccionó y se obtuvo el lóbulo derecho intacto. Se conectó el *fitting* de la PV a la misma bomba peristáltica usada anteriormente mediante unos tubos de silicona L/S17 (Cole Parmer, 96410-17). Para el proceso de descelularización, primero se lavó el hígado con 2 L de Agua miliQ a 100 mL/min a RT. Posteriormente, se perfundió alrededor de 25-30 L de 1% SDS (Sigma, L5750) con 0,1 % Hidróxido de amonio a RT. A continuación, se realizó un lavado de 2 L con Cloruro de sodio 3,4 M en Agua miliQ y finalmente un lavado de 50-60 L al 0,9% en Agua miliQ a RT. El volumen del último lavado depende de la cantidad de detergente que se haya pasado, de tal manera que se usa el doble para eliminarlo. Las muestras se fijaron, se procesaron y se tiñeron con H&E (*véase sección 1.1*). Finalmente, se llevó a cabo la extracción y cuantificación del DNA remanente en las muestras (*véase sección 2.1*).

3. Estudio Proteómico

El estudio proteómico de la ECM de los hígados porcinos fetales y adultos porcinos se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biología Experimental y Tecnológica (Oeiras, Portugal).

Generación de la biblioteca espectral de referencia

Para la generación de la biblioteca espectral, se usó 3 µg de cada muestra proteica para el análisis dependiente de la adquisición de información (IDA) gracias a un NanoLC-MS

para lo cual se empleó un TripleTOF 6600 (ABSciex, Framingham, MA, EE. UU.). La fase inversa del NanoLC se llevó a cabo con una configuración de trampa y elución para lo cual se utilizó una columna Nano cHiPLC Trap (200 μm \times 0.5 mm ChromXP C18-CL 3 μm 120 Å) y una nano-columna (75 μm \times 15 cm ChromXP C18-CL 3 μm 120 Å) usando Agua + 0.1% Ácido fórmico (solvente A) y Acetonitrilo + 0.1% Ácido fórmico (solvente B).

Las muestras se inyectaron en la columna de carga a una velocidad de flujo de 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 10 min usando 100% de solvente A. La separación de péptidos se realizó en la nano-columna a un caudal de 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ con un gradiente lineal del solvente B (5%-30%) durante 120 min.

Las muestras se sometieron a dos ciclos de IDA. El espectrómetro de masas se ajustó para la exploración IDA de espectros completos (400-2000 m/z) durante 250 ms, donde se seleccionaron los 40 iones superiores para exploraciones posteriores de MS/MS (150-1800 m/z durante 50 ms cada uno), durante un total de ciclo de 2,3 s. Se incluyó como criterio de selección para los *parent ions* un estado de carga entre +2 y +5 y con una contaje superior al límite mínimo de 125 por segundo. Los iones se excluyeron del análisis posterior de MSMS durante 12 s. La fragmentación se realizó utilizando energía de colisión rodante con una dispersión de energía de colisión de 5.

La biblioteca espectral se creó combinando todos los archivos IDA brutos utilizando el software ProteinPilotTM (v5.0 ABSciex) con el algoritmo Paragorn con los siguientes parámetros de búsqueda: búsqueda en la base de datos *Sus scrofa (pig)* no revisada de Uniprot / SwissProt (versión 2018_02), digestión con tripsina, alquilación de las cisteínas con yodoacetamida, en un esfuerzo para la identificación de proteínas. Se realizó también una *false discovery rate analysis*. El resultado de estas búsquedas dio lugar a un archivo el cual fue usado como la biblioteca espectral de referencia. Solo se consideraron las proteínas con un FDR global <1% (1275 proteínas).

Análisis SWATH y Extracción de Datos Diana

Para el análisis cuantitativo, se sometieron 3 μg de cada muestra a 4 adquisiciones SWATH (*Sequential Windowed data independent Acquisition of the Total High-resolution Mass Spectra*). Se emplearon las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente para la IDA. El espectrofotómetro de masas operó en la adquisición

independiente de datos de productos iónicos cíclicos. Se utilizó una calculadora de variables (AB SCIEX) y el editor de métodos SWATH (AB SCIEX) para configurar la adquisición de SWATH. Se construyó un conjunto de 32 ventanas superpuestas (conteniendo 1 m/z por cada superposición de ventana) cubriendo el rango de masas del precursor de 400–1200 m/z. Se adquirió una exploración de 50 ms al inicio de cada ciclo y se recogieron los espectros SWATH MS/MS durante 96 ms, dando como resultado un tiempo de ciclo de 3,172 s. Se utilizó una *rolling collision energy* con una dispersión de energía de colisión de 15. La alineación espectral y la extracción de datos específicos de las muestras de DIA se realizaron utilizando PeakView v.2.1 (AB SCIEX, Framingham, EE. UU.) con la biblioteca espectral de referencia. Para la extracción de datos se usaron los siguientes parámetros: cinco péptidos/proteína, cinco transiciones/péptido, nivel de confianza del péptido > 95%, umbral FDR del 1%, péptidos compartidos excluidos y ventana de extracción XIC de 6 min y ancho establecido a 20 ppm. Para XIC, la ventana de extracción fue de 6 min y el ancho de 20 ppm.

El análisis estadístico se analizó en el software MarkerView (versión 1.2.1). Los datos se normalizaron usando la suma total del área.

RESULTADOS

1. Caracterización de la hematopoyesis fetal porcina

Como se muestra en la Figura 1, a los 60 días de gestación se observa una gran colonización de las células hematopoyéticas llegando a ocupar hasta el 70% del parénquima hepático, tal y como se había descrito en humanos durante el Estadio III. En cambio, a los 72 y 81 días de gestación, se observa una involución de la hematopoyesis, donde la distancia entre los distintos focos comienza a ser cada vez mayor. Finalmente, tras el nacimiento la presencia de estos focos empieza a ser cada vez menor (115 días).

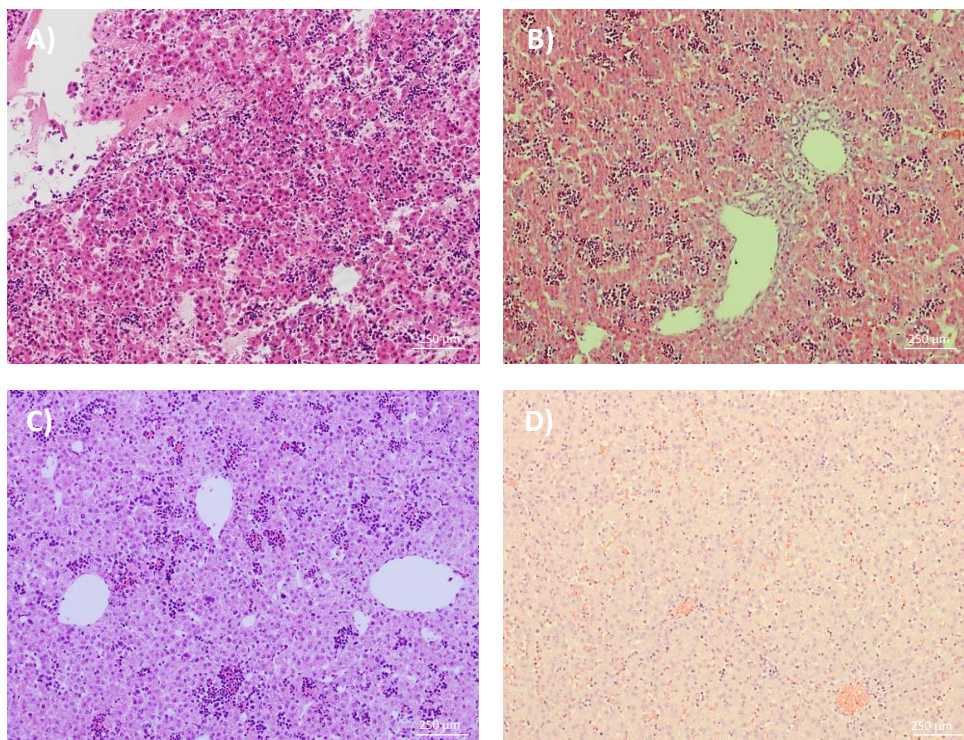


Figura 1: Representación esquemática de la hematopoyesis porcina fetal. A) 60 días de gestación, B) 72 días de gestación, C) 81 días de gestación y D) Neonato (115 días de gestación).

A continuación, se estudió la hematopoyesis en función de los lóbulos hepáticos (Figura 2). Aunque varios autores han descrito que durante el desarrollo embrionario el lóbulo hepático derecho posee una mayor actividad hematopoyética que el lóbulo izquierdo²³, debido en parte al menos aporte de flujo sanguíneo²⁴, en este estudio no se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la formación y número de los focos hematopoyéticos.

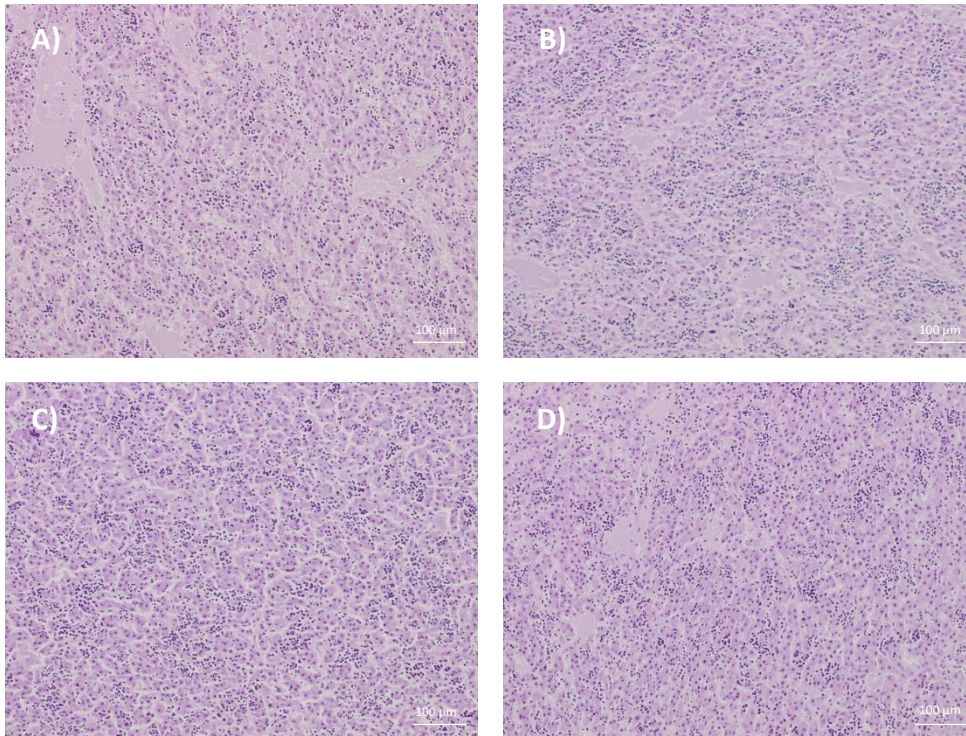


Figura 2: Hematopoyesis fetal porcina en los distintos lóbulos hepáticos a los 72 días de gestación. A) Lóbulo izquierdo, B) Lóbulo central izquierdo, C) Lóbulo central derecho y D) Lóbulo central izquierdo.

2. Descelularización de hígados porcinos

Tras el proceso de descelularización de los hígados fetales y adultos porcinos se obtuvieron los *scaffolds* correspondientes, donde el parénquima hepático quedó totalmente transparente haciendo visible el árbol vascular (Figura 3).

Tras la descelularización de los hígados porcinos fetales y adultos, las H&E mostraron una descelularización total del tejido. Como se puede observar en la Figura 4, no existen signos de presencia celular, aunque es posible observar varias estructuras vasculares.

La cuantificación del DNA se llevó a cabo para evaluar la eficacia del proceso de descelularización de manera cuantitativa. En la Figura 5 se representa la cantidad de DNA (ng) obtenido por mg de muestra. De esta manera se observa, tanto en las muestras fetales como adultas, un descenso significativo de la cantidad de DNA en las muestras descelularizadas, obteniendo un 93,92% y 99,32% de descelularización en las muestras fetales y adultas, respectivamente (Figura 5).

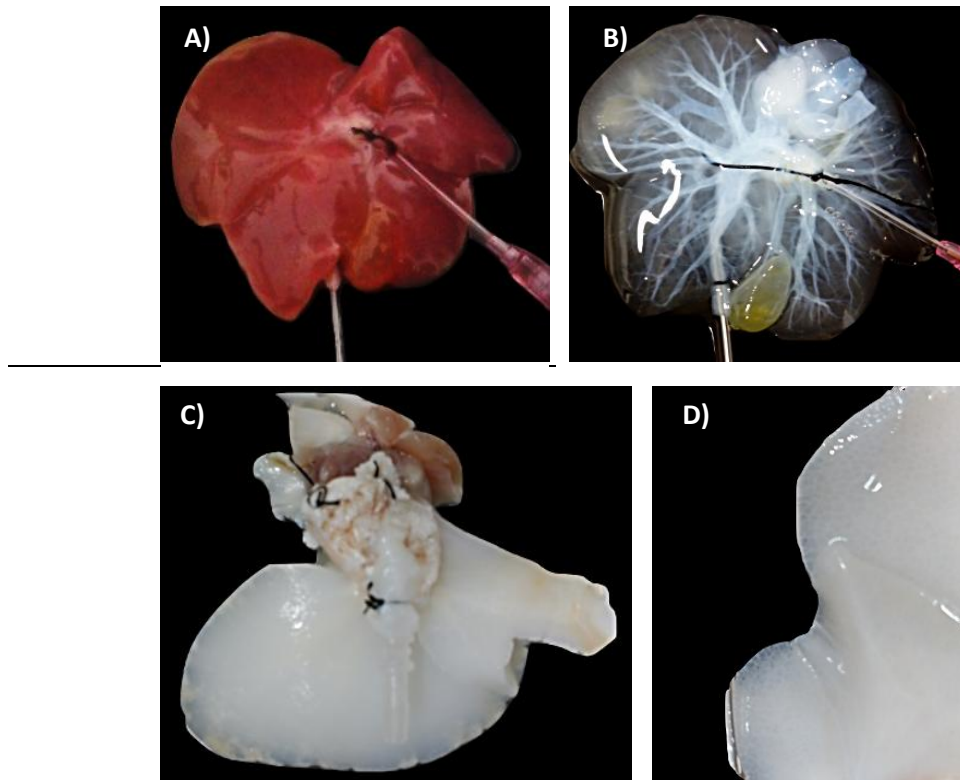


Figura 3: Descelularización de hígados porcinos. A) Hígado fetal nativo, B) Hígado fetal descelularizado, C) y D) Hígado adulto descelularizado.

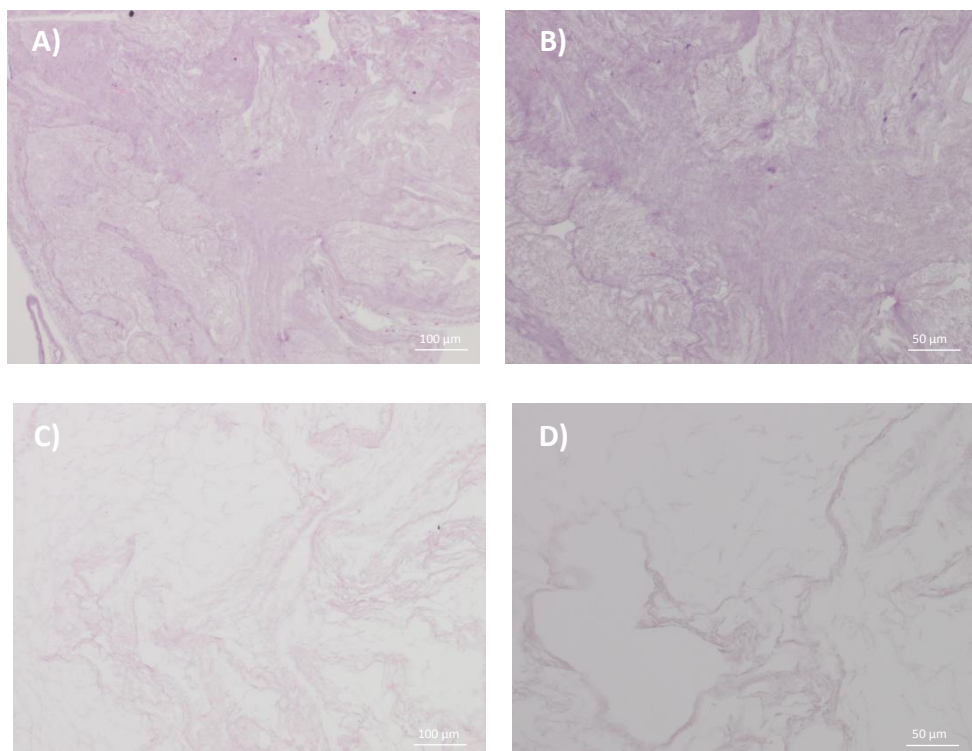


Figura 4: H&E de los hígados porcinos descelularizados. A) y B) Hígado fetal, C) y D) Hígado adulto.

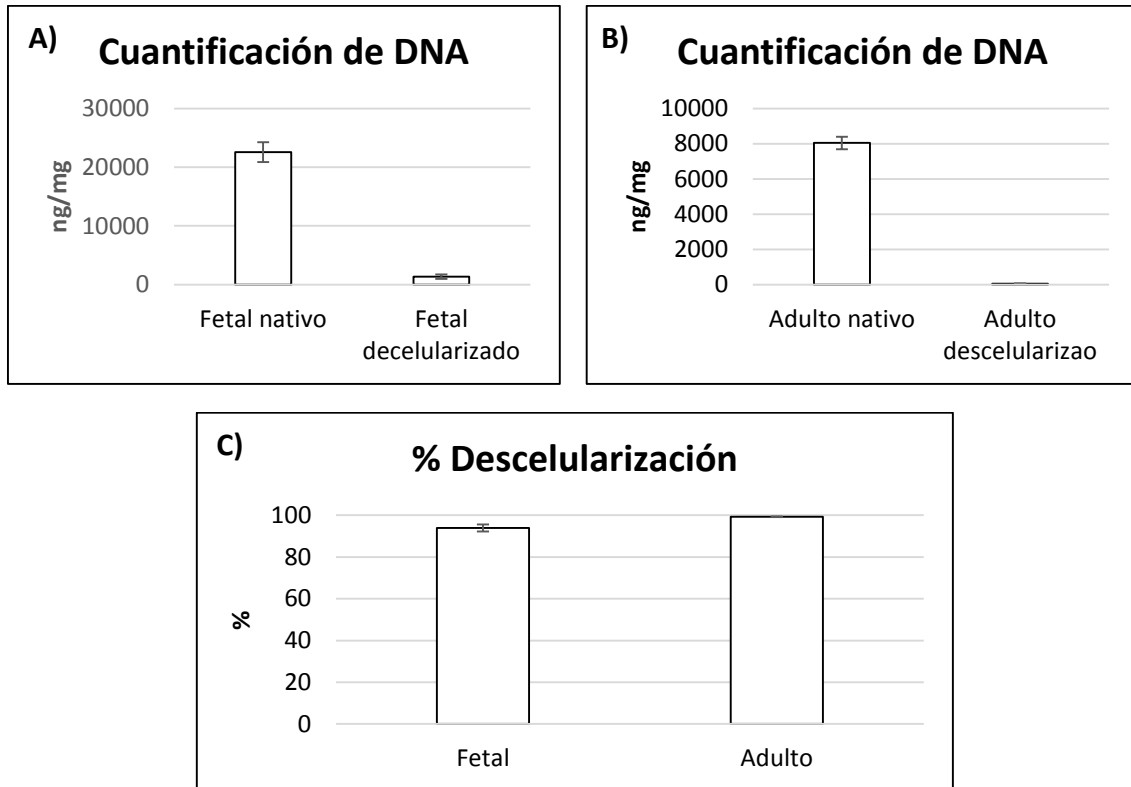


Figura 5: Cuantificación DNA. A) Muestras fetales, B) Muestras adultas y C) Porcentaje de descelularización.

3. Estudio Proteómico

El análisis proteómico de la ECM y de las proteínas asociadas a la ECM, conocidas colectivamente como el matrisoma, es una tarea desafiante debido a la complejidad inherente y la insolubilidad de estas proteínas. Tras la generación de la biblioteca espectral, se reportó la presencia de 233 proteínas en el hígado fetal porcino, mientras que 165 fueron identificadas en el adulto y 172 estuvieron presentes en ambas (Figura 6). Tras el proceso de descelularización, 421 proteínas, 308 en el adulto y 313 en ambas matrices (Figura 7). En la Figura 8, 9 y 10, se puede observar una comparación sobre la distinta presencia de proteínas entre las cuatro matrices.

La presencia de más proteínas en las muestras descelularizadas en comparación con las nativas, puede ser debido a la inyección de menor material o a la presencia de contaminantes, lo cual puede obstaculizar la ionización de los péptidos debido a los efectos de competencia de carga, detectándose menos péptidos y por lo tanto, identificándose menos proteínas.

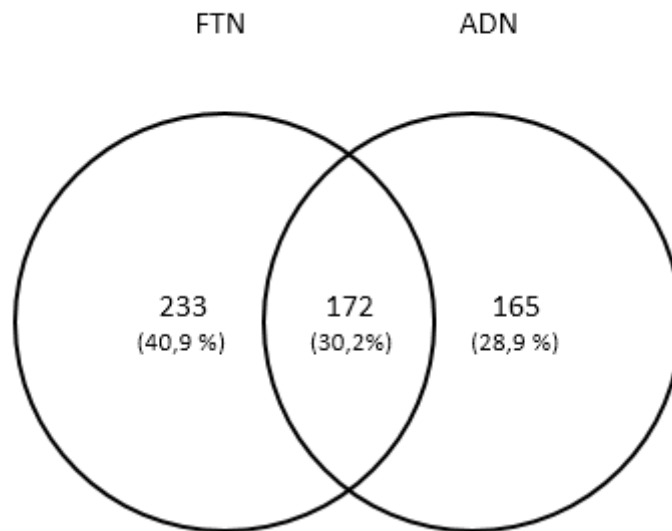


Figura 6: Número de proteínas identificadas en la ECM nativa porcina fetal (FTN) y adulta (ADN).

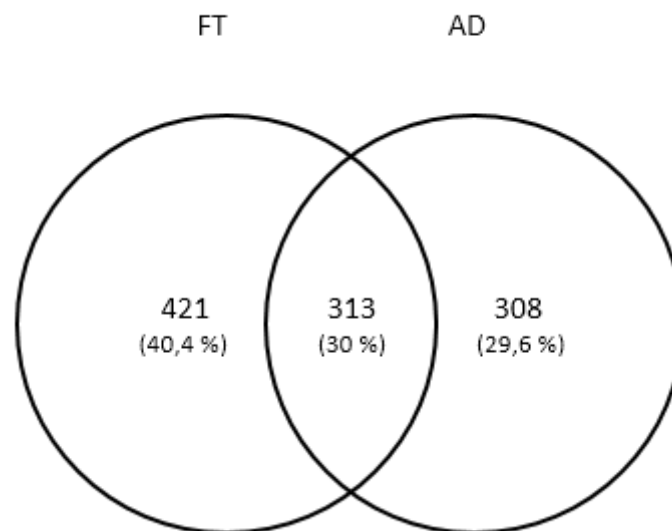


Figura 7: Número de proteínas identificadas en la ECM descelularizadas porcina fetal (FT) y adulta (AD).

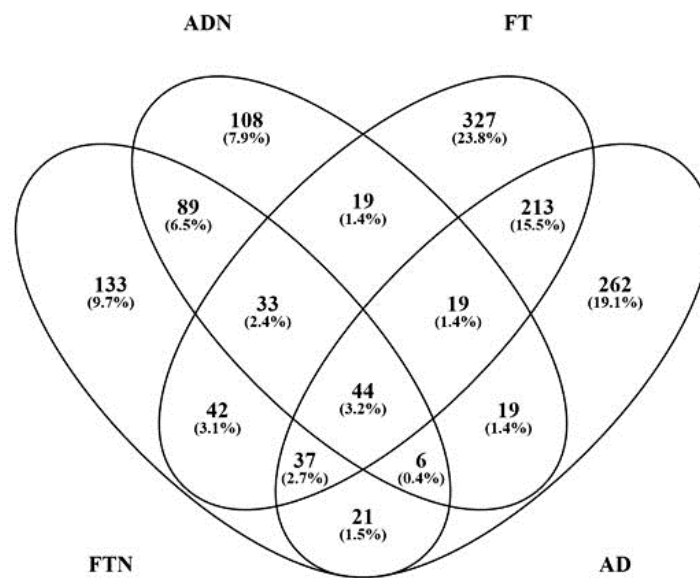


Figura 8: Comparación del número de proteínas entre las cuatro matrices.

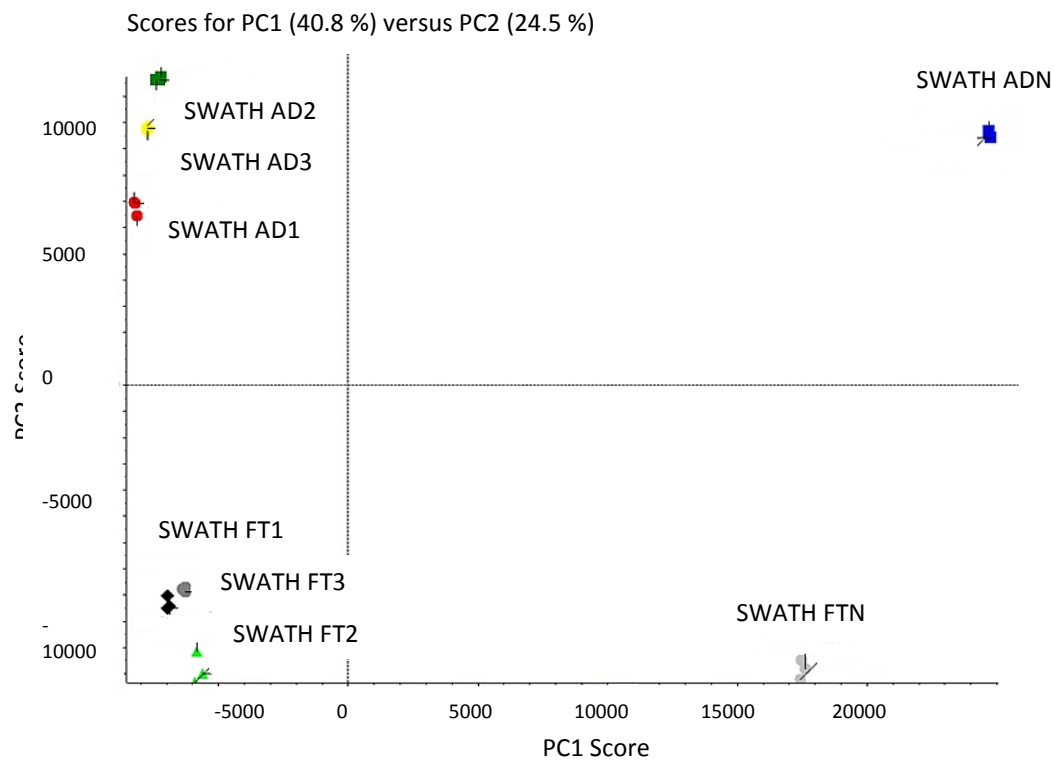


Figura 9: Análisis de componentes principales entre las cuatro matrices. AD: ECM adulta, ADN: ECM adulta nativa, FT: ECM fetal y FTN: ECM fetal nativa.

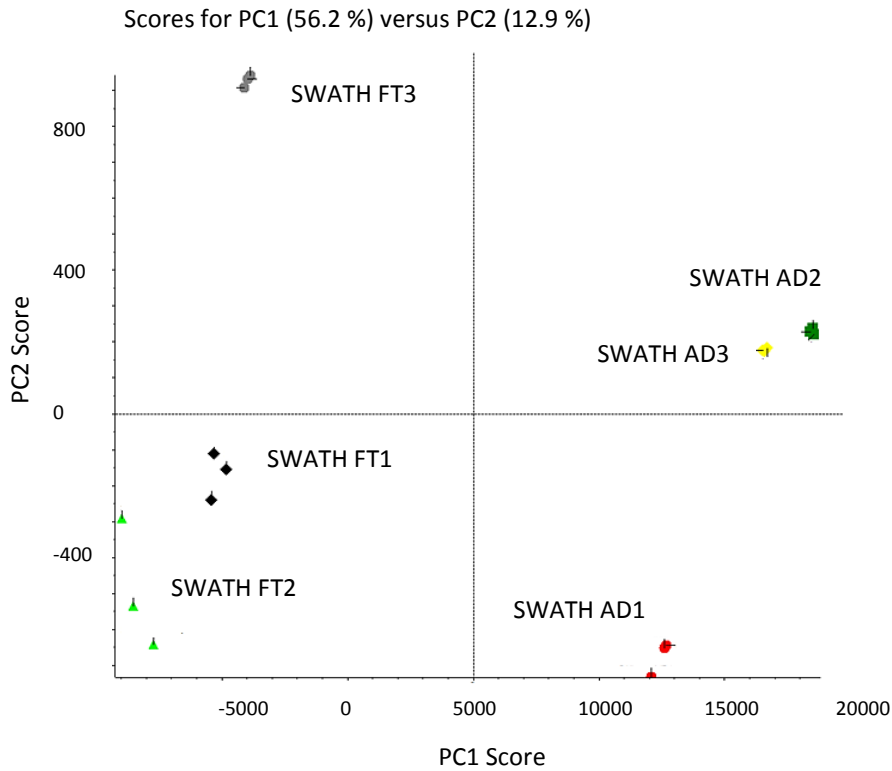


Figura 10: Análisis de componentes principales entre las ECM descellularizadas. AD: ECM adulta y FT: ECM fetal.

Tras el estudio SWATH, se identificaron la presencia significativa ($p < 0,05$) de 288 proteínas en la ECM fetal descellularizada en comparación con la adulta. De esas 288 proteínas 37 eran pertenecientes a la ECM (Tabla 2). Del mismo modo, se identificarán XXX proteínas de la ECM adulta descellularizada en comparación con la fetal. De esas 155 proteínas, 27 son de la ECM (Tabla 3).

N.	Proteína	Función
1	Collagen type XIV alpha 1 chain	Proteína estructural
2	Collagen type XXI alpha 1 chain	
3	Laminin subunit alpha 5	Proteína especializada
4	Laminin subunit beta 1	
5	Heparan sulfate proteoglycan 2	Proteoglicano
6	Biglycan	
7	Decorin	
8	Asporin	
9	Angiopoietin-like 6	Factor de crecimiento
10	Myeloid derived growth factor	
11	Transglutaminase 2	Enzimas
12	Peptidylprolyl isomerase	
13	Kynurenine aminotransferase 1	
14	Kynurenine aminotransferase 3	
15	Elastase, neutrophil expressed	
16	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	
17	Amine oxidase	

18	Tubulointerstitial nephritis antigen like 1	Otras
19	EMILIN-1	
20	Multimerin-2	
21	Alpha-fetoprotein	
22	Nidogen-1	
23	Nidogen-2	
24	Fetuin-A y,	
25	Fetuin-B	
26	Azurocidin	
27	Microfibril associated protein 2	
28	C-X-C motif chemokine	
29	Nephronectin	
30	Latent transforming growth factor beta binding protein 1	
31	Fibrillin 2	
32	High mobility group protein B2	
33	Dermatopontin	
34	Pigment epithelium-derived factor	
35	Lectin, mannose binding 2	
36	Calcium-binding protein A9 (S100A9)	

37	Resistin (Fragment)	
-----------	---------------------	--

Tabla 2: Lista de proteínas identificadas con una presencia significativa ($p < 0,05$) en la matriz porcina fetal descelularizada en comparación con la adulta.

N.	Proteína	Función
1	Collagen Type VI alpha-1 chain	Proteína estructural
2	Collagen type VI alpha 2 chain	
3	Collagen type VI alpha 3 chain	
4	Collagen type VI alpha 5 chain	
5	Collagen type VI alpha 6 chain	
6	Heparin binding growth factor	Factor de crecimiento
7	GDP-mannose 4,6-dehydratase	Enzimas
8	Glutathione peroxidase	
9	Sulfhydryl oxidase	
10	Serpin family F member 2	
11	Plasminogen	Otras
12	Otogelin like	
13	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	

14	Alpha-1-antitrypsin	
15	Apolipoprotein A-IV	
16	Apolipoprotein A-I	
17	Complement C3	
18	Alpha-2-macroglobulin	
19	Calcium binding protein 39	
20	Kininogen 1	
21	Olfactomedin-like protein 3	
22	Hemoglobin subunit beta	
23	Fibulin 5	
24	POSTN	
25	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	
26	Fibrinogen beta chain	
27	Joining chain of multimeric IgA and IgM	

Tabla 3: Lista de proteínas identificadas con una presencia significativa ($p < 0,05$) en la matriz porcina fetal descelularizada en comparación con la adulta.

Tras la identificación se procedió al estudio individual de las 37 proteínas extracelulares presentes en la ECM fetal y no adulta y de las 27 proteínas extracelulares presentes en la ECM adulta y no en la fetal. Se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de analizar las funciones de estas proteínas y sus posibles implicaciones en la hematopoyesis fetal (*véase Apéndice*).

Laminin subunit alpha 5 y Laminin subunit beta 1

Las LN son una familia de proteínas heterotriméricas (α , β y γ) con enlaces disulfuro. La combinación de 11 subunidades caracterizadas ($\alpha 1$ - $\alpha 5$, $\beta 1$ - $\beta 3$ y $\gamma 1$ - $\gamma 3$) da lugar a la generación de al menos 12 isoformas de LN distintas. Una característica principal de la molécula de LN es que puede actuar como fuertes sustratos adhesivos para muchos tipos celulares. En la BM ha sido demostrada la expresión de varias isoformas²⁵. Ekblo *et al.* definieron la presencia de las LN-2 y LN-8 en la BM de ratón y rata, respectivamente²⁶. Sin embargo, en la BM humana las LN-8/9 y la 10/11²⁷ son las isoformas más abundantes sintetizadas por las células estromales, ya que se ha demostrado la presencia de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 5$ y la ausencia de las $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ ²⁸. Este mismo grupo demostró cómo preparaciones de la LN-10/11 no solo poseían interacciones de adhesión fuertes con líneas celulares humanas CD34⁺ sino que además, mostraron tener una actividad mitogénica sobre células progenitoras hematopoyéticas humanas²⁸. Esta misma isoforma, presente también en la placenta humana, posee también en ese microambiente una fuerte adhesión por las células hematopoyéticas humanas^{26,29}.

Estos datos podrían relacionarse con la presencia de las cadenas $\alpha 5$ y $\beta 1$ detectadas de manera significativa en el FL, las cuales junto con $\gamma 1$ darían lugar a la LN-10. Por lo tanto, esta molécula podría crear diversas interacciones de adhesión con las células hematopoyéticas dando lugar a actividades mitogénicas sobre las mismas. Además, se ha visto como la línea celular progenitora hepática bipotencial, HepaRG, es capaz de secretar a la ECM la LN-10, la cual posee un gran papel sobre la especificación hepática³⁰. De esta manera, esta proteína podría tener un doble papel en el FL ya que no solo apoyaría la diferenciación de los HB, sino que también actuaría sobre la expansión de las células hematopoyéticas.

C-X-C motif chemokine

Las quimioquinas también como quimiotácticas son proteínas de pequeño tamaño y bajo peso molecular (8-14 kDa). Presentan una serie de características estructurales como su disposición tridimensional y la presencia de pares de residuos de cisteína unidos por puentes disulfuro. Las quimioquinas CXC se caracterizan por la presencia de un aminoácido entre las dos primeras cisteínas. Se han descrito hasta un total de 17 quimioquinas CXC en mamíferos, las cuales se subdividen en dos categorías, aquellas con una secuencia de aminoácidos específica compuesta por ácido glutámico-leucina-arginina inmediatamente antes de la primera cisteína del CXC motivo y aquellas sin dicha secuencia. Estas proteínas ejercen sus efectos biológicos mediante interacción con los correspondientes receptores transmembrana los cuales se encuentran unidos a proteínas G. Actualmente se conocen hasta 7 receptores denominados CXCR1-7. Se han descrito múltiples papeles de estas proteínas en el sistema hematopoyético como: CXCL1/CXCR2, en el reclutamiento y activación de los neutrófilos^{31,32}; CXCL2/CXCR2, en la degranulación de neutrófilos y basófilos³³; CXCL4/CXCR2, en el mantenimiento, supervivencia y autorrenovación de CMH/CMPH³⁴; CXCL12/CXCR4, en el mantenimiento de la quiescencia de las HSC^{35,36} y en la migración de las HSC hacia la BM³⁷.

Sin embargo, aunque la base de datos no especifique de qué proteína CXC se trata, la presencia significativa de este tipo de proteínas en el FL, podría tener implicaciones en la hematopoyesis hepática fetal.

Nidogen-1 y Nidogen-2

Ambas proteínas pertenecen a una familia de glucoproteínas monoméricas sulfatadas localizadas en la lámina basal. *Nidogen-1* es una pequeña molécula compuesta por tres dominios globulares. Posee una alta afinidad de unión por la LN-1³⁸ y por el COL IV³⁹. Por ello, *Nidogen-1* podría servir como proteína de enlace, estabilizando de esta manera ciertas membranas basales. *Nidogen-2* posee una homología del 46% con *Nidogen-1* y una similar actividad de unión hacia el COL IV, sin embargo, la afinidad por la LN-1 es mucho menor⁴⁰. Miosge *et al.* demostraron que ambas proteínas se encuentran de manera ubicua en la membrana basal bajo los epitelios en desarrollo de la mayoría de los principales órganos humanos⁴¹. En el caso específico del hígado, ambas proteínas se

localizaron a nivel de las triadas portales, de los vasos sanguíneos más grandes y del peritoneo en desarrollo, pero no los sinusoides⁴¹. Sin embargo, a pesar de la presencia de estas moléculas en el parénquima del hígado en desarrollo, no forman parte de la membrana basal. Esto hace pensar que estas proteínas podrían tener otras funciones distintas. En 2006, se demostró que la expresión de estas proteínas en el parénquima hepático podía encontrarse en hepatocitos, precursores de células estrelladas, células endoteliales y en células hematopoyéticas, la cual disminuía conforme lo hacía la hematopoyesis hepática⁴².

Estos datos hacen pensar que estas proteínas podrían tener cierto papel en la regulación de la hematopoyesis fetal ya que su máxima expresión en el FL ocurre a la par que la hematopoyesis hepática fetal.

Fetuin-A y *Fetuin-B*

Fetuin-A es una glucoproteína producida por las células hepáticas, la cual está más presente en el suero fetal que en el adulto. Se trata de una proteína transportadora que forma complejos solubles con el calcio y fosfato⁴³. En 1996 se puso de manifiesto la expresión de esta proteína en el desarrollo y en la maduración de los sistemas hematopoyéticos e inmunitarios desde la edad más temprana, presente en la matriz de ovejas⁴⁴. A continuación, se corroboró la presencia de esta proteína sobre células del FL y bazo, las cuales fueron identificadas como progenitores hematopoyéticos, en los ganglios linfáticos como macrófagos y en la BM como monocitos/macrófagos⁴⁴. Recientemente, esta proteína ha sido catalogada como un agente protector del daño hepático a través de la inhibición de la respuesta inflamatoria del hígado y de la apoptosis de los hepatocitos⁴⁵. *Fetuin-B*, al igual que *Fetuin-A*, se trata de una proteína plasmática derivada del hígado, pero con distintas funciones. El estudio de su estructura reveló que poseía el dominio para la unión de calcio⁴⁶. Sin embargo, diversos estudios genéticos han sugerido cierto papel en la biología tumoral⁴⁷. Se ha demostrado que la deficiencia de esta proteína en ratones conduce y, por lo tanto, a la infertilidad femenina⁴⁸.

La expresión significativa de ambas proteínas en el FL podría estar relacionado con la hematopoyesis fetal. En el caso de la *Fetuin-A* esta podría actuar en la migración de las

HSC en los primeros estadios del desarrollo embrionario, ya que se le ha identificado en la ECM sobre los sistemas hematopoyéticos e inmunitarios en desarrollo y en maduración. Sin embargo, en el caso de la *Fetuin-B* aún no ha sido asociado ningún papel sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Protein S100

Estas proteínas forman parte de una familia de proteínas de bajo peso molecular (10-12 kDa). Se caracterizan por presentar dos sitios de unión a calcio y por tener una conformación de hélice-bucle-hélice. Estas proteínas son llamadas S100 a consecuencia de su solubilidad en una solución saturada al 100% con sulfato de amonio a pH neutro⁴⁹. Se dividen en tres subgrupos en función de dónde ejercen sus efectos reguladores, intracelularmente, extracelularmente o ambos. Cada vez existen más pruebas de que la expresión alterada de estas proteínas está relacionada con diversos cánceres y comúnmente su expresión va asociada con la progresión del tumor⁵⁰. Aunque la mayoría de los estudios describen los papeles extracelulares inflamatorios de estas proteínas, se ha sugerido que también podrían tener diversos efectos sobre las respuestas inmunes e inflamatorias intracelularmente⁵¹.

Un ejemplo es la Calcium-binding protein A9 (S100A9). Se expresa en neutrófilos circulantes y monocitos y está ausente en los macrófagos y linfocitos de tejidos normales. Se localiza principalmente en el citoplasma, sin embargo, tras la elevación del calcio intracelular se trasloca al citoesqueleto y a la membrana plasmática⁵². La presencia de altos niveles esta proteína en el plasma se ha asociado a enfermedades como la fibrosis quística o la artritis reumatoide⁵³. Newton and Hogg mostraron que esta proteína estimula la adhesión a neutrófilos⁵⁴, promoviendo la actividad bactericida de los neutrófilos y aumentando la fagocitosis. Esta proteína junto a Calcium-binding protein A8 (S100A8) se encuentran altamente expresadas en células mieloides⁵⁵, donde su expresión se encuentra modulada durante la mielopoyesis, caracterizada por niveles más bajos en los progenitores y niveles mayores en granulocitos y monocitos diferenciados^{56,57}. Una vez secretada induce, a través de la interacción con los receptores como TLR4, una respuesta inmune inflamatoria⁵⁸. Recientemente, Laouedj *et al.* demostraron que a través de la interacción con el receptor TLR4 se inducía la

diferenciación de las células de leucemia mieloide aguda, poniendo de esta manera de manifiesto su potencial terapéutico en este tipo de patología⁵⁹. Recientemente, se ha demostrado que los monocitos/macrófagos presentes en un ambiente hepático metastásico inducen la expresión de ambas proteínas en células cancerosas, las cuales son esenciales para la migración e invasión de las células tumorales⁶⁰. También se les ha atribuido cierto papel en las primeras etapas de la regeneración hepática, ya que su expresión se ve incrementada tras una hepatectomía parcial⁶¹. Se estudió la expresión de estas proteínas, además, sobre los distintos estadios del desarrollo embrionario, poniendo de manifiesto su mayor expresión se encuentra en el momento del nacimiento⁶¹. Estos hallazgos sugieren que estas proteínas podrían tener diversas funciones a lo largo del organismo.

El papel más importante que a nosotros nos concierne sería el de su expresión durante la etapa fetal, alcanzando niveles máximos en el momento del nacimiento. Sin embargo, aunque se sabe la emigración de las HSC se produce de manera continua desde el FL a la BM, es más pronunciado en el momento del nacimiento²², por lo que estas proteínas podrían tener cierto papel en la migración de estas células a la BM.

Resistin (Fragment)

Su nombre se debe a la resistencia inicial observada a la insulina en ratones⁶². Por ello, se propuso como enlace entre la obesidad y la diabetes, sin embargo, se encuentra presente en otros procesos inflamatorios⁶³. En humanos esta proteína, rica en residuos de cisteína, es principalmente secretada por MNC de PB, macrófagos y células de la BM^{64,65}. Ha sido relacionada con el desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, enfermedad del hígado graso no alcohólico, enfermedad reumática, asma, enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedad renal crónica^{66,67}. Aunque originalmente se describió como un factor que contribuye al desarrollo de la resistencia insulínica y diabetes, hoy en día sigue el debate sobre qué papel desempeña exactamente. Recientemente, los niveles en suero de esta proteína han sido propuestos como marcadores para la sensibilidad a la EPO en pacientes no diabéticos con hemodiálisis⁶⁸. Estudios anteriores demostraron que el aumento en la concentración de esta proteína se producía en pacientes resistentes a la insulina^{69,70}. Además, en

pacientes urémicos se producía una mejora de la anemia y una reversión a la resistencia a la insulina tras la administración de EPO^{71,72}. Por lo que el tratamiento con EPO parecía participar en una reducción sobre la resistencia a la insulina y en un mejoramiento de estado crónico inflamatorio de pacientes con hemodiálisis⁷³. El papel de esta proteína sobre las HSC no está del todo claro. Varias líneas de trabajo hacen indicar que posee cierto efecto sobre la eritropoyesis. Una de ellas se basa que en los niveles de esta proteína son más altos en el FL humano, BM adulta, UCB y células de PB, indicando que la distribución de esta proteína se correlaciona con una hematopoyesis normal, sin embargo, su nivel de expresión no pudo correlacionarse con la incidencia de leucemia⁷⁴. Además, el tratamiento con G-CSF produce niveles significativamente más altos de esta proteína en suero⁷⁵. Un efecto relacionado con la dosis de G-CSF podría ser la inhibición de eritropoyesis y, por lo tanto, el empeoramiento de la anemia⁷⁶.

Por lo tanto, podría existir una relación entre la secreción de esta proteína y el decline en la eritropoyesis y a la sensibilidad a la EPO. De esta manera, la presencia de esta proteína sobre el FL podría correlacionarse con el hecho de que el FL es el principal órgano fetal en el que se desarrolla la eritropoyesis⁷⁴.

Pigment epithelium-derived factor

Se trata de una proteína multifuncional y aunque inicialmente fue descrita como una proteína con funciones neutrotópicas y anti-angiogénicas secretada por el epitelio pigmentario de la retina fetal humana⁷⁷, actualmente se conoce su presencia en una gran variedad de órganos y tejidos tanto en condiciones normales como de enfermedad^{78,79}. El tratamiento de HSC procedentes de UC con esta proteína reduce significativamente la apoptosis e incrementa la proliferación en medio sin suero, gracias a la expresión de p53⁸⁰. Recientemente, sin embargo se ha descrito que esta proteína no posee un papel sobre la regulación de las HSC⁸¹, a pesar de su papel fundamental sobre la autorrenovación y diferenciación de otros tipos de celulares^{82,83}.

Alpha-fetoprotein

Se trata de la mayor glucoproteína plasmática producida por el saco vitelino y el FL durante el desarrollo embrionario. Los niveles maternos alcanzan su máximo cerca del

final del primer trimestre, comienzan a disminuir en el periodo prenatal y disminuyen rápidamente tras el nacimiento, aunque se sigue produciendo pequeñas cantidades⁸⁴. Elevados niveles de esta proteína se pueden dar en una gran variedad de situaciones clínicas, además del embarazo, como son los trastornos hepáticos⁸⁴, por lo que se ha ido convertido en un buen biomarcador para el carcinoma hepatocelular⁸⁵. En 2002 se demostró que esta proteína no era necesaria para el desarrollo embrionario en ratones, sin embargo, las hembras eran infértiles seguramente debido a una disfunción del sistema hipotalámico/hipofisario⁸⁶. Bartha *et al.* pusieron de manifiesto que existía una significativa correlación entre esta proteína y el factor de crecimiento SCF en el líquido amniótico en las primeras etapas del embarazo, lo cual sugería que podría tener cierto papel en la hematopoyesis fetal⁸⁷. Por su parte, es bien conocido el papel de SCF en la hematopoyesis, ya que desempeña un importante papel en el mantenimiento, regulación y migración de las HSC⁸⁸.

Por lo tanto, todo apunta a que esta proteína en el FL podría tener un papel sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Dermatopontin

Se trata de una proteína extracelular con posibles funciones tanto en las interacciones célula-matriz como en el ensamblaje de la matriz⁸⁹, ya que interactúa con el fibrinógeno y la fibrina. Se encuentra altamente expresada en la dermis donde posee un importante papel en la cicatrización de heridas concretamente durante la reepitelización promoviendo la migración de queratinocitos⁹⁰. Además, puede modificar el comportamiento del factor de crecimiento TGF- β a través de la interacción con la *decorin*. Esta proteína se encuentra presente fuertemente en diversos tejidos como el hígado, riñón y bazo fetales y adultos humanos y débilmente en ovario y corazón. Además, podría estar relacionada con la carcinogénesis y la progresión del carcinoma hepatocelular a través de la posible interacción con TGF- β ⁹¹. Se ha descrito que la adición de esta proteína como suplemento al cultivo mejora la clonogenicidad de las HSC *ex vivo*, cuando éstas son cultivadas en conjunto con las células estromales AFT024⁹². Recientemente, se ha identificado la presencia de esta proteína en BM

descelularizadas murinas revelando que podría jugar cierto papel en la adhesión de las HSPC⁹³.

Por lo tanto, aunque no existen referencias sobre su papel en el FL, los estudios de clonogenicidad sobre las HSC murinas⁹² así como su presencia en BM descelularizadas⁹³, hace pensar que pueda tener un papel importante sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Angiopoietin-like 6

Esta proteína pertenece a una familia cuya estructura es bastante similar a la *Angiopoietin*. Hasta la fecha se han descubierto 8 proteínas, donde la mayoría presenta funciones en el metabolismo de los lípidos y glucosa, inflamación, cáncer y hematopoyesis⁹⁴⁻⁹⁶. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína *angiopoietin-like 3* respalda la actividad hematopoyética de las HSC en la BM murina⁹⁷ o que la proteína *angiopoietin-like 2* resulta en una expansión *ex vivo* de las HSC humanas⁹⁸, al igual que *angiopoietin-like 7*⁹⁹. Akther *et al.* demostraron que las proteínas *angiopoietin-like 1, 2, 3, 4, 6 y 7* en combinación con otros factores de crecimiento estimulan la proliferación de las HSC murinas en cultivo¹⁰⁰.

Sin embargo, aunque hasta la fecha no haya sido descrito ningún papel de esta proteína sobre el FL todo apunta que puede tener un papel importante sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Transglutaminase 2

Se trata de una enzima que pertenece a la familia de las transglutaminasas. Se encarga de catalizar la modificación postraducciona de las proteínas mediante la formación de enlaces isozeptídicos. Esta enzima es conocida por ser el autoantígeno en la enfermedad celíaca, sin embargo, también es conocida por ejercer otras funciones como en la apoptosis, diferenciación celular y en la estabilización de la ECM¹⁰¹. Siegel *et al.* demostraron que la mayoría de esta proteína extracelular es inactiva en condiciones fisiológicas normales tanto en cultivo celular como en *in vivo*¹⁰², sin embargo, es rápidamente activada en presencia de una herida¹⁰². La inactivación de la proteína puede ser debida al entorno oxidativo el cual conduce a la inactivación de su actividad

transamidasa, a la presencia de óxido nítrico o a la fosforilación de la proteína quinasa A de la proteína¹⁰². Por el contrario, las tiol reductasas activan la actividad transamidasa de la proteína¹⁰³. De esta manera, todos estos factores modula la actividad de la proteína¹⁰⁴. La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS) juega un papel en la diferenciación de las ES, por lo tanto, mientras que niveles bajos de ROS promueven el estado quiescente de las ES niveles altos inducen programas de proliferación y diferenciación¹⁰⁵. Estudios en crustáceos, señalaron que una corta señal de ROS hace disminuir la actividad de la proteína extracelular en los tejidos hematopoyéticos, proporcionando un entorno adecuado para la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas^{106,107}.

Sin embargo, aunque hasta la fecha no haya sido descrito ningún papel de esta proteína sobre el FL, el mecanismo de acción de esta proteína sobre las células hematopoyéticas humanas podría seguir un mecanismo parecido a como ocurre en los crustáceos.

Peptidylprolyl isomerase

Estas enzimas catalizan la isomerización *cis-trans* de enlaces peptídicos unidos a restos de prolina sobre la cadena polipeptídica. Como ya se ha mencionado anteriormente, las HSC prefieren residir en nichos hipóxicos. Mantel *et al.* recolectaron y manipularon BM y UCB en condiciones de hipoxia (<3% O₂), demostrando que la breve exposición al oxígeno ambiente (21% O₂) disminuye la reactivación de las HSC con capacidad de autorrenovación a largo plazo (LT-HSC) y aumenta, por lo tanto, el número de células progenitoras. Este fenómeno es conocido como choque/estrés de oxígeno extrafisiológico¹⁰⁸. Esto es debido a la producción de ROS y a la apertura de poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial. Moléculas como la *cyclophilin D* (peptidylprolyl isomerase) aumentan esta permeabilidad mitocondrial disminuyendo el número de LT-HSC y aumentando el de HSC con capacidad de autorrenovación a corto plazo (ST-HSC). Confirmando de esta manera el papel principal del FL, que no es otro más que la expansión y diferenciación de HSPC¹⁰⁹.

De esta manera podría explicarse la relación entre la hematopoyesis fetal y la presencia significativa de estas enzimas en el hígado.

Amine oxidase

Enzima que cataliza la desaminación oxidativa de muchas aminas mediante la formación del correspondiente grupo aldehído y la liberación de amoníaco y peróxido de hidrógeno. Actualmente, existe dos clases de *Amine oxidase* en función de la naturaleza del grupo prostético envuelto en este mecanismo, ya sea una flavina o un ion de cobre. La actividad de estas proteínas puede estar relacionada con la producción de ROS, de tal manera que la producción de este metabolito podría proporcionar un entorno adecuado para la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas^{110,111}.

Sin embargo, aunque la base de datos no especifique de qué *Amine oxidase* se trata, la presencia significativa de este tipo de proteínas en el FL, podría tener implicaciones en la hematopoyesis hepática fetal como consecuencia de un aumento de ROS.

Heparan sulfate proteoglycan 2

Este proteoglicano se une a diversos componentes de la ECM y de la superficie celular como la LN o COL IV. Es sintetizado tanto por las células del endotelio vascular como del músculo liso. Es un componente clave de la ECM vascular, donde ayuda a mantener la función de la barrera endotelial. Además, también promueve la actividad de diversos factores de crecimiento con el objetivo de estimular el crecimiento endotelial y la regeneración¹¹². Este proteoglicano es un importante componente del microambiente de los tejidos hematopoyéticos. Roberts *et al.* demostraron que GF como IL-3 y GM-CSF pueden presentarse de manera biológicamente a las células hematopoyéticas a través de esta proteína, lo cual podría ser un importante mecanismo entre la interacción de las células estromales y la hematopoyéticas¹¹³. Asimismo, se ha demostrado que la expresión de este proteoglicano se induce durante la diferenciación eritroide temprana de células madre hematopoyéticas multipotentes¹¹⁴.

Por lo tanto, la expresión de este proteoglicano podría ser debido a la diferenciación eritroide que tiene lugar en el FL.

Biglycan

Proteoglicano presente en casi todos los órganos del cuerpo, sin embargo, no posee una distribución uniforme dentro de ellos¹¹⁵. Se puede expresar tanto en la superficie celular como en la ECM donde es capaz de interactuar con moléculas como el COL o la EL¹¹⁶. Inicialmente esta proteína fue considerada como un mero componente estructural de la ECM, sin embargo, es capaz de interactuar y modular las funciones de diversos GF y citoquinas como TGF- β ¹¹⁷, TNF- α ¹¹⁸, BMP-2, 4 y 6¹¹⁹ o Wnt-1¹²⁰. La capacidad de este proteoglicano por agrupar varios tipos de receptores hace aún más patente su compleja red de señalización¹²¹. Reflejo de su amplia expresión y función, ha sido involucrado en la participación de numerosas enfermedades humanas (diabetes, artritis reumatoide o esclerosis múltiple). Además, es conocido su papel en el sistema inmune innato¹²², como regulador en la osteogénesis¹²³ o en la estabilidad sináptica¹²⁴. Este proteoglicano posee una alta expresión en los tejidos conectivos, incluido el hueso. Sin embargo, ratones con deficiencia en esta proteína mostraron reducciones significativas en el hueso trabecular y en los osteoblastos, no obstante no mostraron defectos en la hematopoyesis¹²⁵. Induce además, la expresión de óxido nítrico sintasas, protegiendo así a las células de la hipoxia¹²⁶. La expresión de esta molécula en la ECM se encuentra elevada en LT-HSC¹²⁷. Sin embargo, cuando existe una lesión en la BM, la expresión de esta proteína se ve reducida siendo mayor en LT-HSC que en ST-HSC¹²⁷.

Sin embargo, aunque hasta la fecha no haya sido descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal en el hígado, podría tener cierto papel en la proliferación hematopoyética.

Decorin

Se trata de un proteoglicano perteneciente a la familia de los proteoglicanos ricos en leucina. Se caracteriza por poseer una región rica en leucinas con una cadena de glicosaminoglicano, la cual bien puede ser de tipo condroitín sulfato o dermatán sulfato. Posee además una estructura muy semejante a la proteína *biglycan*. Se localiza principalmente en el tejido conectivo en asociación o “decorando” la fibrillas de COL I, de ahí su nombre. Además, hace de regulador de TGF- β 1. En el caso del hígado, se sabe que la falta de esta proteína favorece el desarrollo de fibrosis hepática y retrasa el

proceso de curación como consecuencia de su involucración en la bioactividad de TGF- β ^{128,129}. Sin embargo, el aporte exógeno de esta proteína podría promover la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial¹³⁰. Recientemente, se ha identificado esta proteína como un regulador de la hematopoyesis, provocando cambios similares a los causados por Wnt3a¹³¹.

Sin embargo, aunque hasta la fecha no haya sido descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal en el hígado, podría tener cierto papel en la proliferación hematopoyética.

Apolipoprotein A-I

La *Apolipoprotein A-I* posee un papel específico en el metabolismo de los lípidos. Además, la disminución de esta proteína es un marcador sérico y tisular de la fibrosis hepática independientemente de la esteatosis y hepatitis alcohólica¹³². Por lo tanto, los niveles de esta proteína pueden reflejar la severidad de la enfermedad hepática¹³³. Recientemente se ha demostrado que esta proteína suprime la proliferación de las HSPC¹³⁴. Esta proteína se une al receptor HDL estimulando el transporte inverso del colesterol. En 2010, Yvan-Charvet *et al.* sugirieron que el colesterol HDL inhibía la proliferación de las HSC y HSPC, dando lugar a una leucocitosis y aterosclerosis acelerada¹³⁵. Más tarde, se postuló que las partículas LDL y HDL tenían efectos opuestos sobre la proliferación y diferenciación de las HSPC¹³⁴. Tras la infusión de la *Apolipoprotein A-I* en ratones, se observó una reducción en la frecuencia y proliferación de las HSPC en la BM *in vivo*¹³⁴.

Por lo tanto, la expresión significativa de esta molécula en el hígado adulto, podría tener un papel regulatorio negativo sobre la hematopoyesis.

Complement C3

Proteína del sistema inmune que juega un importante papel en el sistema del complemento contribuyendo a la inmunidad innata. La activación de C3 en respuesta a un daño en la BM, dan lugar a un aumento en la capacidad de respuesta de las HSPC a los gradientes de SDF-1, dirigiéndose al nivel de lesión¹³⁶. Además, ejercen de regulador en la movilización de las HSPC desde la BM a la PB¹³⁷.

Por lo tanto, la proteína *Complement C3* podría tener también un cierto papel sobre la movilización de las células hematopoyéticas desde el FL hasta la BM, ya que se sabe que ejerce de papel regulador en la migración de las HSPC desde la BM a la BP¹³⁷.

POSTN

Esta proteína funciona como un ligando de las integrinas alfa-V/beta-3 y alfa-V/beta-5, apoyando la adhesión y migración de las células epiteliales. Se ha asociado con la transición epitelio-mesenquimal en el cáncer y con la diferenciación del mesénquima en el corazón en desarrollo. En muchos cánceres, se une a las integrinas de las células cancerosas, activando diferentes vías de señalización que conducen a una mayor supervivencia celular, invasión, angiogénesis, metástasis y el tránsito transitorio epitelio-mesenquimal. Recientemente, se ha identificado a esta proteína como un regulador importante del ciclo celular de las HSC murinas adultas. La expresión de esta proteína por parte de los osteoblastos en la BM actúa como ligando de la integrina $\alpha\beta3$, disminuyendo la producción de ST-HSC y aumentando la de LTC-HSC¹³⁸.

Por lo tanto, sería interesante estudiar el papel de esta molécula en el hígado para elucidar un poco más sobre la hematopoyesis fetal.

Estas son las proteínas identificadas hasta en nuestros resultados con un papel conocido o potencial en la hematopoyesis del FL humano.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de la tesis es la recreación del microambiente hepático fetal humano, con el fin de conseguir una expansión hematopoyética tal y como ocurre durante el desarrollo fetal¹³⁹. Así, se realizó un estudio proteómico sobre la ECM hepática fetal y adulta y se identificaron aquellas proteínas presentes, de manera significativa, en la matriz hepática fetal y no en la adulta, las cuales podrían tener implicaciones en la hematopoyesis fetal.

Es conocido que el microambiente hematopoyético de la BM desempeña un papel fundamental sobre la regulación de la proliferación, diferenciación y migración de las células sanguíneas en desarrollo^{88,140,141}. Una parte esencial de este microambiente está formado por su compleja ECM sintetizada por las células estromales no hematopoyéticas^{142,143}, donde las glucoproteínas, proteoglicanos y las proteínas de la familia del COL están directamente implicadas en el control de la adhesión celular y la proliferación de las células hematopoyéticas en maduración¹⁴⁴⁻¹⁴⁸. Sin embargo, el microambiente hepático se encuentra mucho menos caracterizado.

Aunque el estudio proteómico se ha realizado sobre una matriz porcina, los resultados van a ser extrapolados al humano debido a su gran similitud anatómica y fisiológica con los humanos. En 2012, Groene *et al.* publicaron en la revista *Nature* se publicó un estudio sobre la secuencia del genoma porcino, poniendo de manifiesto de esta manera el gran interés que existe de este animal como modelo de investigación¹⁴⁹. Por ello, son excelentes organismos modelos para el estudio de diversas enfermedades humanas como la diabetes, fibrosis quística, algunos tipos de cáncer y trasplante de órganos. Además, se piensa que, en un futuro no muy lejano, podría llegar a convertirse en una fuente fundamental para el trasplante de órganos en humanos, especialmente de corazón e hígado.

El estudio de la hematopoyesis porcina fetal refleja lo ya reportado en humanos²². A los 60 días de gestación, lo cual correspondería al Estadio III en humanos, las células hematopoyéticas ocupan alrededor del 70% del parénquima hepático. En cambio, a los días 72 y 81 de gestación, Estadio IV en humanos, está caracterizada por una involución de la hematopoyesis, donde la distancia entre los distintos focos empieza a ser cada vez

mayor. El no haber estudiado todos los estadios hematopoyéticos se debe en gran medida a la dificultad para encontrar abortos involuntarios a esos días de gestación. Por esta razón, el estudio se centró en las últimas etapas del desarrollo fetal.

Además, se estudió la hematopoyesis fetal en función de los lóbulos hepáticos. Es conocido que durante la etapa fetal, el principal aporte sanguíneo procede de la UV (80-85 %), mientras que el resto procede de la PV (15-20 %) ¹⁵⁰. Barclay *et al.* sugirieron que la UV suministraba flujo sanguíneo a los lóbulos centrales e izquierdo del hígado, mientras que la PV lo hacía al lóbulo derecho en corderos. Más adelante fue planteado un patrón de flujo sanguíneo similar en fetos humanos ¹⁵¹. Esto implicaría que el lóbulo derecho recibe menos oxígeno ya que la saturación de oxígeno venoso portal es solo alrededor del 30% en comparación con el de la UV (80 a 85%) ²⁴. En apoyo a esta afirmación se encuentra la observación de que durante el desarrollo embrionario, el lóbulo hepático derecho posee una mayor actividad hematopoyética que el lóbulo izquierdo ²³. Sin embargo, nosotros no apreciamos diferencias entre los distintos lóbulos porcinos (izquierdo, central izquierdo, central derecho y derecho) a los 72 días de gestación. El motivo puede ser debido a no haber utilizado unas muestras pertenecientes al Estadio III.

El objetivo de este estudio era también estudiar qué proteínas de la ECM presentes en el hígado fetal podían tener ciertas implicaciones sobre la hematopoyesis fetal. Para ello, lo ideal habría sido coger las muestras en el momento donde la hematopoyesis fetal alcanza su culmen, es decir entre los días 40 y 64 de gestación. Sin embargo, como consecuencia de la escasa disponibilidad de estas muestras y de la fragilidad de la propia matriz, la descélularización era prácticamente imposible. Por ello, se eligió al final realizar el estudio sobre embriones de 72 días de gestación. En ellos, aunque la hematopoyesis se encuentra en una etapa de involución, se puede observar la presencia de bastantes focos hematopoyéticos (Figura 1).

Con el proceso de descélularización de los hígados porcinos fetales y de los hígados porcinos adultos, se pretendía llevar a cabo la eliminación total de los compuestos celulares, preservando al máximo la composición y arquitectura de las ECMC nativas. Para ello, se decidió emplear dos tipos de protocolos en función de la naturaleza de las muestras, uno más suave para las muestras fetales y un método más agresivo para las

muestras adultas. De esta manera, las muestras fetales se descelularizaron con Tritón X-100 y las adultas con SDS. La “potencia” de estos detergentes es distinta, pero fue el compromiso encontrado para poder descelularizar eficazmente estos órganos sin destruirlos debido al proceso de descelularización.

Tras el proceso de descelularización de los hígados fetales y adultos porcinos se obtuvieron los *scaffolds* correspondientes, donde el parénquima hepático quedó totalmente transparente haciendo visible el árbol vascular. Además, las H&E de ambas muestras descelularizadas mostraron la no presencia celular de manera cualitativa. Sin embargo, tras la extracción y cuantificación del DNA, se pudo corroborar de manera cuantitativa la descelularización casi total de las muestras fetales (93,92 %) y adultas (99,32%) (Figura 5).

A continuación, con las matrices obtenidas se llevó a cabo un estudio proteómico con el objetivo de poder identificar qué proteínas se encuentran presentes en la MEC fetal pueden tener un papel sobre la hematopoyesis fetal.

Tras el estudio SWATH, se identificaron la presencia significativa ($p < 0,05$) de 288 proteínas en la ECM fetal descelularizada en comparación con la adulta. De esas 288 proteínas 37 eran pertenecientes a la ECM (Tabla 1). Del mismo modo, se identificarán XXX proteínas de la ECM adulta descelularizada en comparación con la fetal. De esas 155 proteínas, 27 son de la ECM (Tabla 2).

Después de una extensa revisión bibliográfica sobre el papel de las proteínas detectadas en la hematopoyesis y eritropoyesis, se han encontrado algunas con papeles importantes.

La presencia de las cadenas $\alpha 5$ (*Laminin subunit alpha 5*) y $\beta 1$ (*Laminin subunit beta 1*) junto con $\gamma 1$ podría dar lugar a la LN-10. De sobras es sabido el papel mitogénica que esta molécula ejerce sobre las células hematopoyéticas. Asimismo, se ha descrito que la línea celular progenitora hepática bipotencial, HepaRG, es capaz de secretar a la ECM LN-10, generando un gran efecto sobre la especificación hepática³⁰. Por lo tanto, esta proteína podría tener un doble papel en el FL apoyando la diferenciación de los HB y la expansión de las células hematopoyéticas.

Se sabe que las quimioquinas CXC poseen un papel muy importante en el sistema hematopoyético, ya sea mediante su implicación en el mantenimiento y autorrenovación de las HSPC³⁴, en el mantenimiento de la quiescencia de las HSC^{35,36} y en la migración hacia la BM³⁷. Sin embargo, aunque la base de datos no especifique de qué proteína CXC se trata, la presencia significativa de este tipo de proteínas en el FL, podría tener implicaciones en la hematopoyesis hepática fetal.

La expresión máxima de las glucoproteínas Nidogen-1 y Nidogen-2 en el FL con su posterior disminución a la par que la hematopoyesis hepática⁴², hace pensar que estas proteínas puedan tener cierto papel en la regulación de la hematopoyesis hepática fetal.

La proteína *Fetuin-A* podría tener también cierto papel en la migración de las HSC en los primeros estadios del desarrollo embrionario, ya que se le ha identificado en la ECM sobre los sistemas hematopoyéticos e inmunitarios en desarrollo y maduración⁴⁴.

La proteína S100, *Calcium-binding protein A9 (S100A9)*, posee niveles muy altos de expresión durante la etapa fetal, llegando a tener sus niveles máximos en el momento del nacimiento. No obstante, aunque se sabe la emigración de las HSC se produce de manera continua desde el hígado fetal a la BM, aunque es más pronunciado en el momento del nacimiento²², por lo que estas proteínas podrían tener cierto papel en la migración de estas células al FL, tal como tienen a la BM.

No se conoce aún, pero podría existir una relación entre la secreción de la proteína *Resistin*, el decline en la eritropoyesis y la sensibilidad a la EPO. De esta manera, la presencia de esta proteína sobre el FL podría correlacionarse con el hecho de que el FL es el principal órgano fetal en el que se desarrolla la eritropoyesis⁷⁴.

La glicoproteína *Alpha-fetoprotein* posee una significativa correlación con el factor de crecimiento SCF durante las primeras etapas del embarazo en el líquido amniótico. De sobras es conocido el papel del factor de crecimiento SCF sobre el mantenimiento, regulación y migración de las HSC⁸⁸. Esto sugirió que esta glucoproteína podría tener cierto papel en la hematopoyesis fetal⁸⁷. Por lo tanto, todo apunta a que esta proteína en el FL podría tener un papel sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Aunque no existen referencias sobre el papel de *Dermatopontin* en el hígado fetal, los estudios de clonogenicidad sobre las CMH murinas⁹² y su presencia en BM

descelularizadas⁹³, hace pensar que pueda tener un papel importante sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Es bastante importante el papel de las proteínas *Angiopoietin-like* sobre la hematopoyesis⁹⁴⁻⁹⁶. En el específico caso de la *Angiopoietin-like 6*, Akther *et al.* demostraron que en combinación con otros factores de crecimiento estimulan la proliferación de las HSC murinas en cultivo¹⁰⁰. Sin embargo, aunque hasta la fecha no haya sido descrito ningún papel de esta proteína sobre el FL todo apunta que puede tener un papel importante sobre la hematopoyesis hepática.

Similarmente, se ha puesto de manifiesto que la glucoproteína *Microfibril associated protein 2* podría tener funciones discretas en la hematopoyesis, ya que la pérdida de la proteína no solo altera significativamente la masa ósea y su arquitectura, sino que ratones deficientes para esta proteína son neutropénicos¹⁵². Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis hepática fetal, lo que podrá dar la oportunidad de testarla en un futuro, visto que está presente en el FL.

Estudios en crustáceos, señalaron que una corta señal de ROS hace disminuir la actividad de la proteína extracelular *Transglutaminase 2* en los tejidos hematopoyéticos, proporcionando un entorno adecuado para la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas^{106,107}. Por lo tanto, esta proteína podría jugar cierto papel promoviendo la quiescencia de las HSC en el FL. Además, Mantel *et al.* demostraron que la breve exposición al oxígeno ambiente disminuye la reactivación de las LT-HSC y aumenta, por lo tanto, el número de células progenitoras hematopoyéticas¹⁰⁸. Moléculas como *cyclophilin D (Peptidylprolyl isomerase)* aumentan la producción de ROS debido a la apertura de poros de la transición de la permeabilidad mitocondrial, lo que desencadena una disminución del número de LT-HSC y un aumento de ST-HSC. Estos datos respaldarían el papel principal del hígado fetal que no es otro que la expansión y diferenciación de HSPC¹⁰⁹.

Las actividad de las *Amine oxidase* podría estar relacionado con la producción de ROS, de tal manera que la producción de este metabolito podría proporcionar un entorno adecuado para la diferenciación de las células precursoras hematopoyéticas^{110,111}. Sin

embargo, aunque la base de datos no especifique de qué *Amine oxidase* se trata, la presencia significativa de este tipo de proteínas en el FL, podría tener implicaciones en la hematopoyesis hepática fetal como consecuencia de un aumento de ROS.

Se sabe también que la expresión de *Biglycan* se encuentra elevada en LT-HSC¹²⁷. Sin embargo, cuando existe una lesión en la BM, la expresión de esta proteína se ve reducida siendo mayor en LT-HSC que en ST-HSC¹²⁷. Sin embargo, aunque hasta la fecha no haya sido descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal en el hígado, podría tener cierto papel en la proliferación hematopoyética.

Recientemente, se ha identificado a la proteína *Decorin* como un regulador de la hematopoyesis, provocando cambios similares a los causados por *Wnt3a*¹³¹. Sin embargo, aunque hasta la fecha no haya sido descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal en el hígado, podría tener cierto papel en la proliferación hematopoyética.

El proteoglicano *Heparan sulfate proteoglycan 2* podría representar no solo un importante mecanismo de interacción entre las células estromales y las células hematopoyéticas¹¹³, sino también un marcador de síntesis eritropoyética, ya que se ha demostrado que se induce su expresión durante la diferenciación eritroide temprana de células madre hematopoyéticas multipotentes¹¹⁴. De esta manera, la expresión de este proteoglicano podría estar relacionado con la diferenciación eritroide que tiene lugar en el FL.

En el caso de la *Apolipoprotein A-I* se ha demostrado recientemente que suprime la proliferación de las HSPC¹³⁴. Se une al receptor HDL estimulando el transporte inverso del colesterol. En 2010, Yvan-Charvet *et al.* sugirieron que el colesterol HDL inhibía la proliferación de las HSC y HSPC, dando lugar a una leucocitosis y aterosclerosis acelerada¹³⁵. Más tarde, se postuló que las partículas LDL y HDL tenían efectos opuestos sobre la proliferación y diferenciación de las HSPC¹³⁴. Tras la infusión de la *Apolipoprotein A-I* en ratones, se observó una reducción en la frecuencia y proliferación de las HSPC en la BM *in vivo*¹³⁴. Por lo tanto, la expresión significativa de esta molécula en el hígado adulto, podría tener un papel regulatorio negativo sobre la hematopoyesis.

La proteína *Complement C3* podría tener cierta importancia en la movilización desde el FL hasta la BM de las células hematopoyéticas, ya que se sabe que ejerce de papel regulador en la migración de las HSPC desde la BM a la BP¹³⁷.

Recientemente, la proteína *Periostin* ha sido asociada a la disminución de la producción de ST-HSC y al aumento en la de LT-HSC, mediante interacción con el ligando $\alpha\beta 3$ ¹³⁸. Por lo tanto, sería interesante estudiar el papel de esta molécula en el hígado para elucidar un poco más sobre la hematopoyesis fetal.

Así siendo, y porque estas han sido las proteínas identificadas como teniendo una participación o relación con la hematopoyesis, es fundamental testar en un futuro próximo el verdadero papel que estas proteínas pueden tener individualmente en la hematopoyesis y eritropoyesis fetal humana con experimentos de expansión y diferenciación de HSPC. Finalmente, el uso de estos *scaffolds* fetales permitirá generar un microambiente más aproximado o similar al del hígado fetal humano, con posibles implicaciones directas en la investigación y terapia con HSPC.

CONCLUSIONES

1. El estudio de la hematopoyesis porcina reflejó lo ya reportado en la hematopoyesis humana. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre lóbulos tal y como ocurre en el humano.
2. La descelularización de hígados porcinos fetales y adultos se llevó a cabo de manera satisfactoria, eliminado casi toda presencia de material genético.
3. El estudio proteómico de las ECM fetales y adultas demostró la presencia significativa de diversas proteínas las cuales podrían tener diversas implicaciones sobre la hematopoyesis fetal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baptista, P.M., *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* **53**, 604-617 (2011).
2. Baptista, P.M., *et al.* Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* **2009**, 6526-6529 (2009).
3. Ott, H.C., *et al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* **14**, 213-221 (2008).
4. Uygun, B.E., *et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine* **16**, 814-820 (2010).
5. Petersen, T.H., *et al.* Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* **329**, 538-541 (2010).
6. Wainwright, J.M., *et al.* Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 525-532 (2010).
7. Gattazzo, F., Urciuolo, A. & Bonaldo, P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et biophysica acta* **1840**, 2506-2519 (2014).
8. Bissell, M.J., Hall, H.G. & Parry, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of theoretical biology* **99**, 31-68 (1982).
9. Crapo, P.M., Gilbert, T.W. & Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 3233-3243 (2011).
10. Gilbert, T.W., Sellaro, T.L. & Badylak, S.F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* **27**, 3675-3683 (2006).
11. Mazza, G., *et al.* Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Scientific reports* **5**, 13079 (2015).
12. Lin, Y.Q., *et al.* New advances in liver decellularization and recellularization: innovative and critical technologies. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 1183-1191 (2015).
13. Jiang, W.C., *et al.* Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. *Biomaterials* **35**, 3607-3617 (2014).
14. Vyas, D., *et al.* Self-assembled liver organoids recapitulate hepatobiliary organogenesis in vitro. *Hepatology* (2017).
15. De Kock, J., *et al.* Simple and quick method for whole-liver decellularization: a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool? *Archives of toxicology* **85**, 607-612 (2011).
16. Soto-Gutierrez, A., *et al.* A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue engineering. Part C, Methods* **17**, 677-686 (2011).
17. Fukumitsu, K., Yagi, H. & Soto-Gutierrez, A. Bioengineering in organ transplantation: targeting the liver. *Transplantation proceedings* **43**, 2137-2138 (2011).
18. Wang, Y., *et al.* Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* **53**, 293-305 (2011).
19. Uygun, B.E., Yarmush, M.L. & Uygun, K. Application of whole-organ tissue engineering in hepatology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **9**, 738-744 (2012).
20. Li, Q., *et al.* Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds. *Biomaterials* **75**, 37-46 (2016).
21. Welham, N.V., Chang, Z., Smith, L.M. & Frey, B.L. Proteomic analysis of a decellularized human vocal fold mucosa scaffold using 2D electrophoresis and high-resolution mass spectrometry. *Biomaterials* **34**, 669-676 (2013).

22. Fanni, D., *et al.* Four stages of hepatic hematopoiesis in human embryos and fetuses. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* **31**, 701-707 (2018).
23. Emery, J.L. Functional Asymmetry of the Liver. *Ann N Y Acad Sci* **111**, 37-44 (1963).
24. Mavrides, E., Moscoso, G., Carvalho, J.S., Campbell, S. & Thilaganathan, B. The anatomy of the umbilical, portal and hepatic venous systems in the human fetus at 14-19 weeks of gestation. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* **18**, 598-604 (2001).
25. Zuckerman, K.S. & Wicha, M.S. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood* **61**, 540-547 (1983).
26. Gu, Y., *et al.* Characterization of bone marrow laminins and identification of alpha5-containing laminins as adhesive proteins for multipotent hematopoietic FDCP-Mix cells. *Blood* **93**, 2533-2542 (1999).
27. Gu, Y.C., *et al.* Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood* **101**, 877-885 (2003).
28. Siler, U., *et al.* Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood* **96**, 4194-4203 (2000).
29. Kibler, C., *et al.* Adhesive interactions of human multiple myeloma cell lines with different extracellular matrix molecules. *Cell adhesion and communication* **5**, 307-323 (1998).
30. Kanninen, L.K., *et al.* Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells. *Biomaterials* **103**, 86-100 (2016).
31. Sawant, K.V., *et al.* Chemokine CXCL1-Mediated Neutrophil Trafficking in the Lung: Role of CXCR2 Activation. *Journal of innate immunity* **7**, 647-658 (2015).
32. Sawant, K.V., *et al.* Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific reports* **6**, 33123 (2016).
33. Rouault, C., *et al.* Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* **154**, 1069-1079 (2013).
34. Sinclair, A., *et al.* CXCR2 and CXCL4 regulate survival and self-renewal of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* **128**, 371-383 (2016).
35. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988 (2006).
36. Nie, Y., Han, Y.C. & Zou, Y.R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine* **205**, 777-783 (2008).
37. Asri, A., Sabour, J., Atashi, A. & Soleimani, M. Homing in hematopoietic stem cells: focus on regulatory role of CXCR7 on SDF1a/CXCR4 axis. *EXCLI journal* **15**, 134-143 (2016).
38. Fox, J.W., *et al.* Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *The EMBO journal* **10**, 3137-3146 (1991).
39. Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K. & Timpl, R. Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *European journal of biochemistry / FEBS* **184**, 241-248 (1989).
40. Hopf, M., Gohring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. & Timpl, R. Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *European journal of biochemistry / FEBS* **259**, 917-925 (1999).
41. Miosge, N., Holzhausen, S., Zelent, C., Sprysch, P. & Herken, R. Nidogen-1 and nidogen-2 are found in basement membranes during human embryonic development. *The Histochemical journal* **33**, 523-530 (2001).

42. Tomte, L.T., *et al.* Hematopoietic cells are a source of nidogen-1 and nidogen-2 during mouse liver development. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **54**, 593-604 (2006).
43. Heiss, A., *et al.* Hierarchical role of fetuin-A and acidic serum proteins in the formation and stabilization of calcium phosphate particles. *The Journal of biological chemistry* **283**, 14815-14825 (2008).
44. Dziegielewska, K., *et al.* The expression of fetuin in the development and maturation of the hemopoietic and immune systems. *Histochemistry and cell biology* **106**, 319-330 (1996).
45. Zhang, P., *et al.* Intraperitoneal administration of fetuin-A attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver failure in mouse. *Digestive diseases and sciences* **59**, 1789-1797 (2014).
46. Heiss, A., *et al.* Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *The Journal of biological chemistry* **278**, 13333-13341 (2003).
47. Hsu, S.J., Nagase, H. & Balmain, A. Identification of Fetuin-B as a member of a cystatin-like gene family on mouse chromosome 16 with tumor suppressor activity. *Genome* **47**, 931-946 (2004).
48. Dietzel, E., *et al.* Fetuin-B, a liver-derived plasma protein is essential for fertilization. *Developmental cell* **25**, 106-112 (2013).
49. Sedaghat, F. & Notopoulos, A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia* **12**, 198-204 (2008).
50. Cross, S.S., Hamdy, F.C., Deloulme, J.C. & Rehman, I. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* **46**, 256-269 (2005).
51. Cheng, P., *et al.* Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* **205**, 2235-2249 (2008).
52. Roth, J., *et al.* MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* **82**, 1875-1883 (1993).
53. Brun, J.G., Jonsson, R. & Haga, H.J. Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *The Journal of rheumatology* **21**, 733-738 (1994).
54. Newton, R.A. & Hogg, N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *Journal of immunology* **160**, 1427-1435 (1998).
55. Edgeworth, J., Gorman, M., Bennett, R., Freemont, P. & Hogg, N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *The Journal of biological chemistry* **266**, 7706-7713 (1991).
56. Lagasse, E. & Weissman, I.L. Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. *Blood* **79**, 1907-1915 (1992).
57. Yang, J., *et al.* Calcium-Binding Proteins S100A8 and S100A9: Investigation of Their Immune Regulatory Effect in Myeloid Cells. *International journal of molecular sciences* **19**(2018).
58. Vogl, T., *et al.* Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature medicine* **13**, 1042-1049 (2007).
59. Laouedj, M., *et al.* S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood* **129**, 1980-1990 (2017).

60. Lim, S.Y., Yuzhalin, A.E., Gordon-Weeks, A.N. & Muschel, R.J. Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells. *Oncogene* **35**, 5735-5745 (2016).
61. Chiba, M., *et al.* Elevation and characteristics of Rab30 and S100a8/S100a9 expression in an early phase of liver regeneration in the mouse. *International journal of molecular medicine* **27**, 567-574 (2011).
62. Steppan, C.M., *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312 (2001).
63. Jamaluddin, M.S., Weakley, S.M., Yao, Q. & Chen, C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *British journal of pharmacology* **165**, 622-632 (2012).
64. Fain, J.N., Cheema, P.S., Bahouth, S.W. & Lloyd Hiler, M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochemical and biophysical research communications* **300**, 674-678 (2003).
65. Patel, L., *et al.* Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and biophysical research communications* **300**, 472-476 (2003).
66. Filkova, M., Haluzik, M., Gay, S. & Senolt, L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clinical immunology* **133**, 157-170 (2009).
67. Gnacinska, M., Malgorzewicz, S., Stojek, M., Lysiak-Szydłowska, W. & Sworczak, K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. *Advances in medical sciences* **54**, 150-157 (2009).
68. Chang, J.H., *et al.* Serum resistin as a novel marker of erythropoietin resistance in nondiabetic patients on hemodialysis. *The Tohoku journal of experimental medicine* **224**, 281-285 (2011).
69. Anderson, P.D., *et al.* Innate immunity modulates adipokines in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 2272-2279 (2007).
70. Mojiminiyi, O.A. & Abdella, N.A. Associations of resistin with inflammation and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **67**, 215-225 (2007).
71. Borissova, A.M., *et al.* Effect of erythropoietin on the metabolic state and peripheral insulin sensitivity in diabetic patients on haemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **8**, 93 (1993).
72. Mak, R.H. Correction of anemia by erythropoietin reverses insulin resistance and hyperinsulinemia in uremia. *The American journal of physiology* **270**, F839-844 (1996).
73. Rasic-Milutinovic, Z., *et al.* The effect of recombinant human erythropoietin treatment on insulin resistance and inflammatory markers in non-diabetic patients on maintenance hemodialysis. *Hippokratia* **12**, 157-161 (2008).
74. Wu, T., *et al.* [Correlation of human resistin gene expression with leukemia incidence]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* **17**, 1149-1153 (2009).
75. Tanaka, Y., *et al.* Alteration of adipokines during peripheral blood stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of clinical apheresis* **24**, 205-208 (2009).
76. Papaldo, P., *et al.* Does granulocyte colony-stimulating factor worsen anemia in early breast cancer patients treated with epirubicin and cyclophosphamide? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**, 3048-3055 (2006).
77. Tombran-Tink, J., Chader, G.G. & Johnson, L.V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Experimental eye research* **53**, 411-414 (1991).

78. Franco-Chuaire, M.L., Ramirez-Clavijo, S. & Chuaire-Noack, L. Pigment epithelium-derived factor: clinical significance in estrogen-dependent tissues and its potential in cancer therapy. *Iranian journal of basic medical sciences* **18**, 837-855 (2015).
79. Hou, J., *et al.* Pigment epithelium-derived factor promotes tumor metastasis through an interaction with laminin receptor in hepatocellular carcinomas. *Cell death & disease* **8**, e2969 (2017).
80. Ding, D.C., Wen, Y.T. & Tsai, R.K. Pigment epithelium-derived factor from ARPE19 promotes proliferation and inhibits apoptosis of human umbilical mesenchymal stem cells in serum-free medium. *Experimental & molecular medicine* **49**, e411 (2017).
81. Rorby, E., *et al.* The stem cell regulator PEDF is dispensable for maintenance and function of hematopoietic stem cells. *Scientific reports* **7**, 10134 (2017).
82. Ramirez-Castillejo, C., *et al.* Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nature neuroscience* **9**, 331-339 (2006).
83. De Marzo, A., Aruta, C. & Marigo, V. PEDF promotes retinal neurosphere formation and expansion in vitro. *Advances in experimental medicine and biology* **664**, 621-630 (2010).
84. Tomasi, T.B., Jr. Structure and function of alpha-fetoprotein. *Annual review of medicine* **28**, 453-465 (1977).
85. Johnson, P.J. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clinics in liver disease* **5**, 145-159 (2001).
86. Gabant, P., *et al.* Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12865-12870 (2002).
87. Bartha, J.L., Romero-Carmona, R., Comino-Delgado, R., Arce, F. & Arrabal, J. Alpha-fetoprotein and hematopoietic growth factors in amniotic fluid. *Obstetrics and gynecology* **96**, 588-592 (2000).
88. Dexter, T.M., *et al.* Stromal cells in haemopoiesis. *Ciba Foundation symposium* **148**, 76-86; discussion 86-95 (1990).
89. Forbes, E.G., Cronshaw, A.D., MacBeath, J.R. & Hulmes, D.J. Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix. *FEBS letters* **351**, 433-436 (1994).
90. Okamoto, O. & Fujiwara, S. Dermatopontin, a novel player in the biology of the extracellular matrix. *Connective tissue research* **47**, 177-189 (2006).
91. Li, X., *et al.* Dermatopontin is expressed in human liver and is downregulated in hepatocellular carcinoma. *Biochemistry. Biokhimiia* **74**, 979-985 (2009).
92. Kokkaliaris, K.D., *et al.* Identification of factors promoting ex vivo maintenance of mouse hematopoietic stem cells by long-term single-cell quantification. *Blood* **128**, 1181-1192 (2016).
93. Kramer, A.C., *et al.* Dermatopontin in Bone Marrow Extracellular Matrix Regulates Adherence but Is Dispensable for Murine Hematopoietic Cell Maintenance. *Stem cell reports* **9**, 770-778 (2017).
94. Santulli, G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Frontiers in endocrinology* **5**, 4 (2014).
95. Chou, S. & Lodish, H.F. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7799-7804 (2010).
96. Zhang, C.C., *et al.* Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* **12**, 240-245 (2006).
97. Zheng, J., Huynh, H., Umikawa, M., Silvany, R. & Zhang, C.C. Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood* **117**, 470-479 (2011).
98. Kubota, Y. Unveiling Angptl2, a rising HSC expander. *Blood* **124**, 833-834 (2014).

99. Xiao, Y., *et al.* Loss of Angiopoietin-like 7 diminishes the regeneration capacity of hematopoietic stem and progenitor cells. *Journal of hematology & oncology* **8**, 7 (2015).
100. Akhter, S., Rahman, M.M., Lee, H.S., Kim, H.J. & Hong, S.T. Dynamic roles of angiopoietin-like proteins 1, 2, 3, 4, 6 and 7 in the survival and enhancement of ex vivo expansion of bone-marrow hematopoietic stem cells. *Protein & cell* **4**, 220-230 (2013).
101. Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C.M. Transglutaminases: nature's biological glues. *The Biochemical journal* **368**, 377-396 (2002).
102. Siegel, M., *et al.* Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS one* **3**, e1861 (2008).
103. Jin, X., *et al.* Activation of extracellular transglutaminase 2 by thioredoxin. *The Journal of biological chemistry* **286**, 37866-37873 (2011).
104. Eckert, R.L., *et al.* Transglutaminase regulation of cell function. *Physiological reviews* **94**, 383-417 (2014).
105. Tsatmali, M., Walcott, E.C. & Crossin, K.L. Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain research* **1040**, 137-150 (2005).
106. Lin, X., Soderhall, K. & Soderhall, I. Transglutaminase activity in the hematopoietic tissue of a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, importance in hemocyte homeostasis. *BMC immunology* **9**, 58 (2008).
107. Junkunlo, K., Soderhall, K., Soderhall, I. & Noonin, C. Reactive Oxygen Species Affect Transglutaminase Activity and Regulate Hematopoiesis in a Crustacean. *The Journal of biological chemistry* **291**, 17593-17601 (2016).
108. Mantel, C.R., *et al.* Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell* **161**, 1553-1565 (2015).
109. Ghaffari, S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxidants & redox signaling* **10**, 1923-1940 (2008).
110. Eliades, A., Matsuura, S. & Ravid, K. Oxidases and reactive oxygen species during hematopoiesis: a focus on megakaryocytes. *Journal of cellular physiology* **227**, 3355-3362 (2012).
111. Prieto-Bermejo, R., Romo-Gonzalez, M., Perez-Fernandez, A., Ijurko, C. & Hernandez-Hernandez, A. Reactive oxygen species in haematopoiesis: leukaemic cells take a walk on the wild side. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **37**, 125 (2018).
112. Farach-Carson, M.C., Warren, C.R., Harrington, D.A. & Carson, D.D. Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **34**, 64-79 (2014).
113. Roberts, R., *et al.* Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* **332**, 376-378 (1988).
114. Drzeniek, Z., *et al.* Heparan sulfate proteoglycan expression is induced during early erythroid differentiation of multipotent hematopoietic stem cells. *Blood* **93**, 2884-2897 (1999).
115. Wadhwa, S., Embree, M.C., Bi, Y. & Young, M.F. Regulation, regulatory activities, and function of biglycan. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **14**, 301-315 (2004).
116. Nastase, M.V., Young, M.F. & Schaefer, L. Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **60**, 963-975 (2012).
117. Hildebrand, A., *et al.* Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *The Biochemical journal* **302 (Pt 2)**, 527-534 (1994).
118. Tufvesson, E. & Westergren-Thorsson, G. Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin. *FEBS letters* **530**, 124-128 (2002).

119. Chen, X.D., Fisher, L.W., Robey, P.G. & Young, M.F. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 948-958 (2004).
120. Desnoyers, L., Arnott, D. & Pennica, D. WISP-1 binds to decorin and biglycan. *The Journal of biological chemistry* **276**, 47599-47607 (2001).
121. Babelova, A., *et al.* Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *The Journal of biological chemistry* **284**, 24035-24048 (2009).
122. Schaefer, L., *et al.* The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2223-2233 (2005).
123. Moreth, K., Iozzo, R.V. & Schaefer, L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell cycle* **11**, 2084-2091 (2012).
124. Amenta, A.R., *et al.* Biglycan is an extracellular MuSK binding protein important for synapse stability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 2324-2334 (2012).
125. Kiel, M.J., Radice, G.L. & Morrison, S.J. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell stem cell* **1**, 204-217 (2007).
126. Csont, T., *et al.* Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: role of nitric oxide. *Journal of molecular and cellular cardiology* **48**, 649-652 (2010).
127. Forsberg, E.C., *et al.* Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. *PLoS genetics* **1**, e28 (2005).
128. Baghy, K., *et al.* Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **91**, 439-451 (2011).
129. Baghy, K., Iozzo, R.V. & Kovalszky, I. Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **60**, 262-268 (2012).
130. Ma, R., *et al.* Decorin accelerates the liver regeneration after partial hepatectomy in fibrotic mice. *Chinese medical journal* **127**, 2679-2685 (2014).
131. Ichii, M., Frank, M.B., Iozzo, R.V. & Kincade, P.W. The canonical Wnt pathway shapes niches supportive of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* **119**, 1683-1692 (2012).
132. Bedossa, P., *et al.* Apolipoprotein AI is a serum and tissue marker of liver fibrosis in alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research* **13**, 829-833 (1989).
133. Floren, C.H., Franzen, J. & Albers, J.J. Apolipoprotein A-I in liver disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* **22**, 454-458 (1987).
134. Feng, Y., *et al.* Hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and differentiation is differentially regulated by high-density and low-density lipoproteins in mice. *PloS one* **7**, e47286 (2012).
135. Yvan-Charvet, L., *et al.* ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science* **328**, 1689-1693 (2010).
136. Reza, R., Wysoczynski, M., Yan, J., Lambris, J.D. & Ratajczak, M.Z. The role of third complement component (C3) in homing of hematopoietic stem/progenitor cells into bone marrow. *Advances in experimental medicine and biology* **586**, 35-51 (2006).
137. Ratajczak, J., *et al.* Mobilization studies in mice deficient in either C3 or C3a receptor (C3aR) reveal a novel role for complement in retention of hematopoietic stem/progenitor cells in bone marrow. *Blood* **103**, 2071-2078 (2004).
138. Tanaka, S., *et al.* Periostin supports hematopoietic progenitor cells and niche-dependent myeloblastoma cells in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* **478**, 1706-1712 (2016).

139. Mikkola, H.K. & Orkin, S.H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733-3744 (2006).
140. Dorshkind, K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annual review of immunology* **8**, 111-137 (1990).
141. Clark, B.R. & Keating, A. Biology of bone marrow stroma. *Annals of the New York Academy of Sciences* **770**, 70-78 (1995).
142. Verfaillie, C., Hurley, R., Bhatia, R. & McCarthy, J.B. Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Critical reviews in oncology/hematology* **16**, 201-224 (1994).
143. Klein, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* **51**, 914-926 (1995).
144. Klein, G., Muller, C.A., Tillet, E., Chu, M.L. & Timpl, R. Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* **86**, 1740-1748 (1995).
145. Fernandez, M. & Minguell, J.J. Adhesive interactions in the hematopoietic system: regulation by cytokines. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **212**, 313-323 (1996).
146. Klein, G., *et al.* Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **16**, 307-317 (1998).
147. Whetton, A.D. & Spooncer, E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Current opinion in cell biology* **10**, 721-726 (1998).
148. Seiffert, M., *et al.* Mitogenic and adhesive effects of tenascin-C on human hematopoietic cells are mediated by various functional domains. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **17**, 47-63 (1998).
149. Groenen, M.A., *et al.* Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* **491**, 393-398 (2012).
150. Rudolph, A.M. Hepatic and ductus venosus blood flows during fetal life. *Hepatology* **3**, 254-258 (1983).
151. Lind, J. Changes in the Liver Circulation at Birth. *Annals of the New York Academy of Sciences* **111**, 110-120 (1963).
152. Combs, M.D., *et al.* Microfibril-associated glycoprotein 2 (MAGP2) loss of function has pleiotropic effects in vivo. *The Journal of biological chemistry* **288**, 28869-28880 (2013).

CAPÍTULO 2

Producción y caracterización de Hepatoblastos derivados de Células Embrionarias humanas *in vitro*

INTRODUCCIÓN

El hígado es la glándula interna más grande del cuerpo y uno de los órganos más importantes en la homeostasis, ya que es el encargado de muchas funciones metabólicas exocrinas y endocrinas. Entre ellas, es responsable de la desintoxicación y eliminación de una gran variedad de sustancias, de la regulación de los niveles de glucosa, del mantenimiento de la homeostasis sanguínea y de la producción de muchos productos, incluidos lípidos, proteínas, vitaminas y carbohidratos.

Además de esto, el hígado posee una capacidad regenerativa única, pudiendo regenerar la mayor parte de su función después de haber perdido hasta tres cuartas partes de su masa como resultado de una hepatectomía parcial o de una lesión tóxica. Sin embargo, en pacientes gravemente enfermos con una enfermedad hepática terminal, esta capacidad de regeneración se encuentra muy limitada, y el trasplante de hígado se convierte en la única solución. Esto también es aplicable a pacientes con cirrosis descompensada, carcinoma hepatocelular, errores congénitos del metabolismo e insuficiencia hepática fulminante. Sin embargo, hoy en día el número de pacientes que esperan un trasplante de hígado excede al número de trasplantes realizados.

Por ello, actualmente se está considerando el trasplante de hepatocitos o de células madre/progenitoras hepáticas como una posible alternativa al trasplante de hígado, lo cual ha demostrado ser eficaz en estudios preclínicos con modelos animales^{1,2}. Sin embargo, aislar y expandir hepatocitos *in vitro* no es nada fácil, ya que éstos terminan sufriendo un proceso denominado desdiferenciación. Los HB son progenitores hepáticos bipotenciales con una alta capacidad proliferativa. Son considerados como una fuente celular potencialmente valiosa tanto en medicina regenerativa como en el cribado de fármacos para el tratamiento de enfermedades hepáticas graves. Sin embargo, la inducción de la proliferación de estas células es bastante difícil *ex vivo* así como su acceso es bastante limitado a partir de tejido donado. Por este motivo, las PSC humanas se definen actualmente como una fuente renovable prometedora para cualquier tipo de célula adulta, y la generación de HB y otras SC.

Aunque, poco a poco se han ido logrando pequeños progresos en cuanto a la generación de hepatocitos a partir de PSC humanas³⁻⁸, todavía sigue siendo un desafío el mantener,

en condiciones definidas, el fenotipo de las células madre/progenitoras hepáticas que se generan durante la diferenciación de PSC humanas. En el caso de los HB, Turner *et al.* consiguieron mantener el fenotipo de los HB humanos a través de su cultivo en hidrogeles de hialuronano⁹. Descubrieron que los HB expresaban receptores para esta molécula procedentes de la ECM, por lo que se convirtió en un ideal candidato para la expansión y/o diferenciación de progenitores hepáticos. Sin embargo, debido tanto al acceso limitado a los HB humanos como a los problemas generados a consecuencia de su mantenimiento y propagación, la diferenciación de células PSC humanas en progenitores bipotenciales hepáticos proporciona una solución más factible. En 2009 fueron generados, por primera vez, células progenitoras hepáticas derivadas de ESC¹⁰. A través de la activación de las rutas FGF y BMP, la purificación de N-cadherina y el co-cultivo con células alimentadoras, dio lugar a colonias progenitoras hepáticas, las cuales tenían un potencial de proliferación de más de 100 días. Además, co-expresaban AFP y CK17 y poseían la capacidad de diferenciarse en células similares a hepatocitos y a colangiocitos. Mitsuru *et al.* desarrollaron un método para inducir el fenotipo característico de los HB mediante la expresión del gen *HEX*, esencial para la diferenciación hepática¹¹. Para ello, transduccieron células ESC e iPSC con un adenovirus, de tal manera, que al día 9 estas células eran capaces de expresar AFP y ALB al día 12, así como varias isoenzimas del citocromo P450¹¹. Zhang *et al.* propusieron otro enfoque distinto centrado en el uso de pequeñas moléculas¹². Generaron HB a partir de ESC, los cuales podían ser mantenidos en cultivo y diferenciados, a posteriori, en hepatocitos y en colangiocitos¹². Por su parte, otros investigadores consiguieron expandir HB procedentes de PSC humanas a través de su cultivo en LN-111¹³. Consiguieron que durante tres meses estos progenitores hepáticos se expandieran, manteniendo la capacidad de diferenciación a hepatocitos y colangiocitos¹³. Por su parte, Ludovic Vallier *et al.* publicaron en 2015 un protocolo para la diferenciación directa de PSC humanas en colangiocitos¹⁴. Éstas mostraron características funcionales propias de los colangiocitos como la transferencia de ácido biliares, la actividad fosfatasa alcalina, la actividad de γ -glutamyl-transpeptidasa así como respuestas fisiológicas a la secretina, la somatostatina y el VEGF¹⁴.

Sin embargo, los protocolos actuales para la producción de HB a partir de células ESC *in vitro*, conllevan el uso de capas alimentadoras, transducciones virales o formulaciones de medios muy complejas. También se desconoce el perfil de expresión de los HB generados a partir de PSC humanas en factores de crecimiento que soporten las células hematopoyéticas.

OBJETIVOS

Por lo tanto, los objetivos de ese capítulo son:

- 1- Generación de HB a partir de ESC humanas.
- 2- Expansión y caracterización de los HB humanos *in vitro* generados a partir de ESC humanas.
- 3- Caracterización de la capacidad bipotencial de los HB generados a partir de las ESC humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diferenciación de las ES4 en HB

Para llevar a cabo la diferenciación de las ESC en HB humanos se empleó una adaptación del protocolo de Mallanna y Duncan¹⁵. Se emplearon ESC procedentes del Banco Nacional de Líneas Celulares del Instituto de Salud Carlos III denominadas ES4, y previamente aprobadas para el uso en este proyecto por la Comisión de Garantías del Instituto de Salud Carlos III.

1.1 Expansión de las ES4

Las ES4 se expandieron en medio de cultivo cGMP mTeSRTM1 (StemCell Technologies, 85850). Una vez confluyente el cultivo (60-70%) se trataron con releSR (StemCell Technologies, 05872) durante 2 min a 37°C. Finalmente, la suspensión celular se traspasó a una nueva placa de cultivo, tratada previamente con Matrigel (MG) 1:40 (Corning, 354234), en una dilución 1:6-1:15.

1.2 Protocolo de diferenciación de las ES4 en HB

Para llevar a cabo la diferenciación de las ES4 en HB, primero las células se diferenciaron a endodermo definitivo, después a endodermo hepático y finalmente a progenitor hepático¹⁵ (Figura 1). Para comenzar la diferenciación es necesario partir de un cultivo al 80% de confluencia en el cual no haya ningún signo de diferenciación.

Reactivos:

Medio día 1-2

Advanced RPMI 1640 (Gibco, 12633), 1% (v/v) P/S (Sigma, P0781), 2 mM L-Glutamina (Sigma, G7513), 1% (v/v) B27 (sin insulina) (Gibco, A1895601), 100 ng/mL Activina A (Peprotech, 120-14P), 10 ng/mL BMP4 (Peprotech, 120-05), 20 ng/mL FGF-2 (Peprotech, 100-18B).

Medio día 3-4-5

Advanced RPMI 1640, 1% (v/v) B27 (sin insulina), 100 ng/mL Activina A, 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina.

Medio día 6-7-8-9-10

Advanced RPMI 1640, 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina, 1% (v/v) B27 (con insulina) (Gibco, 17504044), 20 ng/mL BMP-4, 10 ng/mL FGF-2.

Medio día 11-12-13-14-15

Advanced RPMI 1640, 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina, 1% (v/v) B27 (con insulina), 20 ng/mL HGF (Peprotech, 100-39).

Medio día 16-17-18-19-20

Advanced RPMI 1640, 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina, 1% (v/v) B27 (con insulina), 0,1 μ M Dexametasona (Peprotech, 100-39), 20 ng/mL EGF (Peprotech, AF-100-15), 20 ng/mL HGF, 20 ng/mL Oncostatina M (Sigma, D4902).

Se trataron las células con Acutasa (Sigma, A6964) durante 4 min a 37°C. A continuación se neutralizaron y se centrifugó a 200xg 3 min a RT. Se realizó un recuento celular y se sembraron alrededor de 1,4 millones de células en una placa de 6 pocillos (Sigma, SIAL0506), y/o 125.000 células en una placa de 48 pocillos (Biolite, 130187), previamente tratadas con MG. El cultivo se dejó durante 24 h a 37°C, 4% O₂/5% CO₂ (Día 0) en medio cGMP mTeSR™1 suplementado con 2 μ M Thiazovivin (Tocris, 3485) para aumentar la viabilidad celular. Durante los días 1-2-3-4-5, se cambió el medio diariamente en normoxia, mientras que el resto de días de diferenciación se realizó en hipoxia hasta el día 16.

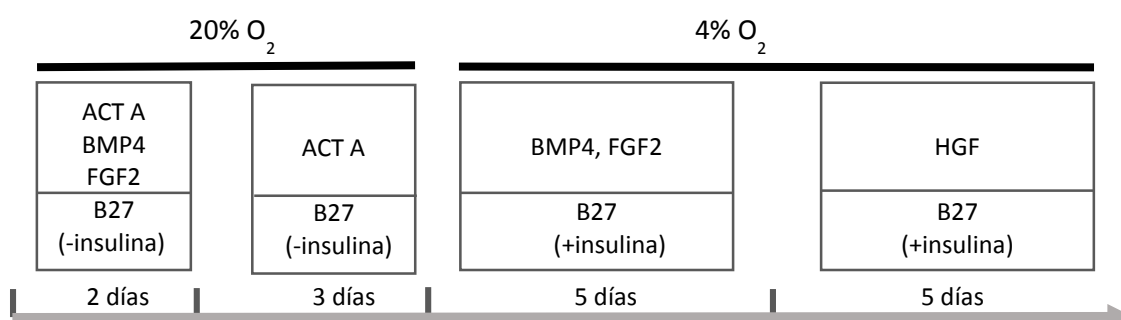


Figura 1: Representación esquemática del protocolo de diferenciación.

1.3 Almacenamiento de los HB derivados de las ES4

Los HB obtenidos tras el protocolo de diferenciación se congelaron en una solución comercial (Promocell, C-29912) a -80°C. Tras 24 h, se almacenaron en nitrógeno líquido.

2. Expansión de los HB derivados de las ES4

2.1 Expansión de los HB humanos derivados de las ES4

Los HB obtenidos tras los 16 días de diferenciación se sembraron en un gel de MG como previamente se había descrito^{16,17}.

Reactivos:

Medio de expansión (EM)

Advanced DMEM 12 (Gibco, 12634), 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina, 10 mM HEPES (Sigma, H0887), 1% (v/v) B27 (con insulina), 1x N2 (Gibco, 17502001), 1 mM Nicotinamida (Sigma, N0636), 30% Medio condicionado R-Spondin 1, 10 µM Thiazovivina (Tocris, 3485), 1,25 mM N-acetil-L-cisteína (Sigma, A7250), 5 µM A8301 (Tocris, 2939), 10 µM Forskolin (Selleckchem, S2449), 100 ng/mL FGF-10 (Peprotech, 100-26), 50 ng/mL EGF, 25 ng/mL HGF, 10 nM Gastrina (Eurogentec, AS-64149).

EL cultivo se trató con Tryple Express (Gibco, 12605028) durante 5 min a 37°C. Se neutralizó con Advanced DMEM y se centrifugó a 200xg 3 min. A continuación, se resuspendió el pellet celular en MG con factores de crecimiento reducidos (MG GFR) (Corning, 354230) y se sembraron 50 µL de la suspensión en una placa de 24 pocillos (Biolite, 930186). Se dejó solidificar el MG durante 15 min a 37°C y se añadieron 500 µL de EM. Cada dos días se procedió al cambio de medio fresco.

Una vez confluyente el cultivo, aproximadamente a los 7 días, se procedió al pasaje de las células. Para ello, se añadió Advanced DMEM F12 frío sobre el cultivo y se diluyó hasta un volumen final de 10 mL. Se centrifugó a 200xg 5 min a 4°C y se añadió nuevamente Advanced DMEM frío para seguir diluyendo el MG. Se centrifugó y se procedió a la disgregación celular pipeteando entre 40x-50x. Finalmente, se retiró al máximo el sobrenadante, se resuspendió el pellet con MG GFR y se sembraron 50 µL de la

suspensión en una placa de 24 pocillos. Se dejó solidificar el MG durante 15 min a 37°C y se añadieron 500 µL de EM. Cada dos días se procedió al cambio de medio fresco.

2.2 Almacenamiento de los HB humanos derivados de las ES4

Los HB expandidos se congelaron diferenciación se congelaron en una solución comercial a -80°C. Tras 24 h, se almacenaron en nitrógeno líquido.

3. Caracterización de los HB derivados de las ES4

Los HB obtenidos tras los 16 días de diferenciación se caracterizaron mediante reacción en cadena reversa de la transcripción polimerasa (RT-PCR), citometría de flujo (FC) e inmunofluorescencia (IF).

3.1 Caracterización de los HB por RT-PCR

En cada etapa del proceso de diferenciación (día 1, día 3, día 6, día 11, día 16 y día 21) se recogieron 200.000-300.000 células para su análisis mediante RT-PCR.

Extracción y cuantificación del RNA

Se añadió Trizol (Invitrogen, 15596026) y con una aguja de 25G (Braun, 300600) se procedió a la disgregación celular. La extracción del ácido ribonucleico (RNA) se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se cuantificó en el Nanodrop y a continuación se almacenó a -80°C. El ratio 260/280 de las absorbancias obtenidas a 260 nm y 280 nm indican la pureza del RNA obtenido y el valor del ratio 260/280 debe estar entre 2,0 y 2,2. Como control de pluripotencia de las ES4, se realizó también una caracterización inicial de las células.

Síntesis cDNA

La síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) a partir de RNA se llevó a cabo a partir de 150 ng de RNA a través de una SuperMix (Biotool, B24408) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las muestras se cargaron en el Termociclador Veriti™ (Thermo Fisher, 4375305) siguiendo el programa del fabricante.

RT-PCR

La RT-PCR se llevó a cabo mediante el uso de una Super Master Mix (Biotool, B46018) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las muestras se cargaron en el termociclador (Termociclador Veriti™, Thermo Fisher) siguiendo el programa del fabricante. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 1.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)
Oct4	F: GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT R: GGCCTGCATGAGGGTTTCT	60	420
Rex1	F: ACATGACAGGCAAGAAGCTTCCGC R: GAGCCCGGATCCTACTTTCCCTCTTGTTTCATTCTT	60	156
Fox2	F: CACCACTACGCCTTCAACC R: GGTAGTAGGAGGTATCTGCGG	62	235
GATA4	F: CCACAAGGCTATGCGTCTC R: CTTCTTTGCTATCCTCCAAGTC	56	172
HNF4α	F: GTACTCCTGCAGATTTAGCC R: CTGTCCTCATAGCTTGACCT	56	162
ALB	F: AGTGGGCAGCAAATGTTGTAAAC R: TCAGGACCACGGATAGATAGTCTTC	60	77
AFP	F: GATGAAACATATGTCCCTCCTG R: ATGAGAAACTCTTGCTTCATCG	60	110
CYP3A4	F: TGATGGTCAACAGCCTGTGCTGG R: CCACTGGACCAAAGGCCTCCG	60	110
CYP2C9	F: TGAAAGCTTGAAAACACTGCA R: GCATATCTCAGGGTTGTGCTTG	60	75
SULT	F: CCAGTTATTCCCAAGTCTTTCT R: AAACATCTCTGGGATTTCTCATGAG	60	74
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: GAAGATGGTGATGGGATTC	55	226

Tabla 1: Lista de cebadores.

Los productos de PCR se separaron mediante un gel de Agarosa (Invitrogen, 15510-027) al 2% y se tiñeron con SybrSafe (Invitrogen, s33102).

Asimismo se llevó a cabo el estudio del marcador extracelular LGR5 (Tabla 2). Para ello, se recogieron células desde el día de diferenciación 12 hasta el día 21, con el estudio de la expresión de LRG5 en función de los días de diferenciación.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)
LGR5	F: GACTTTAACTGGAGCACAGA R: AGCTTTATTAGGGATGGCAA	55	282

Tabla 2: Lista de cebadores.

3.2 Caracterización de los HB por FC

Para el análisis de los HB mediante FC, se llevó a cabo el análisis de los marcadores EpCAM, ALB y AFP a los 16 días de diferenciación.

Reactivos:

Tampón de citometría

DPBS (Sigma, D8537), 2% FBS (Gibco, 10270106). Almacenar a 4°C.

El cultivo se trató con Tryple Express (*véase sección 2.1*), se realizó un recuento celular y se repartieron alrededor de 150.000 células por condición. Se lavó con el tampón de citometría y en 50 µL del mismo se añadió el anticuerpo primario (Tabla 3) durante 1h a 4°C. Se lavaron las muestras con el tampón de citometría y se añadieron los anticuerpos secundarios (Tabla 3) en 50 µL de mismo durante 30 min a 4°C. Finalmente, se lavaron las muestras y se resuspendieron en 200 µL de tampón de citometría con 0,5 µL de Sytox (Molecular Probes, S11341). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FACSAria, BD). Se realizaron también los isotipos correspondientes.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
EpCAM	Santa Cruz Biotechnology, sc-66020	1:50
AFP	Invitrogen, PA5-16658	1:20
ALB	Santa Cruz Biotechnology, sc-46293	0,5:50
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, A11029	0,5:50
Alexa Fluor 568	Molecular Probes, A11036	0,5:50
Isotipo PE/FITC	BD, 349526	5:50
Isotipo APC	BD, 345818	2,5:50

Tabla 3: Lista de anticuerpos.

3.3 Caracterización de los HB por IF

Para el análisis de los HB mediante IF, se llevó a cabo el análisis de los marcadores EpCAM, CK19, ALB y AFP.

Fijación y procesamiento

Se añadió Advanced DMEM F12 frío para retirar las células de la placa de cultivo añadiendo y se centrifugaron a 60xg 5 min a 4°C. Se fijaron con PFA al 4% + 0,1% Eosina durante 1 h a RT y con Etanol 70% durante 24 h a RT. Al día siguiente, se retiró el Etanol y se añadió Etanol 96% + 0,1% Eosina. A los 30 min se retiró y se procedió a la deshidratación de la muestra siguiendo la secuencia: Etanol 100° 20 min dos veces, Etanol 100° + 0,1% Eosina 20 min, n-Butanol (Merck, 1310821611) 20 min dos veces y Parafina 20 min a 60°C tres veces. Finalmente, las células fueron embebidas en Parafina y montadas en un *cassette*. Las muestras se cortaron con un grosor de 3 µm en un micrótopo.

Inmunofluorescencia

Las muestras se desparafinaron siguiendo la secuencia: Xileno 5 min dos veces, Etanol 100° 5 min, Etanol 96° 5 min, Etanol 70° 5 min. Se trataron con una solución de recuperación de antígenos (Dako, S1699) durante 30 min a 98°C y con Boro hidruro de sodio (Thermo Fisher, s/2560/48), al 0,1% en PBS durante 10 min para reducir la

autofluorescencia producida por la propia muestra. Se bloqueó con la Solución de Bloqueo (Dako, X0909) durante 1 h a RT y se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios (Tabla 4) diluidos en la Solución de Bloqueo durante 24 h a 4°C en una cámara húmeda para evitar la evaporación. Al día siguiente, las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 4) diluidos en la Solución de Bloqueo durante 1 h a RT y se montaron con Medio de montaje (VectorLabs, H-1400) + 1:1000 DAPI (Sigma, D9542). Las muestras se analizaron en un microscopio invertido de fluorescencia (IX81, Olympus).

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
EpCAM	Santa Cruz Biotechnology, sc-25308	1:250
CK19	Máster Diagnóstica, MAD-002163KD-3	Listo para usar
AFP	Invitrogen, PA5-16658	1:250
ALB	Santa Cruz Biotechnology, sc-46293	1:250
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, A11029	1:400
Alexa Fluor 568	Molecular Probes, A11036	1:400

Tabla 4: Lista de anticuerpos.

4. Diferenciación Hepatocítica y Colangiocítica de los HB derivados de las ES4

Para demostrar la capacidad bipotencial de los HB generados a partir de las ESC humanas, se llevó a cabo la diferenciación hacia el linaje hepatocítico y al colangiocítico.

4.1 Diferenciación Hepatocítica

Reactivos:

Medio de expansión (EM) (véase sección 2.1)

Medio de diferenciación hepatocítica (HDM)

Advanced DMEM 12, 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina, 10 mM Hepes, 1% (v/v) B27 (con insulina), 1% (v/v) N2, 1,25 mM N-acetil-L-cisteína, 5 µM A8301, 50 ng/mL EGF, 25 ng/mL HGF, 10 nM Gastrina, 30 µM Dexametasona.

Se expandieron los HB (*véase sección 2.1*). Una semana antes de comenzar la diferenciación hepatocítica, se añadió 25 ng/mL BMP7 al ME. Al día 0 de comenzar la diferenciación, las células se pasaron 1:1 (*véase sección 2.1*) y se embebieron en MG GFR. Por placa de 24 pocillos se sembraron 50 μ L de la suspensión. Se dejó solidificar el MG durante 15 min a 37°C y se añadieron 500 μ L de HDM. Cada dos días se procedió al cambio de medio fresco.

Análisis de la función hepatocítica

Al séptimo día de la diferenciación, las células fueron recolectadas para llevar a cabo el análisis de la función hepatocítica mediante RT-PCR (*véase sección 3.1*) y mediante medición enzimática. Para la medición enzimática, se lisaron las células con Agua miliQ y se llevó a cabo el análisis de la Amino aspartato transferasa (ALAT), Alanina aminotransferasa (ASAT), Lactato deshidrogenasa (LDH), Glutamato deshidrogenasa (GLDH), ALB y proteína total siguiendo las instrucciones del fabricante. Las medidas se realizaron en DxC-600 Beckman (Beckman Coulter). Los valores obtenidos fueron corregidos en función del nivel de proteína total.

5.2 Diferenciación Colangiocítica

Reactivos:

Medio de expansión (*véase sección 2.1*)

Medio de diferenciación colangiocítica (CDM)

Advanced DMEM 12, 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina, 1 mM Hepes, 1x ITS (Gibco, 51500056), 1x B27 (con insulina), 1,25 mM N-acetil-L-cisteína, 5 μ M A8301, 50 ng/mL EGF, 25 ng/mL HGF, 10 nM Gastrina, 30% Medio condicionado R-Spondin 1.

Gel Colágeno I/Matrigel

El stock de COL I se diluye a 1,2 mg/mL con Medio 199 10x (Gibco, 21180) y se equilibra el pH con Hidróxido de Sodio 1 M. La mezcla COL I/MG está formada por un 40% de COL I (BD, 354236) y por un 60% de MG GFR. Trabajar a 4°C.

Se expandieron los HB (*véase sección 2.1*). Al día 0 de comenzar la diferenciación, las células se pasaron 1:2 (*véase sección 2.1*) y se embebieron en COL I /MG. Por placa de 24 pocillos se sembraron 40 μ L de la suspensión. Se dejó solidificar durante 1 h a 37°C y se añadieron 500 μ L de CDM. Cada dos días se procedió al cambio de medio fresco.

Análisis de la función colangiocítica

Al séptimo día, se recolectaron las células. Se procedió a la fijación, procesamiento, tinción con H&E e IF de las células (*véase sección 3.3*). Los cortes se tiñeron con CK19, EpCAM y AFP (*véase sección 3.3*).

5. Expresión de marcadores hematopoyéticos de los HB derivados de las ES4

Se recogieron células desde el día de diferenciación 12 hasta el día 21, con el objetivo de demostrar que los HB generados a partir de las ES4 eran capaces de producir determinados factores de crecimiento (GF) hematopoyético (SCF, IGF-2, Ftl-3L, ANG-3, TPO, EPO) al igual que los HB humanos^{18,19}.

Extracción y cuantificación del RNA (véase sección 3.1)

Integridad del RNA (véase Apéndice)

Síntesis cDNA (véase sección 3.1)

qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo a través de una mix (PCRBiosystems, PB20.15-01) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, las muestras se cargaron por triplicado en una placa de 96 pocillos (Applied Biosystems, 4346907) en el termociclador (VIA7, Applied Biosystems) siguiendo el programa del fabricante. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 5.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)
SCF	F: CCATTGATGCCTTCAAGGAC R: GGCTGTCTCTTCTCCAGTA	60	286 y 202
iGF-2	F: CTTCGCCTCGTGCTGCATTG R: ACTCCTCAACGATGCCACGG	60	158
Angptl3	F: AAGACCTTCTCCAGACCGTGG R: TCTTGGTGCTCTTGGCTTGGA	60	146
Ftl-3L	F: GAGCCCAACAACCTATCTC R: GGACGAAGCGAAGACA	55	347
TPO	F: CTGCTTCGTGACTCCCATGTC R: CGCACCTTTCCTCGGAGCAG	60	360
EPO	F: CTGCTCCACTCCGAACAATCAC R: CTGGAGTGTCATGGGACAG	58	156
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC R: GAAGATGGTGATGGGATTC	55	226

Tabla 5: Lista de cebadores.

RESULTADOS

1. Expansión y diferenciación de las ES4 en HB

Las ES4 se expandieron en el medio cGMP mTeSR™1. Como muestra la Figura 2 se trata de colonias grandes y poligonales, ligeramente aplanadas y con bordes lisos. Poseen un tamaño uniforme con una elevada relación núcleo/citoplasma. A continuación, se muestra el proceso de diferenciación hasta obtener los progenitores hepáticos.

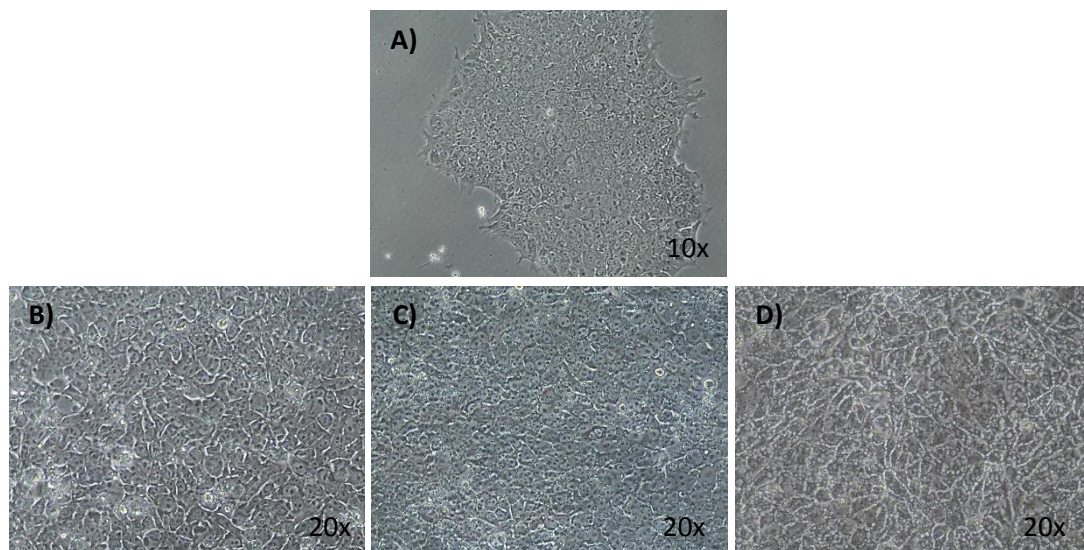


Figura 2: Protocolo de diferenciación. A) ES4 en cultivo, B) Endodermo definitivo, C) Endodermo hepático y D) Progenitor hepático.

2. Expansión de los HB derivados de las ES4

La expansión de los HB derivados de las ES4 se llevó a cabo en un gel de MG. Una vez alcanzada la confluencia, las células eran pasadas y sembradas de nuevo. Al tratarse de progenitores bipotenciales, estos consiguieron ser expandidos hasta p10 (Figura 3).

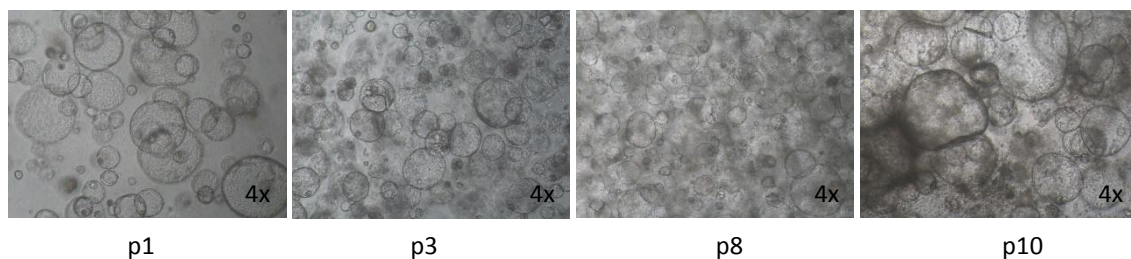


Figura 3: Expansión de los HB humanos derivados de las ES4 en MG GFR.

3. Caracterización de los HB derivados de las ES4

La caracterización de los HB se llevó a cabo por RT-PCR, FC e IF.

RT-PCR

La pluripotencia de las ES4 se verificó mediante RT-PCR (Figura 4). Como control positivo se utilizó otra línea embrionaria (H1) y como control negativo se emplearon las células endoteliales humanas de cordón umbilical (hUVEC). Se comprobó la pluripotencia de las células mediante la expresión de los marcadores de pluripotencia Oct4 y Rex1 (*véase Apéndice*).

El proceso de diferenciación de las ESC humanas en HB se siguió mediante RT-PCR. La expresión del marcador de pluripotencia, Oct4, disminuye conforme aumentan los días en el proceso de diferenciación. Por su parte, la expresión de los marcadores de diferenciación hepática, FOXA2, GATA4 y HNF4 α , aumenta conforme se van generando células más maduras. El marcador AFP, característico de progenitores bipotenciales, alcanza su máxima expresión sobre el día 16 de diferenciación. Conforme la maduración de los progenitores hepático, crece la expresión de los marcadores ALB, CYP3A4, CYP2C9 y SULT. Como control endógeno se empleó el gen GAPDH.

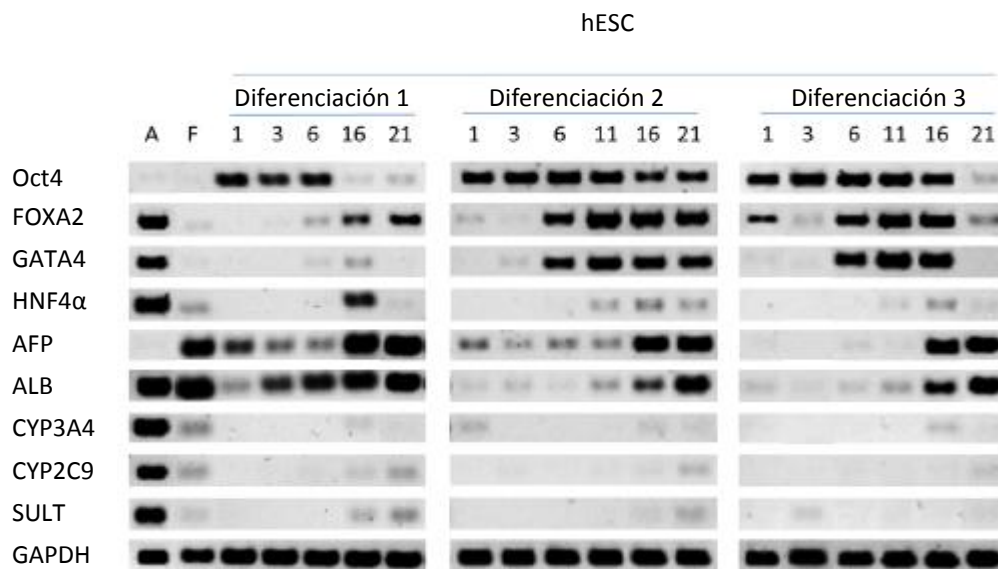


Figura 4: Caracterización de las células en las distintas etapas del proceso de diferenciación. A: Hígado adulto, F: Hígado fetal.

Mediante RT-PCR se mostró la expresión del marcador extracelular de SC adultas LGR (Figura 5). La expresión de LGR5 disminuye conforme aumentan los días de diferenciación y por lo tanto, la madurez de las células.

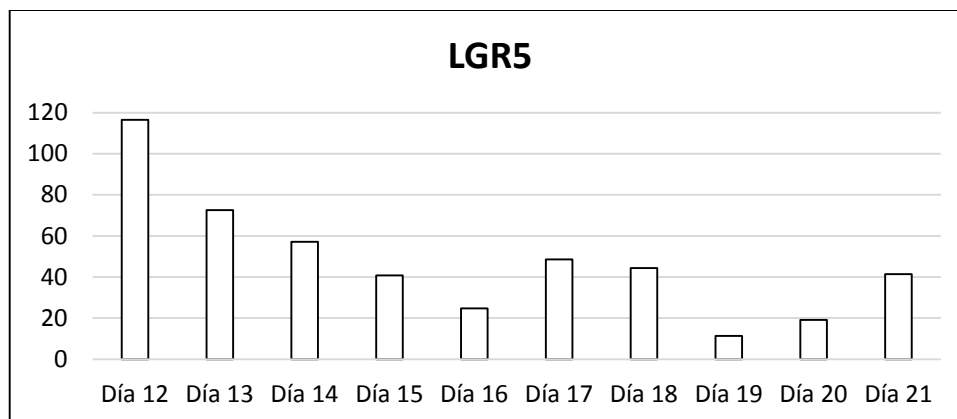


Figura 5: Expresión Lgr5 en función de los días de diferenciación de las ES4.

Citometría de flujo

Mediante FC se analizaron los siguientes marcadores: EpCAM, ALB y AFP a los 16 días de diferenciación. Como se observa en la Figura 6, las células fueron positivas para los marcadores de progenitores bipotenciales EpCAM (85,4 %) y AFP (56,3 %). ALB (68,3%), indicando una diferenciación hepática eficiente en este fenotipo.

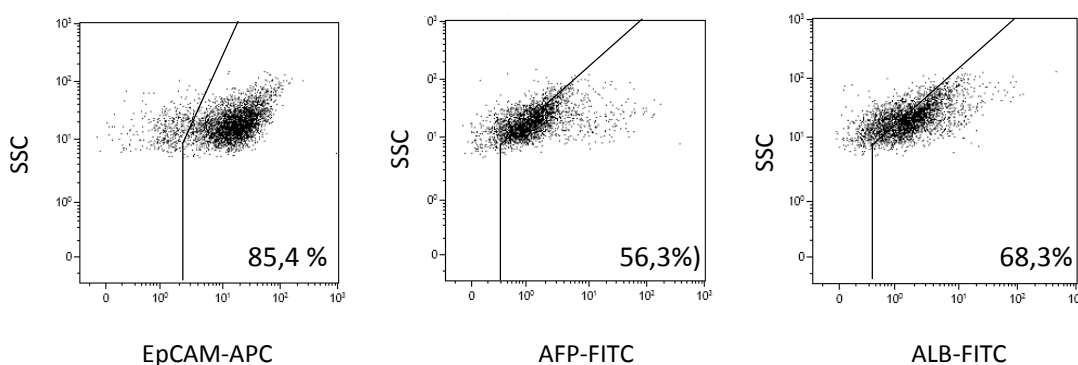


Figura 6: Caracterización de los HB derivados de las ES4 por FC.

Inmunofluorescencia

Mediante IF se evaluaron distintos marcadores de progenitores hepáticos, así como de células más diferenciadas. Se pretendía comprobar si tras las sucesivas expansiones, estos seguían manteniendo las características propias de un HB humano. Estas células

fueron positivas para los marcadores de progenitores bipotenciales CK19 y EpCAM. Mostraron una breve expresión de AFP y una expresión nula de ALB (Figura 7).

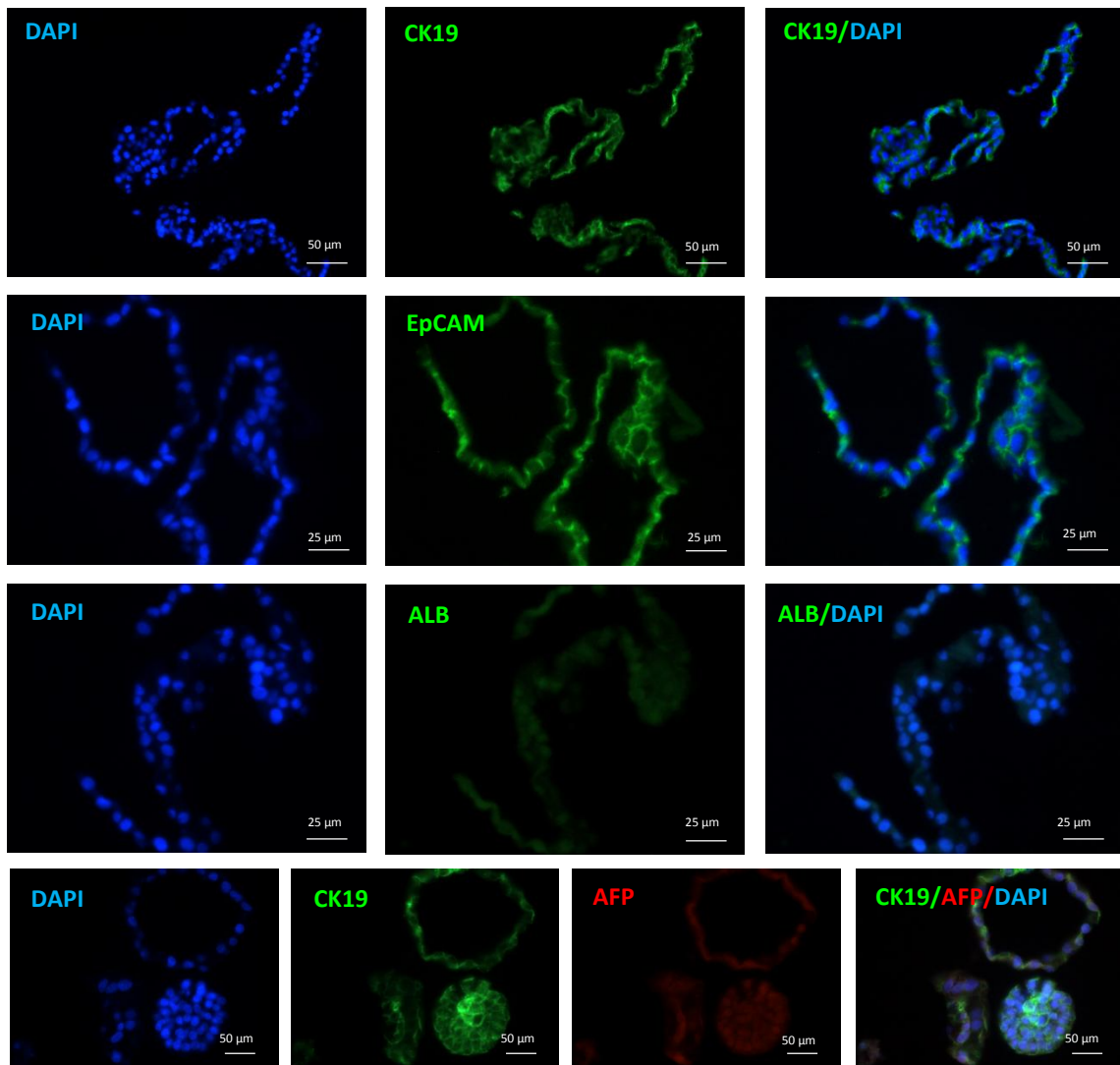


Figura 7: Caracterización de los HB derivados de las ES4 por IF.

4. Diferenciación Hepatocítica y Colangiocítica de los HB derivados de las ES4

A los 7 días de diferenciación hepatocítica, se observa un cambio en la morfología de las células, donde éstas adquieren una morfología mucho más compacta (Figura 8). Como se muestra en la Figura 8, tras la diferenciación hepatocítica las células obtenidas poseen una mayor actividad de enzimática ASAT, ALAT, GLDH y expresan más ALB. Mientras que la LDH se mantiene más o menos estable. Tras los 9 días de diferenciación colangiocítica, se observa como comienzan a formarse los ductos biliares. Además, tras su caracterización mediante H&E e IF se observa como estas células expresan los

marcadores típicos de células colangiocíticas, CK19 y EpCAM y ya no expresan AFP característico de progenitores bipotenciales (Figura 9).

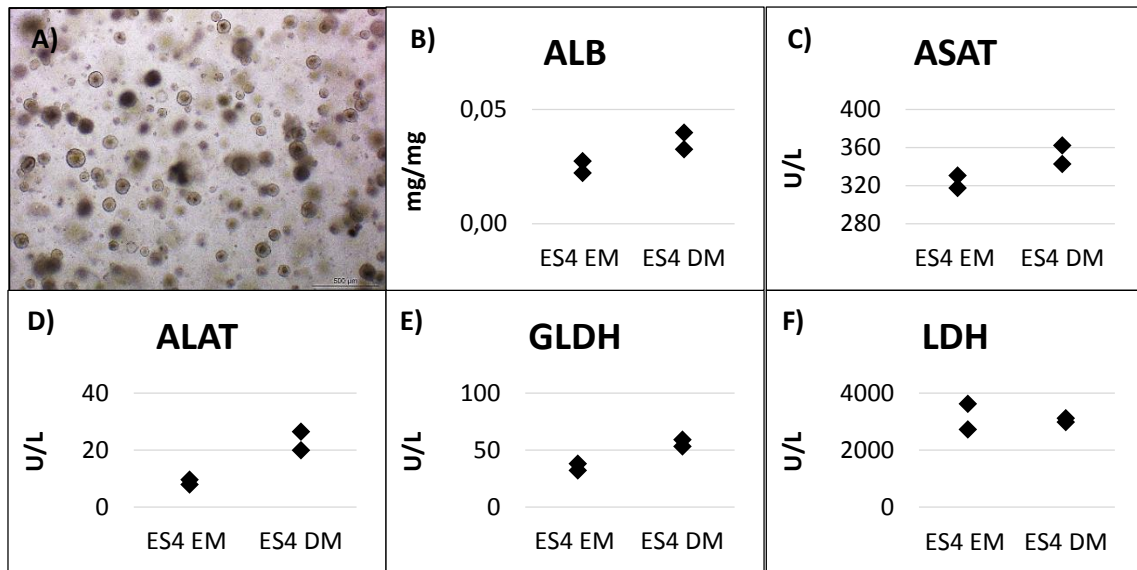


Figura 8: Diferenciación hepatocítica. A) *Hepatocyte-like cells*, B) Expresión de ALB, C) Expresión de ASAT, D) Expresión de ALAT, E) Expresión de GLDH, F) Expresión de LDH.

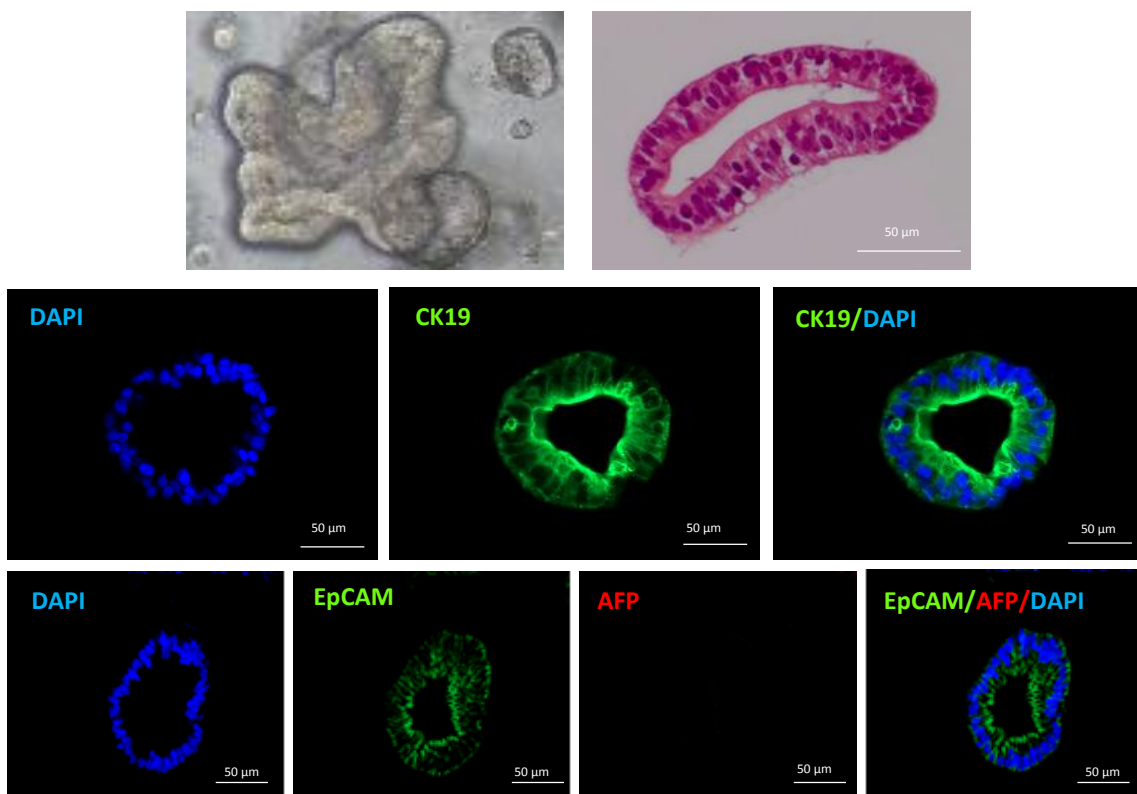


Figura 9: Diferenciación colangiocítica. A) *Cholangiocyte-like cells*, B) Caracterización mediante H&E, C) Caracterización mediante IF

5. Expresión de marcadores hematopoyéticos de los HB derivados de las ES4

Como se muestra a continuación los HB generados a partir de las ES4, son capaces de producir GF esenciales para el crecimiento y diferenciación hematopoyética (Gráfica 1).

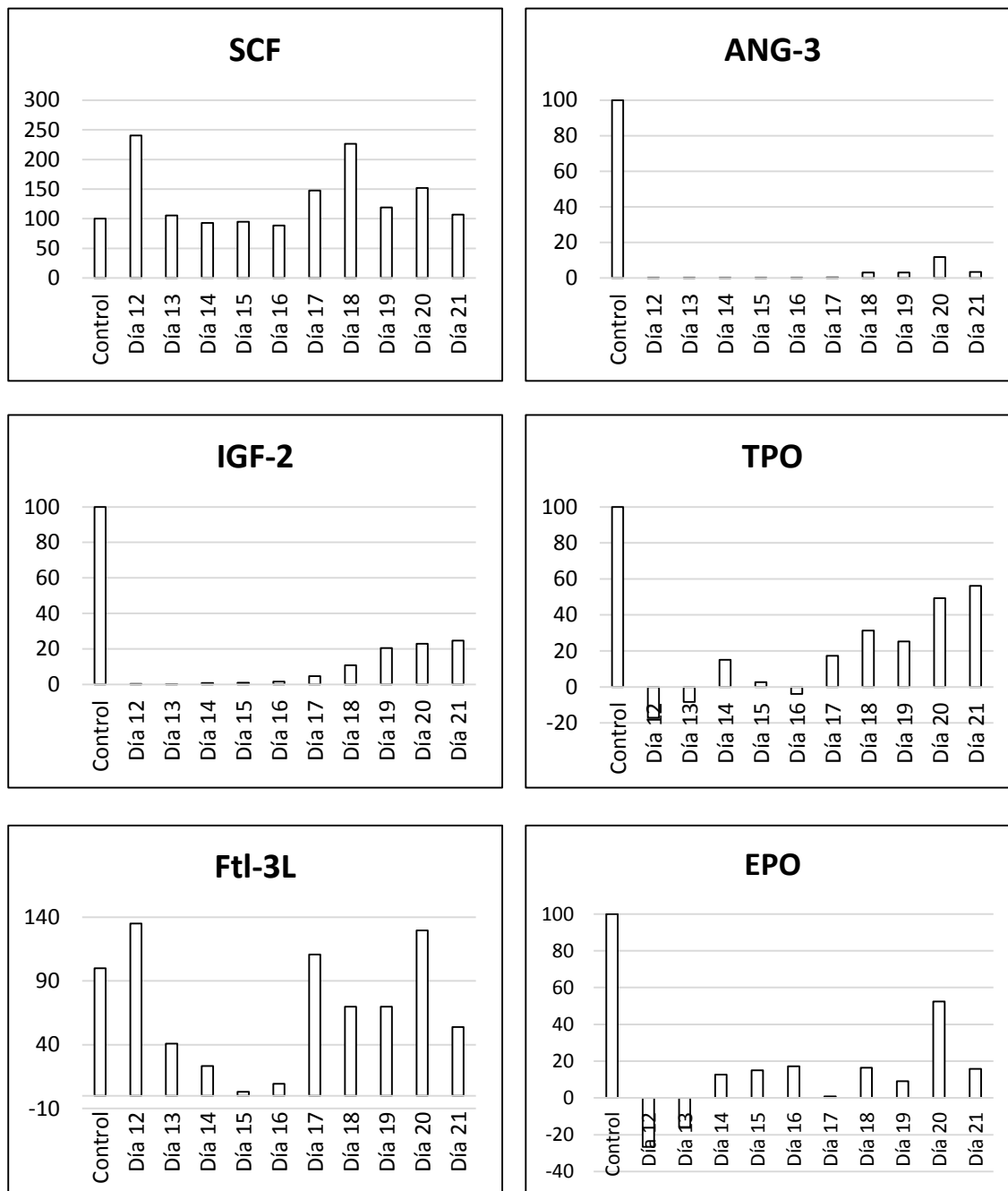


Figura 10: Expresión de SCF, ANG-3, IGF-2, TPO, Ftl-3L, y EPO en función de los días de diferenciación de las ES4.

Durante todos los días de diferenciación las células expresan SCF a un nivel bastante similar al control (FL humano), siendo bastante superior al día 12 y ligeramente superior

durante los últimos días de diferenciación. En cuanto a ANG-3, IGF-2 y TPO, éstos solo comienzan a expresarse en los últimos días de diferenciación a unos niveles mucho más bajos que el control. La expresión de Ftl-3L disminuye a partir del día 12 de diferenciación y termina aumentado los últimos días de diferenciación. Por su parte, la expresión de EPO va oscilando en función del día de diferenciación.

DISCUSIÓN

Hoy en día el número de pacientes que esperan un trasplante de hígado excede al número de trasplantes realizados. Por ello, el posible trasplante con células madre/progenitoras hepáticas podría ser en una posible alternativa al trasplante de hígado, lo cual ha demostrado ser eficaz en estudios preclínicos con modelos animales^{1,2}.

El cultivo de los HB *in vitro* podría convertirse en la solución para obtener de manera indefinida progenitores hepáticos. Estas células son consideradas como una fuente celular potencialmente valiosa tanto para el estudio los diferentes aspectos de la fisiología y patología hepática así como para el cribado de fármacos en el tratamiento de enfermedades hepáticas. Sin embargo, debido tanto al acceso limitado a esta fuente así como a los problemas generados en su mantenimiento y propagación; la diferenciación de células PSC humanas en progenitores bipotenciales proporciona una posible solución a este problema. La mayoría de protocolos actuales para generar progenitores hepáticos a partir de ESC llevan el uso de células alimentadoras¹⁰, la expresión de genes mediante lentivirus¹¹ o medios de cultivo muy complejos. Por lo tanto, aquí se plantea un nuevo protocolo para la generación y expansión de HB derivados de ESC *in vitro* en cultivo 3D con su posterior caracterización.

El protocolo empleado para la generación de HB a partir de ESC humanas consistió en una adaptación del protocolo de Mallanna y Duncan¹⁵. Se trata de un protocolo con un alto grado de reproducibilidad ya que emplea un medio definido, libre de FBS y de células alimentadoras. Se reformuló la composición del medio basal para los distintos días de diferenciación, empleándose Advanced RPMI 1640 como medio basal y eliminándose el Heps y los Aminoácidos no esenciales. Además, para los días 16-17-18-19-20 de diferenciación se sustituyó el medio comercial Clonetics®Hepatocyte Culture Medium suplementado con 20 ng/mL de Oncostatina M por el medio basal Advanced RPMI 1640 suplementado con 1% (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamina, 1% (v/v) B27 (con insulina), 0,1 µM Dexametasona, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL HGF y 20 ng/mL Oncostatina M. El motivo de este cambio se debe a un mayor control sobre la composición del medio de cultivo, ya que al tratarse de un medio comercial se nos escapa de las manos la

composición del mismo. Esta misma formulación, desarrollada por el grupo, ha dado también resultados bastante positivos en la expansión de otras células hepáticas.

En la caracterización que se llevó a cabo durante las distintas etapas en el proceso de diferenciación, se muestra como aun replicando el protocolo existen diferencias de expresión de genes hepáticos y de pluripotencia entre los distintos *batches* (Figura 4). Sin embargo, poseen características muy similares. Prueba de esto, es el análisis mediante FC (Figura 6). Éste mostró la expresión de los marcadores de progenitores bipotenciales EpCAM, AFP y ALB, manteniéndose en todos los *batches* de células expandidas. Por último, y no menos importante fue la caracterización por IF. En él, se observó el marcaje membranal de EpCAM y el marcaje citoplasmático del filamento intermedio CK19. Ambos característicos de progenitores bipotenciales. En cambio, apenas se observa marcaje AFP y ALB (Figura 7).

Para la expansión de los HB derivados de las ES4 se ha utilizado RSpondin1, un factor de crecimiento de la ruta de señalización Lgr5/Wnt descrita anteriormente como esencial en la expansión de células progenitoras hepáticas y de otros tejidos de origen endodérmico^{16,17}. Este desarrollo presenta la novedad de que nunca antes había sido empleado en la expansión de HB derivados de ESC en cultivos 3D. Estas células consiguieron así expandirse hasta p10, pero es posible que, en condiciones de cultivo optimizadas, sea posible ir más allá, tal y como ha sido descrito por los autores anteriores en células madre hepáticas primarias. Por otro lado, considerando y asumiendo que los HB son progenitores bipotenciales y no células madre hepáticas, su capacidad de expansión es más limitada, y puede justificar el límite de expansión alcanzado. El análisis en profundidad de las redes transcripcionales activadas en estas células y de algunos marcadores diferenciadores entre células madre hepáticas y hepatoblastos, podría en el futuro aclarar un poco más el estadio de maduración de estas células^{20,21}.

Cuando se testó la capacidad de diferenciación de los HB hacia los linajes hepatocíticos y colangiocíticos, se observó la formación de estructuras celulares distintas. Los agregados celulares de hepatocitos revelaron células con un aumento en la expresión de varios marcadores hepáticos (Figura 8). De igual manera, se observó la presencia de ductos biliares en hidrogeles de colágeno y matrigel (Figura 9).

Por último, la expresión de marcadores hematopoyéticos por parte de los HB generados a partir de las ES4 era un punto importante a tener en cuenta, tal y como se verá en el Capítulo 3. Así, se ha detectado una variación de la expresión de estos factores de crecimiento a lo largo del proceso de diferenciación.

Por un lado Flt3L, IGF2, TPO y ANG-3 parecían aumentar progresivamente a lo largo del proceso de diferenciación, mientras que SCF y EPO parecían tener un pico en días específicos de diferenciación (Figura 10). Esto revela que para generar un FL humano de bioingeniería que pueda soportar la hematopoyesis y la eritropoyesis fetal, sería quizás necesario usar una mezcla de estas células con distintos grados de diferenciación o maduración, con el objetivo de poder obtener una expresión máxima de estos GF en los nichos hematopoyéticos. Por lo tanto, los HB humanos derivados de ESC son capaces de expresar GF muy importantes para el desarrollo hematopoyético^{18,19}.

En este capítulo se ha demostrado la posibilidad de expandir progenitores hepáticos generados a partir de ESC humanas *in vitro*, de la misma manera que ocurre con células madre hepáticas primarias¹⁷. Estas células, con su capacidad de expresar varios GF importantes en la hematopoyesis y eritropoyesis, tienen el potencial de ser utilizadas en aplicaciones biomédicas que investiguen o intenten reproducir estos procesos *ex vivo* con fines terapéuticos o de investigación. Además, por su naturaleza bipotencial tendrán también la posibilidad de ser testadas y utilizadas en terapias celulares o en el campo de la bioingeniería hepática.

CONCLUSIONES

1. Los HB generados a partir de las células embrionarias humanas, demostraron retener de manera estable el fenotipo típico de este tipo celular durante un cultivo prolongado en 3D y usando la vía de señalización Lgr5/Wnt.
2. Los HB generados a partir de las ES humanas, demostraron ser células bipotenciales capaces de diferenciarse a células hepatocíticas y células colangiocíticas.
3. Los HB generados a partir de las células embrionarias humanas, demostraron su capacidad para expresar GF hematopoyéticos específicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mizuguchi, T., Mitaka, T., Katsuramaki, T. & Hirata, K. Hepatocyte transplantation for total liver repopulation. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* **12**, 378-385 (2005).
2. Shin, S. & Kaestner, K.H. The origin, biology, and therapeutic potential of facultative adult hepatic progenitor cells. *Current topics in developmental biology* **107**, 269-292 (2014).
3. Behbahan, I.S., *et al.* New approaches in the differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells toward hepatocytes. *Stem cell reviews* **7**, 748-759 (2011).
4. Touboul, T., *et al.* Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology* **51**, 1754-1765 (2010).
5. Cai, J., *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* **45**, 1229-1239 (2007).
6. Basma, H., *et al.* Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* **136**, 990-999 (2009).
7. Agarwal, S., Holton, K.L. & Lanza, R. Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem cells* **26**, 1117-1127 (2008).
8. Hay, D.C., *et al.* Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem cells* **26**, 894-902 (2008).
9. Turner, W.S., *et al.* Human hepatoblast phenotype maintained by hyaluronan hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **82**, 156-168 (2007).
10. Zhao, D., *et al.* Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS one* **4**, e6468 (2009).
11. Inamura, M., *et al.* Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **19**, 400-407 (2011).
12. Zhang, M., *et al.* Generation of Self-Renewing Hepatoblasts From Human Embryonic Stem Cells by Chemical Approaches. *Stem cells translational medicine* **4**, 1275-1282 (2015).
13. Takayama, K., *et al.* Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human laminin 111-coated dishes. *Stem cell reports* **1**, 322-335 (2013).
14. Sampaziotis, F., *et al.* Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nature biotechnology* **33**, 845-852 (2015).
15. Mallanna, S.K. & Duncan, S.A. Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. *Current protocols in stem cell biology* **26**, Unit 1G 4 (2013).
16. Huch, M., *et al.* In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* **494**, 247-250 (2013).
17. Huch, M., *et al.* Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* **160**, 299-312 (2015).
18. Chou, S. & Lodish, H.F. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7799-7804 (2010).
19. Sugiyama, D., Kulkeaw, K., Mizuochi, C., Horio, Y. & Okayama, S. Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production. *Biochemical and biophysical research communications* **410**, 301-306 (2011).
20. Turner, R., *et al.* Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* **53**, 1035-1045 (2011).

21. Schmelzer, E., *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1973-1987 (2007).

CAPÍTULO 3

**EXPANSIÓN DE CÉLULAS MADRE Y
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS
A PARTIR DE SANGRE DE CORDÓN
UMBILICAL MEDIANTE EL USO DE
ORGANOIDES DE BIOINGENIERÍA
HEPÁTICOS HUMANOS**

INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado en la introducción de la tesis, el trasplante con HSTC proporciona una salida a una gran variedad de enfermedades hematológicas, sin embargo, alrededor del 70% de los pacientes que necesitan un HSTC no poseen un donante hermano compatible¹. Además, la gran diversidad existente en cuanto a los orígenes raciales y étnicos se refiere, hace más complicado identificar un donante no emparentado compatible, por lo que es casi imposible llevar a cabo la intervención en un tiempo razonable². El trasplante con UCB ha incrementado las posibilidades de encontrar un donante compatible ya que este tipo de trasplante puede realizarse incluso si solo existe una coincidencia parcial entre el donante y el receptor. Asimismo, la permanente escasez de glóbulos rojos (RBC) como consecuencia de las continuas transfusiones en pacientes crónicos, hace que sea necesaria una expansión y maduración de los progenitores eritroides *ex vivo*.

Durante el desarrollo embrionario humano, las HSPC se expanden y maduran en un proceso muy complejo que involucra muchos sitios anatómicos, donde el FL es el principal sitio de hematopoyesis y eritropoyesis³.

En la actualidad existen diversas técnicas para recrear este ambiente hepático. Entre las distintas técnicas destacan la formación de hepatoesferas, agregados, esferoides, o gotas colgantes (*hanging drops*).

Los esferoides son agregaciones espontáneas no adherentes de células las cuales dan lugar a una construcción 3D. En el caso de los hepatocitos primarios, estos son capaces de formar estas estructuras denominadas hepatoesferas en las que la mayoría de las uniones entre células y ECM están conservadas, siendo esto crucial para el mantenimiento de la funcionalidad hepática⁴. Sin embargo, hay un aspecto bastante importante a tener en cuenta en la formación de los esferoides, y esto es el tamaño⁵. Glickis *et al.* demostraron que existe una disminución de la viabilidad celular conforme aumenta el tamaño de los esferoides. Crearon un modelo matemático basado en sus propias observaciones, de tal manera que esferoides hepáticos con un tamaño superior a los 100 μm podían bloquear la difusión del oxígeno, dando lugar a áreas necróticas en el centro del esferoide⁶.

En 1961, Moscona *et al.* describieron cómo a partir de ESC individuales era posible generar construcciones bajo unas condiciones controladas *in vitro*⁷. El término “agregación” comenzó a usarse para describir la capacidad de ciertos tipos celulares para dar lugar a agregados en 24 h en determinadas condiciones.

No obstante, no fue hasta la década de 1980 cuando Landry *et al.* comenzaron a usar la palabra “esferoide” para describir los agregados celulares en 3D⁸. En este trabajo cuando se evitaba la adhesión de las células hepáticas de ratón a la superficie, éstas se agregaban⁸. En un primer paso, los esferoides eran estimulados por la unión de las integrinas con la ECM dando lugar a agregados de células pequeñas. A continuación, estos agregados producían un esferoide a través de interacciones cadherina-cadherina. De esta manera, se conseguía una estructura más eficiente de energía al minimizar al máximo su superficie. La clave, en la formación de esferoides, era encontrar un protocolo reproducible capaz de reconstruir, en el caso del hígado, el tejido hepático. En la actualidad, existen varias técnicas para lograr esto, tales como: 1) placas de cultivo no adherentes en condiciones estáticas, 2) cultivos en agitación o 3) gotas colgantes. La forma más sencilla es sembrar los hepatocitos en una placa de cultivo poco adherente. Tras una fijación inicial a la superficie, los hepatocitos dan lugar a una monocapa que poco a poco se separa de la placa de cultivo formando esferoides. Además de los cultivos en condiciones estacionarias, se han desarrollado cultivos en agitación tales como los cultivos balanceados y rotatorios en placas de cultivo o biorreactores, con el fin de mejorar la producción de los esferoides. En el caso de los cultivos balanceados, la formación de esferoides es mayor debido al incremento en el número de veces que los hepatocitos chocan entre sí en comparación con los cultivos rotatorios⁹. En 2005, se desarrolló un novedoso biorreactor que era capaz de producir rápidamente esferoides cuando se cargaba con hepatocitos porcinos, los cuales mostraron una mayor viabilidad celular y un aumento de las funciones metabólicas en comparación con los cultivos en monocapa¹⁰.

Sin embargo, todas las técnicas descritas anteriormente tienen varios inconvenientes, entre los se puede destacar la necesidad de lograr una población homogénea manualmente, puesto que generalmente se obtienen agregados con geometría irregular. Kelm *et al.* describieron un método universal para la formación de gotas

colgantes aplicable a muchas líneas celulares¹¹. Este método consistía en la siembra de una pequeña cantidad de células en suspensión colocadas en la tapa de una placa de cultivo boca abajo. Las hepatosferas formadas poseían una alta reproducibilidad sobre el tamaño, con una variación de menos del 10%.

Por otro lado, diferentes tipos de biomateriales también se han utilizado en bioingeniería de tejidos, con el objetivo de obtener una mayor reproducción del ambiente hepático. El alginato constituye uno de los biomateriales más ampliamente empleados debido a sus propiedades hidrófilas, adhesivas débiles, porosidad y biocompatibilidad^{12,13}. Otro biomaterial bastante utilizado en bioingeniería es el quitosán. Se trata de un amino-hetero-polisacárido lineal derivado de la quitina con una estructura muy similar a los glicosaminoglicanos presentes en la ECM hepática. El ácido hialurónico, es otro ejemplo. Consiste en uno de los principales componentes de la ECM y desempeña un papel importante en la proliferación y migración celular, por ello es usado comúnmente en la bioingeniería del tejido hepático como *scaffold*^{14,15}. Shan *et al.* construyeron una esponja hecha de quitosán galactosilado y ácido hialurónico para imitar el microambiente hepático, en el cual se sembraron hepatocitos y EC¹⁶. Por su parte el COL I también ha sido empleado ampliamente en modelos de hepáticos *in vitro*. Debido a la pérdida de las funciones y diferenciación de los hepatocitos en 2D, el sándwich de COL permite el mantenimiento de la polaridad de los hepatocitos así como de sus funciones metabólicas¹⁷. Esto es debido a su capacidad para imitar el microambiente hepático, promoviendo las interacciones célula-célula y célula-ECM¹⁸. Sin embargo, hay que tener en cuenta que no solo han sido empleados biomateriales naturales. Por ejemplo, el ácido poliglicólico, un biomaterial sintético, ha sido usado ampliamente al comienzo de este campo para generar tejido hepático. Cuando en él se sembraron hepatocitos primarios, se observó la capacidad para secretar ALB y urea^{19,20}. Además, se han creado polímeros capaces de conducir las cargas generando campos eléctricos locales dentro del *scaffold*, lo cual mejoraría la unión celular y proliferación celular²¹.

Otra técnica innovadora es la de usar la matriz acelular derivada de células en cultivo. Kanninen *et al.* demostraron que después de sembrar iPSC en una matriz acelular derivada de HepaRG, se producía un compromiso hepático por parte de las iPSC,

poniendo de manifiesto de esta manera la gran importancia de la matriz acelular en la diferenciación y maduración hepática²². Tiwari *et al.* emplearon esta misma táctica, pero sobre la matriz acelular sembraron HSC con el objetivo de expandirlas²³. Aunque la mayoría de los trabajos mostrados terminaban generando un tejido hepático con un cierto grado de funcionalidad, el objetivo final de crear un tejido hepático totalmente funcional *in vitro* nunca ha sido logrado eficazmente.

Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis, la ECM representa un ambiente bastante dinámico y complejo, por lo cual constituye un excelente biomaterial para la bioingeniería de órganos y tejidos^{24,25}. La generación de *scaffolds* mimetiza a la perfección el ambiente donde las células crecen *in vivo* de una manera más fisiológica. Proporciona un entorno excelente para llevar a cabo el estudio del crecimiento y comportamiento de múltiples tipos celulares *in vitro*²⁶, ya que provee diferentes señales que afectan a la proliferación, migración y diferenciación celular²⁷. Por otro lado, el objetivo durante el proceso de descelularización es la preservación de la ultraestructura y composición nativa de la ECM^{28,29}, lo que maximiza la eliminación de material celular³⁰. Todo esto convierte a los *bioscaffolds* en una poderosa herramienta con la que recrear e imitar un modelo de cultivo para aplicaciones toxicológicas, descubrimiento de fármacos y bioingeniería de órganos.

En 2013, Takebe *et al.* mostraron, por primera vez, la generación de un hígado humano funcional a partir de iPSCs humanas *in vitro*. En él se producía una reorganización de los progenitores hepáticos imitando de esta manera las interacciones organogénicas entre las EC y MSC. Además, era capaz de realizar funciones específicas del hígado como la producción de diversas proteínas y el metabolismo de fármacos específicos. A las 48 h de ser trasplantado en un modelo de ratón de insuficiencia hepática letal inducida por fármacos, se producía la formación de una vasculatura funcional, lo cual estimulaba la maduración de las células, rescatándolo de la insuficiencia hepática³¹.

Recientemente, Vyas *et al.* mostraron como células progenitoras fetales de hígados humanos cultivadas sobre la ECM procedente de hígados acelulares fueron capaces de formar organoides hepáticos 3D. Estos imitaban diversos aspectos de la organogénesis hepatobiliar dando como resultado la formación concomitante de hepatocitos, progresivamente más diferenciados, y de estructuras biliares³². En este estudio, tras tres

semanas en cultivo, se producía un cambio claro en el fenotipo de los HB humanos, lo cual sugería una especificación en paralelo tanto como hacia el linaje hepatocítico como al colangiocítico. Por lo tanto, los *scaffolds* procedentes de tejido hepático contienen determinadas moléculas procedentes de la ECM que regulan la diferenciación celular, función, expansión y regeneración³³.

Mokhtari *et al.* compararon la expansión de las HSC cuando éstas eran sembradas en combinación con HB humanos y estroma hepático sobre unas estructuras hepáticas de bioingeniería hechas a partir de ECM 3D o sobre cultivos 2D. Demostraron que era necesaria la inclusión de los distintos tipos celulares en las estructuras 3D para el mantenimiento de las HSPC. Además, estos constructos fueron capaces de mantener una subpoblación más primitiva de las HSPC (CD34⁺CD38⁻), donde el estroma hepático mostró ser un componente esencial tanto para la preservación de la población más primitiva como para la diferenciación celular³⁴.

Un gran desafío en la ingeniería de tejidos es la vascularización, por lo tanto, es extremadamente importante construir una red vascular funcional. Por esta razón, la introducción de EC en la producción de esferoides ha surgido como una posible solución³⁵. No solo debido a la necesidad de crear nuevos vasos sanguíneos, sino también con el fin de aumentar la funcionalidad celular mediante la adición de una población de células no parenquimatosas.

Otros investigadores con el fin de obtener una mayor expansión de las HSC, las pusieron en contacto directo con una monocapa alimentadora, ya que es sabido que producen citoquinas (G-CSF, IL-3, IL-6, SCF, Flt-3L, TPO) con un efecto positivo sobre la expansión hematopoyética³⁶. Inicialmente, se usaron las MSC procedentes de la BM de ratón³⁷ o humano³⁸⁻⁴⁰ y a continuación, procedentes de UC⁴¹⁻⁴³ o de la placenta⁴⁴. Da Silva *et al.* investigaron el papel de las MSC procedentes de la BM sobre la expansión de las HSC procedentes tanto de BM como de UC³⁸. Concluyeron que esta fuente de MSC, en presencia de las citoquinas apropiadas, era capaz de mantener las poblaciones de células mieloides y linfoides procedentes de la BM y UC. Por su parte, Huang *et al.* pusieron de manifiesto que las MSC procedentes del UC ofrecían valores similares de expansión, injerto y recuentos celulares similares a los obtenidos a partir de MSC de BM⁴¹.

Las MSC representan un tipo celular bastante atractivo debido a su capacidad de proliferación, diferenciación, modulación de las reacciones inmunitarias y secreción de factores tróficos. Se encuentran en multitud de tejidos, incluyendo BM, UC o tejido adiposo. Recientemente han sido aisladas también de hígado, las cuales no solo poseían las morfologías y funciones inmunes características de esta población, sino que además, producían niveles más altos de citoquinas pro-angiogénicas, antiinflamatorias y antiapoptóticas que las MSC procedentes de la BM⁴⁵.

Mokhtari *et al.* mostraron que el estroma procedente de FL proporcionaba el equilibrio perfecto entre la preservación de las HSC más primitivas y la diferenciación de las HSC procedentes del UC³⁴. Anteriormente, Khan *et al.* habían puesto de manifiesto que los pericitos Nestin⁺NG2⁺, asociados a los vasos porta, formaban un nicho que promovía la expansión de las HSC⁴⁶.

Para la producción de RBC con fines clínicos se debe identificar una fuente adecuada de células que permita su producción a gran escala. Actualmente existen tres fuentes principales: células troncales y progenitoras circulantes de adultos o de UCB, PSC y progenitores inmortalizados.

Un ensayo clínico demostró que aunque la expansión de RBC a partir de células madre y progenitoras circulantes resultó en células funcionales, su vida media fue muy corta⁴⁷. Estos resultados sugerían que las condiciones de cultivo no eran las más idóneas. Usando las células madre y progenitoras presentes en una unidad de SCU, éstas se pueden expandir teóricamente hasta obtener más de 500 unidades de RBC⁴⁸⁻⁵¹. Sin embargo, el principal inconveniente es su limitada capacidad proliferativa.

El uso de progenitores inmortalizados podría resolver ese problema. Entre los diversos factores que regulan la proliferación y la inhibición de la diferenciación terminal y la muerte celular cabe destacar GATA-1⁵², PU.1⁵³, BCL-2⁵⁴, p53⁵⁵, c-Kit⁵⁶ o c-Myc⁵⁷. En los últimos 20 años se han llevado a cabo diversos estudios para inmortalizar células en pollos y ratones. Es importante destacar que este enfoque sería seguro ya que los RBC al perder el núcleo carecen de poder oncogénico. No obstante, queda demostrar si estas células podrían usarse a gran escala. Recientemente se ha establecido un método para

producir una línea hematopoyética inmortalizada a partir de ESC de ratón mediante el uso de estroma y citoquinas^{58,59}.

En 2007 se demostró la capacidad de las PSC humanas para diferenciarse hacia el linaje eritroide mediante cocultivo con una línea de BM murina⁶⁰. A partir de este estudio, se han desarrollado otros métodos basados en otras líneas celulares de ratón⁶¹, monocapas de células alimentadoras⁶² o en la generación de cuerpos embrionarios⁶³. También han sido desarrollado protocolos sin ningún componente xenobiótico, de tal manera, que podrían llevarse a la producción clínica⁶⁴.

Por lo tanto, la no existencia en la actualidad de un método robusto y definido para llevar a cabo una gran expansión de las HSC y de las HSPC de UCB, hace necesario la creación de nuevos constructos de bioingeniería en los cuales no solo es importante la composición celular sino también la ECM empleada.

OBJETIVOS

Aunque el trasplante de HSC de UCB ha incrementado las posibilidades de encontrar un donante compatible en un tiempo razonable, el uso de esta fuente de HSC en pacientes adultos y adolescentes es bastante limitado como consecuencia del bajo número de células CD34⁺ por unidad de UCB y por la velocidad lenta de injerto debido a la naturaleza tan primitiva de las células. Además, es importante resaltar la ausencia de un método robusto para expandir progenitores eritroides *in vitro* con el objetivo de generar grandes cantidades de glóbulos rojos de manera eficiente.

Por lo ello teniendo en cuenta todas estas limitaciones, es urgente desarrollar nuevos métodos que permitan llevar a cabo una expansión de las HSPC *in vitro* con el objetivo de poder obtener el número necesario para poder tratar a pacientes adultos y aumentar la velocidad de injerto gracias al incremento en el número de progenitores más maduros.

Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que una expansión de las HSPC procedentes de UCB puede ser lograda en unas condiciones más funcionales y eficientes mediante el uso de construcciones hepáticas humanas fetales de bioingeniería.

Por ello, los objetivos de este capítulo son:

1. Aislamiento y caracterización de los principales componentes celulares presentes en el FL.
2. Recreación y caracterización del nicho hepático fetal.
3. Expansión y caracterización de las HSPC procedentes de UCB mediante el uso de construcciones hepáticas humanas de bioingeniería.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Aislamiento, caracterización y almacenamiento de las células CD34⁺ de UCB

1.1 Recogida de la UCB

Las muestras biológicas y los datos asociados de los pacientes incluidos en el estudio fueron recogidos, procesados y cedidos por el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud en el marco del Biobanco del Sistema de Salud de Aragón, siguiendo procedimientos normalizados de trabajo y con la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico.

Una vez recogida la UCB, ésta era almacenada a 4°C hasta su posterior procesamiento al día siguiente.

1.2 Aislamiento de las células CD34⁺ de UCB

Las HSPC se encuentran presentes en una frecuencia aproximada de 0,1-0,5% en la UCB, por lo que es necesario llevar a cabo el aislamiento y purificación de las mismas.

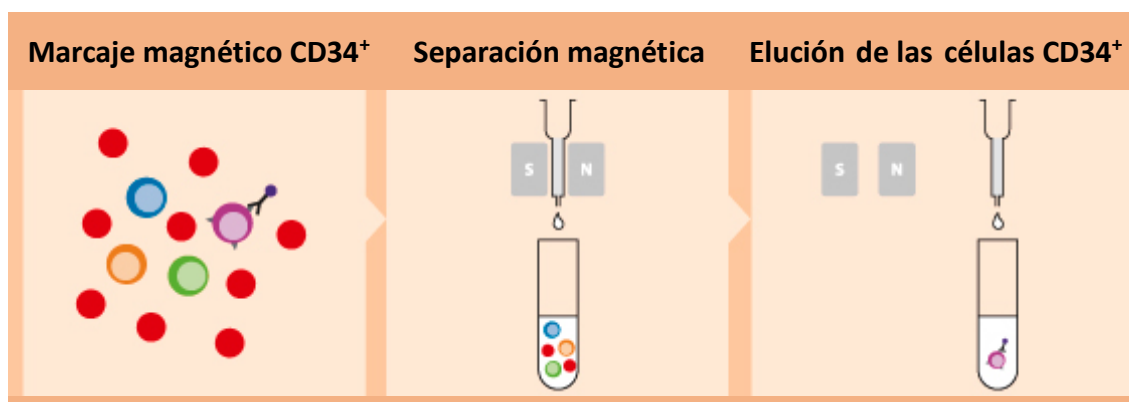


Figura 1: Aislamiento de las células CD34⁺ de la UCB. Fuente: Miltenyi Biotec.

Reactivos:

Solución PBE

DPBS pH=7,2, 0,5% de Albúmina de suero bovino (BSA) (Linus, P6154) y 2 mM de EDTA (Sigma, E5134).

La SCU se diluyó 1:1 con DPBS y se procedió al aislamiento de las MNC mediante la adición de 15 mL de Histopaque (Sigma, 10771) y 25 mL de la UCB diluida. Se centrifugó a 400xg durante 40 min a RT sin aceleración ni freno. Se recogió la interfase compuesta por las MNC y se procedió al marcaje de la población de interés con las *microbeads*

CD34⁺ (Miltenyi, 130-046-702) como indica el fabricante. Dos ciclos de *sorting* fueron necesarios para cada muestra, con el fin de obtener un alto enriquecimiento de CD34⁺ (> 85 %) (Figura 1).

1.3 Caracterización de las células CD34⁺ de UCB por FC

Tras la obtención de la fracción positiva, ésta era marcada con los anticuerpos CD34 y CD45 (Tabla 1) para analizar mediante FC el porcentaje inicial de células CD34⁺ (véase Capítulo 2 sección 3.1).

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
CD34-PE	Inmunostep, 34PE	5:50
CD45-APC	BD, 555485	2,5:50
Isotipo PE/FITC	BD, 349526	5:50
Isotipo APC	BD, 345818	2,5:50

Tabla 1: Lista de anticuerpos.

1.4 Almacenamiento de las células CD34⁺ de la UCB

Las células CD34⁺ obtenidas se congelaron en una solución comercial a -80°C. Tras 24 h, se almacenaron en nitrógeno líquido.

2. Aislamiento, expansión, caracterización y almacenamiento de las hUVEC

2.1 Recogida del UC

Las muestras biológicas y los datos asociados de los pacientes incluidos en el estudio fueron recogidos, procesados y cedidos por el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud en el marco del Biobanco del Sistema de Salud de Aragón, siguiendo procedimientos normalizados de trabajo y con la aprobación del Comité de Ética y del Comité Científico.

Una vez recogido el UC se procedía a su procesamiento y obtención de las hUVEC.

2.2 Aislamiento de las hUVEC

A partir del UC se procedía a la obtención de las hUVEC.

Reactivos:

Medio de cultivo hUVEC

MCDB 131 (Gibco, 10372-019), 5 % FBS (Gibco, 10270106), 2 mM L-Glutamina, 1% (v/v) P/S, 5 ug/mL Insulina (Sigma, I9278), 10 ug/mL Transferrina (Sigma, T0665), 50 ng/ml VEGF (Peprotech, 100-20), 40 ng/ml EGF, 40 ng/mL FGF-2, 40 ng/mL IGF-1 (Peprotech, 100-11R3).

Se canuló la UV (Figura 2) con una cánula de 20 G (BD, BD393224) y se lavó con DPBS (Sigma, D8537). Se clampó un orificio de la UV y se inyectó 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco, 25200072) precalentada por el otro. A continuación, se clampó el orificio de entrada y se incubó el UC durante 5-10 min a 37°C. Se neutralizó la Tripsina con FBS y se centrifugó a 400xg 5 min. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en medio hUVEC suplementado con 20% FBS. La suspensión celular se sembró en un pocillo de una placa de 6 pocillos, previamente tratado con FN al 0,03%.

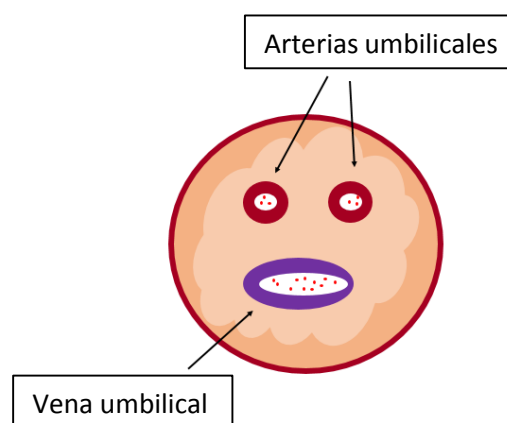


Figura 2: Aislamiento de las hUVEC.

2.3 Expansión de las hUVEC

Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia del 80-90%, se pasaron las células a una nueva placa.

El cultivo se trató con 0,05% Tripsina-EDTA (Gibco, 25300062) durante 5 min a 37°C. Se neutralizó con DMEM F12 (Sigma, D8062) suplementado con un 10% FBS y se centrifugó a 400xg durante 5 min. Se sembró un número adecuado de células (6.000 células/cm²)

en una placa nueva de cultivo, previamente tratada con Gelatina al 0,2%, con medio hUVEC.

2.4 Almacenamiento de las hUVEC

Las hUVEC se congelaron en una solución compuesta de 90% medio hUVEC con un 10% DMSO (Sigma, D2650) a -80°C. Tras 24 h, se almacenaron en nitrógeno líquido.

2.5 Caracterización de las Células Endoteliales de UC

RT-PCR

Se llevó a cabo la extracción y cuantificación del RNA, síntesis de cDNA y RT-PCR (*véase Capítulo 2 sección 3.1*). Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 2.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)
SCF	F: CCATTGATGCCTTCAAGGAC R: GGCTGTCTCTTCTCCAGTA	55	202 y 286
Ftl-3L	F: GAGCCCAACAACCTATCTC R: GGACGAAGCGAAGACA	55	347
G-CSF	F: TGGCAGCAGATGGAAGAACT R: CGTTCTGCTCTTCCCTGTCTTT	60	263
ANG-1	F: CTTGAGAATTACATTGTGGAAAAC R: TTGATTTAGTACCTGGGTCTC	50	168
Jagged-1	F: CGGGAACATACTGCCATGAAAATA R: ATGCACTTGTAGGAGTTGACACCA	55	97

Tabla: Lista de cebadores.

Inmunofluorescencia

La caracterización de las hUVEC llevó a cabo mediante IF en una cámara de 8 pocillos (Nunc, 154534).

Las células se fijaron con PFA 4% durante 20 min a RT. La autofluorescencia se redujo con la adición de Cloruro de amonio 0,01 M (Sigma, A9434). Las muestras se bloquearon con la Solución de Bloqueo durante 1 h a RT. A continuación, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 3) diluidos en la Solución de Bloqueo durante 24 h

a 4°C en una cámara húmeda para evitar la evaporación. Al día siguiente las muestras se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en la Solución de Bloqueo durante 1 h a RT (Tabla 3). Finalmente, se desmontó la cámara y se añadió el Medio de montaje + 1:1000 DAPI. Las muestras se analizaron en un microscopio invertido de fluorescencia.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
CD31	Máster Diagnóstica, MAD-002048QD-3	Listo para usar
Vimentina	Máster Diagnóstica, MAD-000326QD-3	Listo para usar
Ve-Cadherina	Santa Cruz Biotechnology, sc-9989	1:100
CD34	Biorbyt, orb27549	1:50
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, A11029	1:400
Alexa Fluor 568	Molecular Probes, A11036	1:400

Tabla 3: Lista de anticuerpos.

3. Aislamiento, expansión, caracterización y almacenamiento de las HpFEC y progenitores hepáticos procedentes de FL humanos

3.1 Recogida del FL humano

Las muestras de FL humanos han sido recogidas por el Biobanco del Hospital Vall D'Hebrón mediante consentimiento informado, según el protocolo aprobado por la comisión ética de esta institución.

A continuación, la muestra era enviada de manera refrigerada. Una vez recogida, se procedía a su correspondiente procesamiento.

3.2 Aislamiento de las células estromales y progenitores hepáticos fetales

Reactivos:

Medio Kubota:

RMPI 1640, 1% (v/v) P/S, 1×10^{-3} % BSA (Sigma, P6154), $5,4 \times 10^{-1}$ mg/mL Nicotinamida, $3,5 \times 10^{-4}$ % (v/v) β -Mercaptoetanol (Sigma, M3148), 5 μ g/ml Insulina (Sigma, I9278), 10 μ g/ml Transferrina, 300 pM Selenio (Sigma, S5261),

$8,28 \cdot 10^{-8}$ M Hidrocortisona (Sigma, H0888), 1×10^{-10} M Sulfato de zinc heptahidratado (Sigma, Z0251) y 7,6 uEq/L Ácidos grasos libres (Sigma).

Medio MSC

DMEM F12, 10 % FBS y 1% (v/v) P/S.

El FL se digirió con una solución de 1 mg/mL Colagenasa IV (Sigma, C5138), durante 30-45 min a 37°C. Una vez digerido, se neutralizó con Advanced RPMI suplementado con un 10% FBS. La suspensión se pasó primero, por un tamiz de 100 μ m y después por uno de 40 μ m. A continuación, se realizó un gradiente de densidad con Histopaque durante 30 min a 400xg a RT, sin aceleración ni freno. Se recogió por un lado la fracción de células estromales hepáticas (interfase) y por otro lado, los progenitores hepáticos (fondo) (Figura 3).

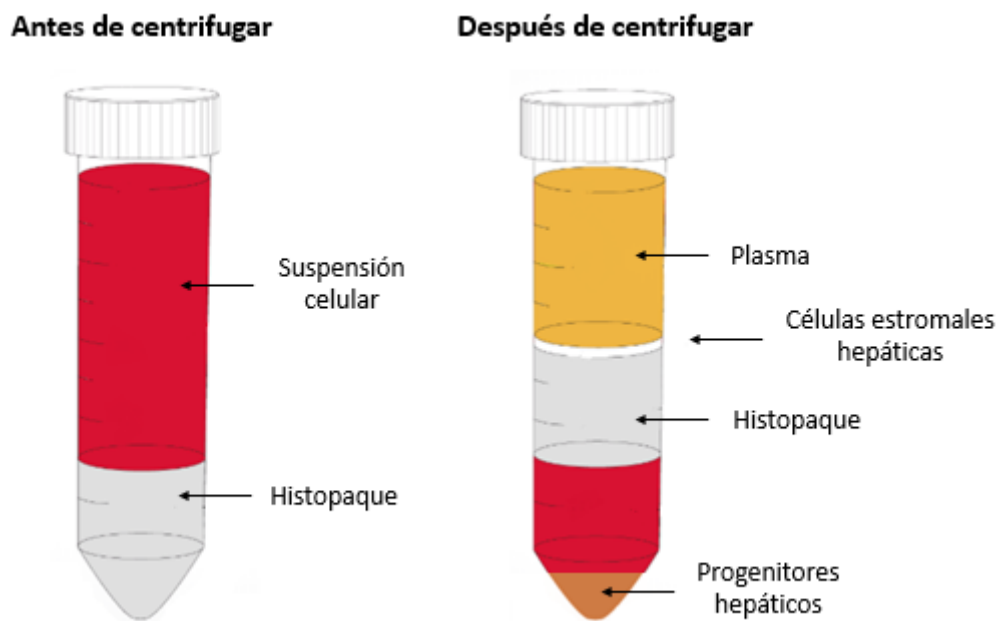


Figura 3: Aislamiento de las HpFEC y progenitores hepáticos fetales mediante un gradiente de densidad.

Se resuspendieron las dos fracciones con Advanced RPMI + 10% P/S y se lavaron con Advanced RPMI suplementado con un 10% FBS. Finalmente las HpFEC se sembraron en medio MSC en placas de cultivo tratadas previamente con gelatina al 0,2% y los progenitores hepáticos en medio Kubota suplementado con un 5% FBS, 50 ng/mL EGF, 20 ng/mL IGF-1, 5 ng/mL HGF, 5 ng/mL FGF-2 y 10 μ M FSK en placas de cultivo tratadas

previamente con 5 µg/cm² COL IV (Sigma, C7521) Al día siguiente, se procedió al cambio de medio en ambos tipos celulares, retirando el FBS de las placas de progenitores hepáticos fetales.

3.3 Expansión de las HpFEC y de los progenitores hepáticos fetales

Una vez que las HpFEC alcanzaron una confluencia del 80-90%, las células se pasaron a una nueva placa. El cultivo se trató con 0,05% Tripsina-EDTA durante 5 min a 37°C. Se neutralizó con DMEM F12 suplementado con un 10% FBS y se centrifugó a 410xg durante 5 min. Se sembró un número adecuado de células (6.000 células/cm²) en una placa nueva de cultivo, previamente tratada con Gelatina al 0,2% en medio MSC.

En el caso de los progenitores hepáticos fetales, una vez que éstos alcanzaban la confluencia, eran usados en los distintos experimentos. Debido a las dificultades para mantenerlos en cultivo, los HB era aislados, expandidos (p0) y utilizados.

3.4 Almacenamiento de las HpFEC

Las HpFEC se congelaron en una solución compuesta de 90% medio MSC con un 10% DMSO a -80°C. Tras 24 h, se almacenaron en nitrógeno líquido.

3.5 Caracterización de las HpFEC

Diferenciación adipocítica

Las HpFEC se cultivaron durante dos semanas en un medio de diferenciación adipocítica (Sigma 811D). A las dos semanas, el cultivo se tiñó con *Red Oil* (Sigma, 0D625) como indica el fabricante para la detección de lípidos neutrales.

RT-PCR

Se llevó a cabo la extracción y cuantificación del RNA, síntesis de cDNA y RT-PCR (*véase Capítulo 2 sección 3.1*). Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 4.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Amplicón (pb)
SCF	F: CCATTGATGCCTTCAAGGAC R: GGCTGTCTCTTCTTCCAGTA	55	202 y 286
Ftl-3L	F: GAGCCCAACAACCTATCTC R: GGACGAAGCGAAGACA	55	347
TGF-β1	F: AATTGAGGGCTTTCGCCTTAG R: CCGGTAGTGAACCCGTTGAT	60	87
ANG-1	F: CTTGAGAATTACATTGTGGAAAAC R: TTGATTTAGTACCTGGGTCTC	50	168

Tabla 4: Lista de cebadores.

Inmunofluorescencia

La caracterización de las HpFEC se llevó a cabo mediante IF (Tabla 5) en una cámara de 8 pocillos (*véase sección 2.5*).

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
CD31	Máster Diagnóstica, MAD-002048QD-3	Listo para usar
Vimentina	Máster Diagnóstica, MAD-000326QD-3	Listo para usar
Nestin	AbCAM, ab133617	1:200
NG2	AbCAM, ab129051	1:200
CD146	Miltenyi, 130-092-851	1:50
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, A11029	1:400
Alexa Fluor 568	Molecular Probes, A11036	1:400

Tabla 5: Lista de anticuerpos.

4. Inactivación celular de las hUVEC y de las HpFEC

La inactivación celular tanto de las hUVEC como de las HpFEC se llevó a cabo mediante el tratamiento con Mitomicina C.

Los cultivos se inactivaron con Mitomicina C (Sigma, M4287) diluida en DMEM F12 en el caso de las HpFEC y en MCB 131 en el caso de las hUVEC. Se incubaron a 37°C y 5% CO₂ a distintas concentraciones de Mitomicina C y a varios tiempos. Pasado el tiempo, se retiró la Mitomicina C y los cultivos se lavaron con DMEM F12 suplementado con un 20% FBS. A continuación, las células inactivadas se empleaban o se almacenaban en nitrógeno líquido hasta su posterior uso.

5. Formación del nicho hepático fetal

Para la recreación del nicho hepático fetal se llevaron a cabo dos estrategias distintas. Por una parte las células se sembraron sobre un *scaffold* de rata descelularizado (“Organoides Vyas/Baptista”) y por otro lado, se sembraron en MG (“Organoides Takebe”) (Figura 4).

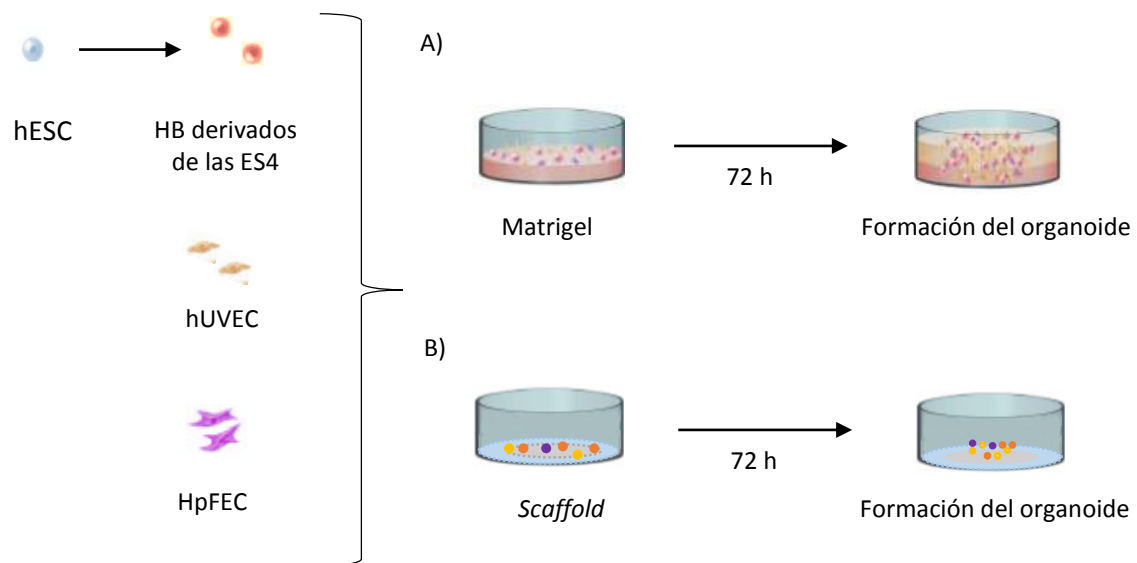


Figura 4: Esquema de la formación del nicho hepático fetal. A) Matrigel y B) Scaffold hepático descelularizado.

5.1 Scaffolds hepáticos descelularizados de ECM

La extracción y descelularización de un hígado de rata, se llevó a cabo mediante la adaptación de un protocolo ya descrito previamente^{32,65,66}.

Reactivos:

Medio hematopoyético (mHSC)

StemSpan SFEM II (StemCell Technologies, 9655), 100 µg/mL SCF (Peprotech, 300-07), 100 µg/mL Flt-3L (Peprotech, 300-19), 100 µg/mL TPO (StemCell Technologies, 78070), 100 µg/mL IL-6 (Peprotech, 200-06), 18,6 ng/mL EPO (Peprotech, 100-64).

Extracción y canulación de un hígado murino

Se realizó una incisión abdominal de manera longitudinal. Se diseccionaron los ligamentos falciformes, cardíacos y la PV, la cual además se cortó transversalmente. La CV se diseccionó por arriba y por debajo del hígado. Se eliminó cualquier adhesión al hígado y se extrajo con la cápsula intacta. Se eliminó la vesícula biliar y se canuló la PV con una cánula de 20 G.

Descelularización de un hígado murino

Se conectó la PV a una bomba peristáltica mediante unos tubos de silicona L/S14. Se lavó el hígado con miliQ a 1 mL/min durante aproximadamente 30 min a 4°C. Se perfundieron 5 L de Tritón X-100 al 1% con Hidróxido de amonio al 0,1% a 1 mL/min a 4°C. Finalmente, se eliminó cualquier traza de detergente con 10 L de miliQ a 1 mL/min a 4°C.

Producción de scaffolds de rata de 4 mm

El hígado descelularizado de rata se cortó en pequeños lóbulos. Se embebieron en Medio de congelación de tejidos (Leica Biosystems, 14020108926) y se congelaron. Las muestras se cortaron en un criostato (Leica CM1950) con un grosor de 250 µm. Con una cuchilla cilíndrica de biopsia se realizó un corte de 4 mm de diámetro (Kai Medical, BP-40F). De esta manera se generó un disco hecho de tejido hepático descelularizado. Se introdujeron los discos en una placa de cultivo de 96 pocillos U (Sigma, SIAL0799) y se dejaron adherirse aproximadamente durante 1 h a RT. Se lavaron con PBS, se esterilizaron bajo VU durante 2 h y se almacenaron a 4°C en PBS + 1% P/S hasta su posterior uso.

Recreación del nicho hepático fetal

Los HB, las hUVEC y las HpFEC se expandieron como se ha mostrado anteriormente (véase *Capítulo 2 sección 2.1 y Capítulo 3 sección 2 y 3, respectivamente*). El día del experimento las células se levantaron con Tryple Express y se procedió al recuento celular. Los *scaffolds* de rata se pre-acondicionaron primero con el medio de siembra durante 30 min a 37°C y a continuación, se dejaron secar al aire dentro de la cabina de bioseguridad durante 10-15 min. A continuación, se sembraron las células en una proporción 10 HB: 5 hUVEC: 2 HpFEC en 10 µL de EM suplementado con un 5% FBS, 20 µg/mL IGF-1, 1 µg/mL VEGF y 3 µM CHIR99021 (Tocris, 4423) durante 1 h a 37°C para facilitar la adherencia de las células al *scaffold*. Finalmente, se añadió el resto de medio y se incubó a 37°C, 3% O₂/5% CO₂. A las 24 h se procedió al cambio del medio compuesto por mHSC suplementado con IGF-1 y VEGF para facilitar la supervivencia endotelial. A las 48-72 h se producía la formación del organoide. A los 7 días, se fijaron los organoides, se procesaron, se tiñeron con H&E y se llevó a cabo una caracterización por IF (Tabla 6) (véase *Capítulo 1 sección 1.1 Capítulo 2 sección 3.3, respectivamente*).

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
EpCAM	Santa Cruz Biotechnology, sc-25308	1:250
CK19	Máster Diagnóstica, MAD-002163KD-3	Listo para usar
AFP	Invitrogen, PA5-16658	1:250
Vimentina	Máster Diagnóstica, MAD-000326QD-3	Listo para usar
Ve-Cadherina	Santa Cruz Biotechnology, sc-9989	1:100
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, A11029	1:400
Alexa Fluor 568	Molecular Probes, A11036	1:400

Tabla 6: Lista de anticuerpos.

5.2 Mediante matrigel

Para la recreación del nicho hepático fetal con MG se empleó una adaptación del protocolo descrito por Takebe⁶⁷.

Recreación del nicho hepático fetal

Los HB, las hUVEC y las HpFEC se expandieron como se ha mostrado anteriormente (*véase Capítulo 2 sección 2.1 y Capítulo 3 sección 2 y 3, respectivamente*). El día del experimento las células se levantaron con Tryple Express y se procedió al recuento celular. A continuación, se sembraron en una proporción 10 HB: 5 hUVEC: 2 HpFEC en EM suplementado con un 5% FBS, 20 µg/mL IGF-1, 1 µg/mL VEGF y 3 µM CHIR99021 sobre un gel de MG diluido 1:1 con medio hUVEC (*véase sección 2*), previamente solidificado durante al menos 30 min a 37°C en una placa de cultivo de 96 pocillos (Fisher Scientific, 167008). A las 24 h se procedió al cambio del medio compuesto por mHSC suplementado con IGF-1 y VEGF para facilitar la supervivencia endotelial. El cultivo se incubó a 37°C, 3% O₂/5% CO₂. A las 48-72 h se producía la formación del organoide. A los 7 días, se fijaron los organoides, se procesaron, se tiñeron con H&E y se llevó a cabo una caracterización por IF (Tabla 6) (*véase Capítulo 1 sección 1.1 y Capítulo 2 sección 3.3, respectivamente*).

6. Expansión y caracterización de las HSC procedentes de SCU empleando organoides hepáticos de bioingeniería

6.1 Experimentos control 2D

En primer lugar, se llevó a cabo una serie de experimentos control para conocer el grado de expansión de las HSC cuando éstas eran sembradas sobre cada tipo celular presente en el nicho hepático fetal de manera independiente.

Por lo tanto, en el caso de los HB, al día 16 de diferenciación se añadieron las CD34⁺-UCB (Figura 5). Se testaron también en condiciones de fluídica (Figura 6). Para ello, se diseñó una placa de 48 pocillos con una entrada y una salida por la cual fluía el medio de cultivo. Éste era inyectado a través de una jeringa montada sobre una bomba peristáltica (Micrux, NE-4000), de tal manera que se producía un cambio de medio sin necesidad de hacerlo manualmente. El medio entraba a través de un orificio a la placa de cultivo y salía al interior de la placa por otro orificio.

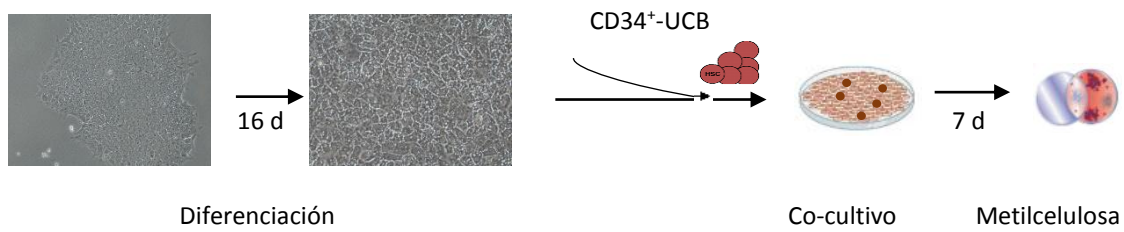


Figura 5: Esquema de la expansión de las CD34⁺-UCB en cultivo 2D de HB derivados de las ES4.

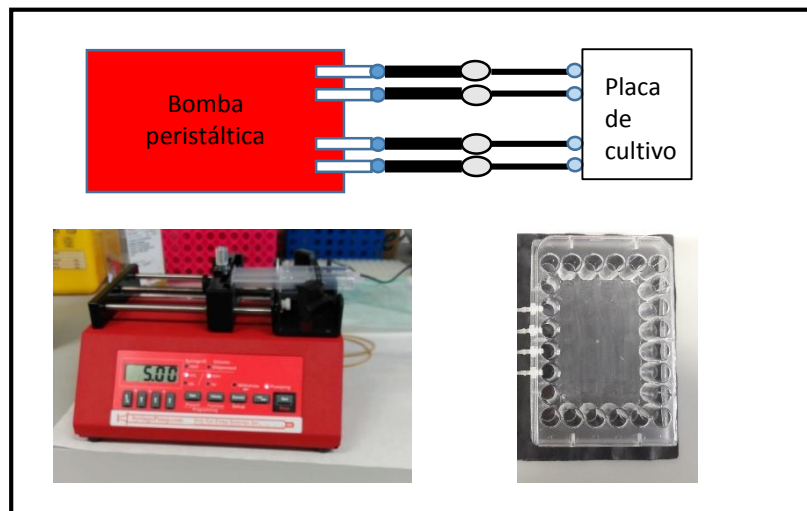


Figura 6: Condiciones de fluídica.

En el caso de las hUVEC y de las HpFEC, en primer lugar, la monocapa de células se trataron con Mitocina C (*véase Apéndice*) con el objetivo de impedir su proliferación, pero permitiendo que éstas secretaran los GF producidos al medio.

Tras la adaptación celular, se añadieron 125.000 CD34⁺-UCB. Además, se testaron dos tipos de condiciones, una en el que las células se sembraron en mHSC y otra en la que solo se sembraron con el medio basal, StemSpan SFEM II. Los cultivos se incubaron a 37°C, 1% O₂/5% CO₂ durante 7 días. Cada día se procedió al cambio de mitad de medio. Como control del experimento, se sembraron también las CD34⁺-UCB sobre plástico en las mismas condiciones. A los 7 días, se procedió al recuento celular y al análisis de las células hematopoyéticas mediante ensayos clonogénicos.

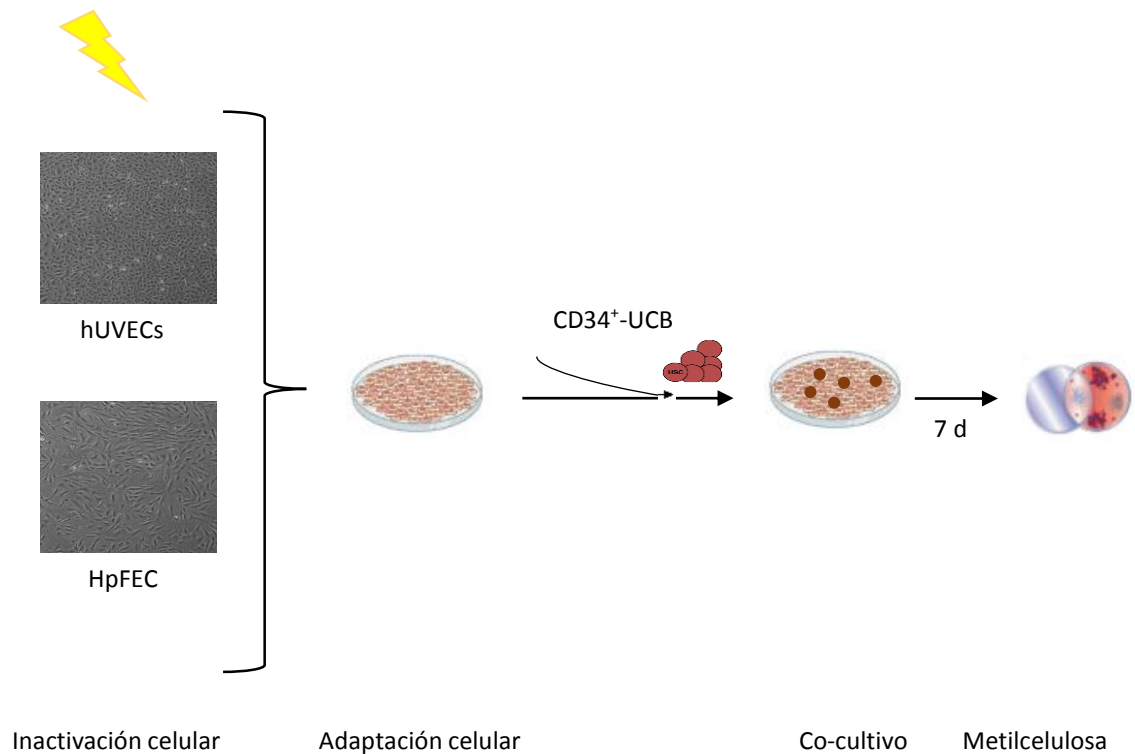


Figura 7: Esquema de la expansión de las CD34⁺-UCB en cultivo 2D de hUVEC y HpFEC.

Ensayos clonogénicos

Los ensayos clonogénicos fueron llevados a cabo en triplicado en Metilcelulosa (StemCell Technologies, 4034) tanto sobre las poblaciones iniciales como sobre las poblaciones expandidas hematopoyéticas a los 7 días de expansión, con el objetivo de conocer e identificar la naturaleza de las poblaciones presentes en el cultivo.

Se diluyó un número adecuado de células progenitoras en IMDM (Sigma, I3390) suplementado con 25 mM Hepes, en un volumen final de 1 mL. Se transfirieron 200 μ L de esta mezcla a una alícuota de 2 mL de metilcelulosa. Se vorteoó y se transfirieron 500 μ L a tres pocillos de una placa de cuatro pocillos (Nunc, 176740). Para disminuir la evaporación y evitar que se seque la metilcelulosa, se añadió DPBS en el cuarto pocillo. Se incubó durante 2 semanas a 37°C y 5% CO₂. Finalmente, las colonias se identificaron y se clasificaron en CFU-GEMM, CFU-GM y BFU-E usando los criterios estándares (Figura 8).

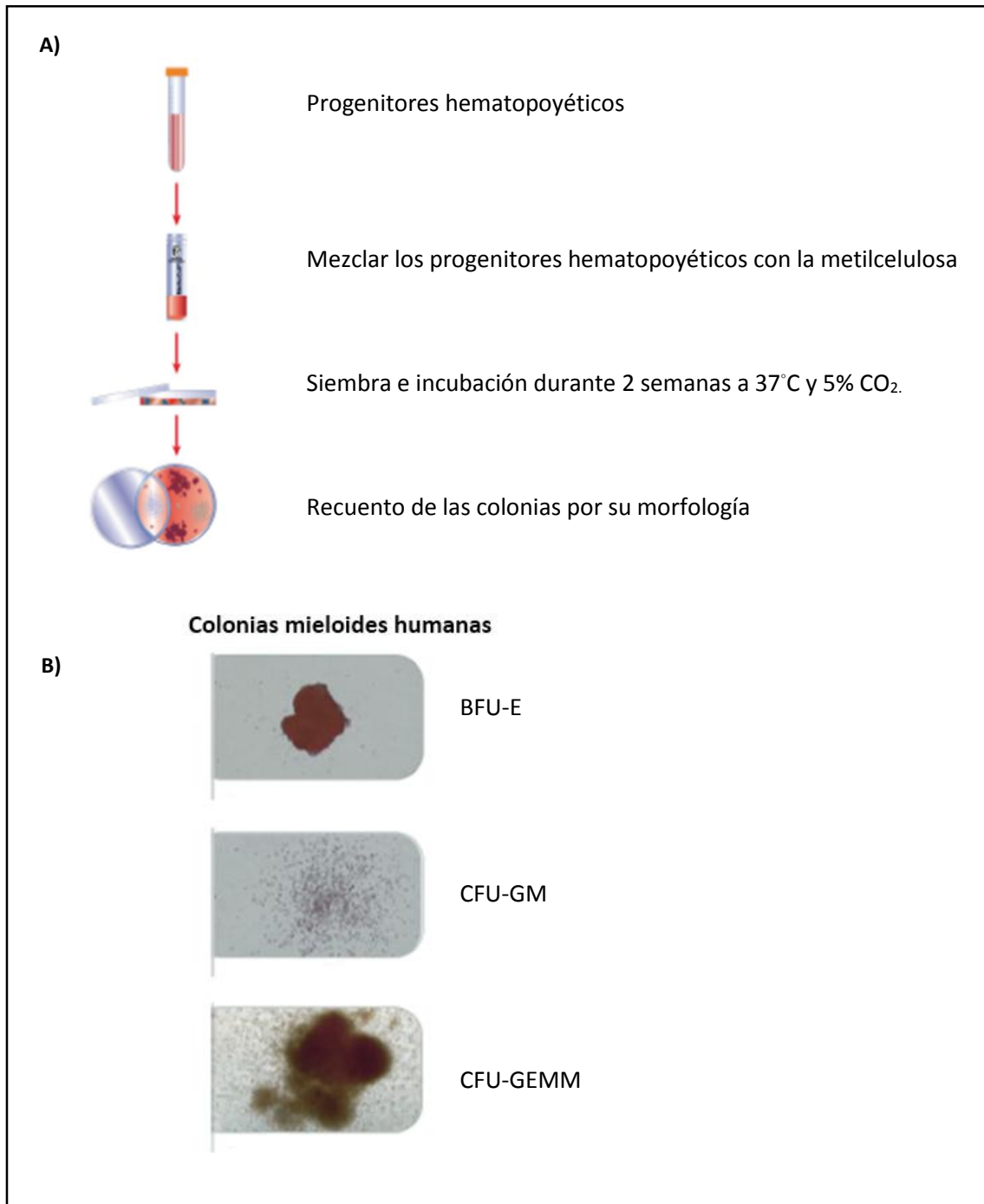


Figura 8: Ensayos clonogénicos. A) Protocolo para la siembra de los progenitores hematopoyéticos en metilcelulosa. B) Morfología de las colonias mieloides humanas. Fuente: HSC Manual de STEMCELL Technologies.

A continuación, se realizó un experimento en el que a los 15 días de diferenciación de los HB derivados de las ES4, se realizó un *sorting* de EpCAM, con el objetivo de obtener una población lo más pura posible (Figura 9). Para ello, se levantaron los HB con Tryplex Express, se incubaron con el anticuerpo EpCAM (Santa Cruz Biotechnology, sc-66020)

durante 30 min a 4°C y se marcaron con unas *microbeads* (Miltenyi, 130-048-401) como indica el fabricante durante 15 min a 4°C. Finalmente, se llevó a cabo un ciclo de *sorting*. Las células obtenidas se sembraron en una placa de 48 pocillos (Biolite, 130187) en medio de diferenciación Día 11-15 (véase *Capítulo 2 sección 1*) suplementado 3 µM CHIR99021 y 10 µM Thiazovivina. Tras la adaptación celular de 24-48 h, se añadieron las células CD34⁺ en mHSC y en StemSpan SFEM II. Los cultivos se incubaron a 37°C, 1% O₂/5% CO₂ durante 7 días. Cada día se procedió al cambio de mitad de medio. Como control del experimento, se sembraron también las CD34⁺-UCB sobre plástico en las mismas condiciones. A los 7 días, se procedió al recuento celular y al análisis de las células hematopoyéticas mediante ensayos clonogénicos.

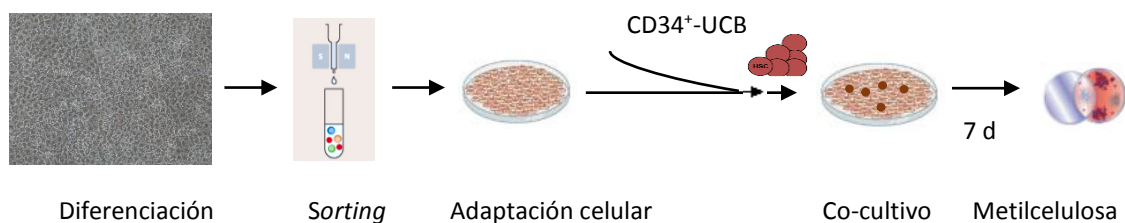


Figura 9: Esquema de la expansión de las CD34⁺-UCB en cultivo 2D de HB purificados.

6.2 Experimento control 3D: Expansión de las HSC usando organoides hepáticos de bioingeniería con HB fetales humanos primarios.

Se llevó también a cabo un experimento control en el que los HB procedían de fetos humanos de 18 a 22 semanas de gestación (n=1) (Figura 10).

Los HB humanos, las hUVEC y las HpFEC se expandieron como se ha mostrado anteriormente (véase *Capítulo 3 sección 3* y *Capítulo 3 sección 2 y 3, respectivamente*). El día del experimento las células se levantaron con Tryple Express. A continuación, se procedió al recuento celular y se sembraron en una proporción 10 HB: 5 hUVEC: 2 HpFEC en medio (1:1) hUVEC/medio Kubota suplementado con un 5% FBS, 50 ng/mL EGF, 20 ng/mL IGF-1, 5 ng/mL HGF, 5 ng/mL FGF-2 y 10 µM FSK sobre un gel de MG diluido 1:1 con medio hUVEC (véase *sección 2*), previamente solidificado en una placa de 96 pocillos durante al menos 30 min a 37°C. Al día siguiente, se procedió al cambio de medio añadiendo en unas condiciones mHSC y en otras mHSC/hUVEC con el objetivo de averiguar cuál era el mejor medio para la expansión de las células hematopoyéticas. A

las 72 h se producía la formación del organoide momento en el que se añadían 62.500 células CD34⁺-SCU. Cada día se procedió al cambio de mitad de medio. Como control del experimento, se sembraron también las CD34⁺-UCB sobre plástico en las mismas condiciones. A los 7 días, se procedió al recuento celular y al análisis de las células hematopoyéticas mediante ensayos clonogénicos (véase sección 6.1).

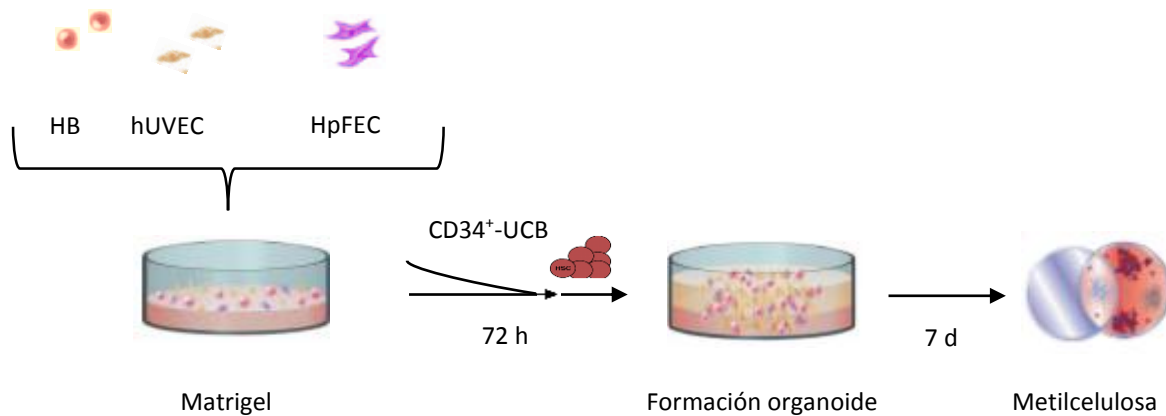


Figura 10: Esquema de la expansión de las CD34⁺-UCB empleando organoides de bioingeniería humanos (experimento control 3D).

5.3 Experimento 3D: Expansión de las HSC usando los organoides hepáticos de bioingeniería

A continuación, se llevó a cabo la expansión de las HSC procedentes de UCB. Para ello, en un primer lugar, se llevó a cabo la reproducción del microambiente hepático mezclando los tres componentes principales: HB, hUVEC y HpFEC. Como se muestra en la sección 5, se intentaron dos estrategias distintas, la primera empleando MG ("Organoides Takebe") y la segunda usando un *scaffold* hepático descelularizado ("Organoides Vyas/Baptista") (Figura 11). En ambos casos, a las 72 h se produjo la formación del organoide hepático, momento en el que se añadieron 62.500 células CD34⁺-UCB. Cada día se procedió al cambio de medio. Los cultivos se incubaron a 37°C, 1% O₂/5% CO₂. Como control del experimento, se sembraron también las CD34⁺-UCB sobre plástico en las mismas condiciones. A los 7 y 14 días, se procedió al recuento celular y al análisis de las células hematopoyéticas mediante ensayos clonogénicos (véase sección 6.1) y FC (Tabla 7) (véase sección 3.5).

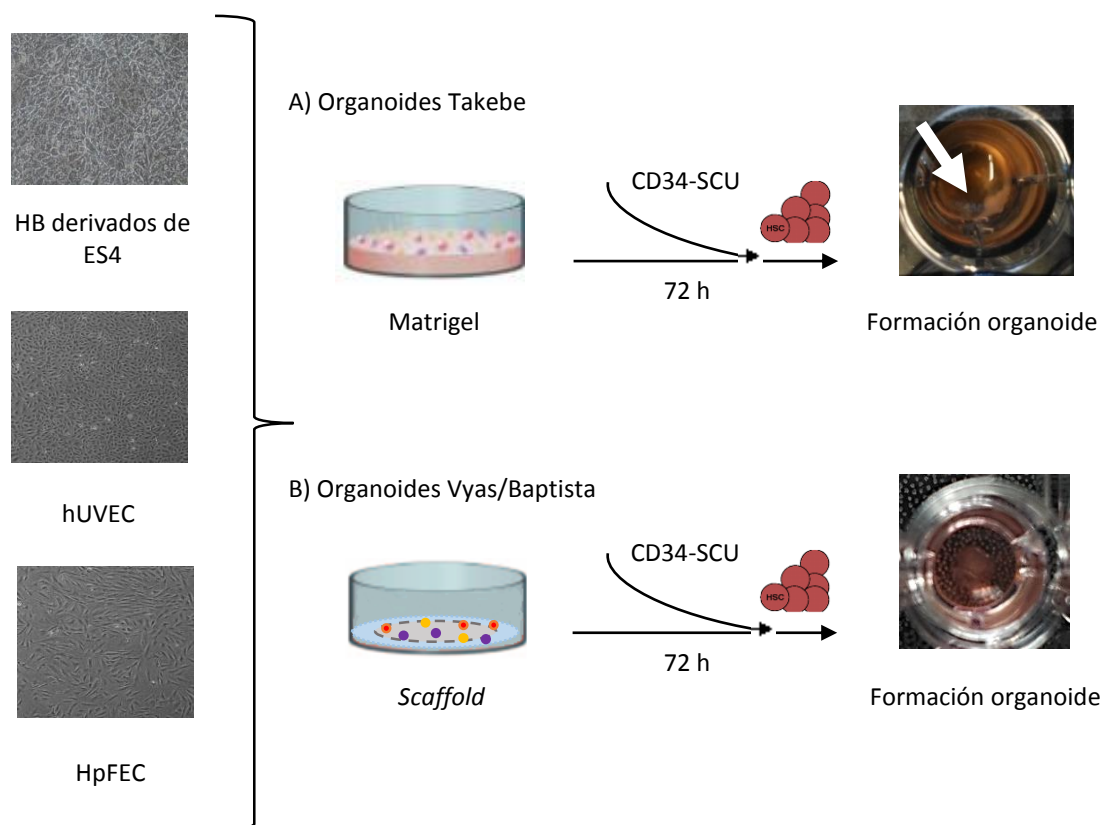


Figura 11: Esquema de la expansión de las HSC procedente de UCB empleando dos tipos de organoides de bioingeniería humanos. A) Matrigel y B) Scaffold hepático descelularizado.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
c-kit	Santa Cruz Biotechnology, sc-5535	0,5:50
CD34-PE	Inmunostep, 34PE	5:50
CD45-APC	BD, 555485	2,5:50
CD38-FITC	StemCell Technologies, 10415	2,5:50
CD71-APC	BD, 561940	5:50
Isotipo PE/FITC	BD, 349526	5:50
Isotipo APC	BD, 345818	2,5:50
Alexa Fluor 488	Molecular Probes, A11029	1:400

Tabla 7: Lista de anticuerpos.

RESULTADOS

1. Caracterización de las células CD34⁺-UCB

Como se muestra en la Figura tras los dos ciclos de *sorting* manual de CD34 se obtuvo una población bastante pura (86,4%) y con una alta viabilidad (86,3%) (Figura 12).

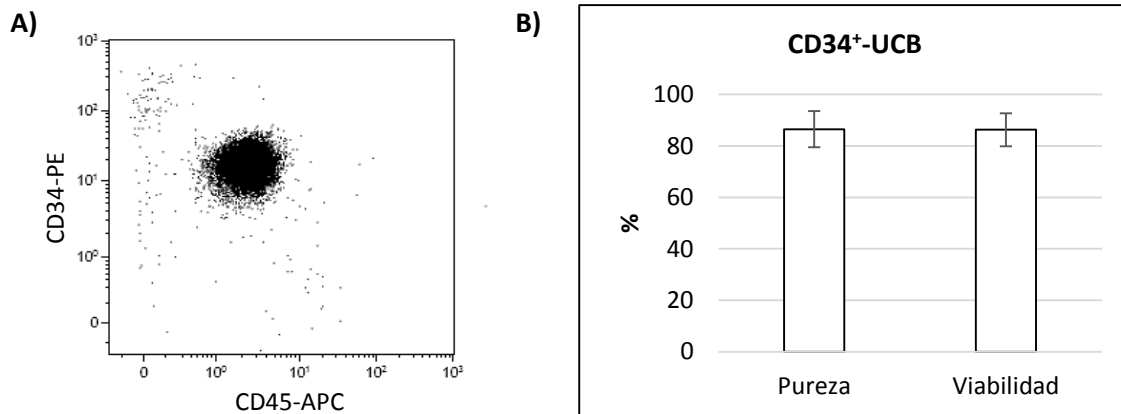


Figura 12: Caracterización de las CD34⁺-UCB. A) Caracterización mediante FC, B) Representación de la pureza y viabilidad de las células CD34⁺-UCB.

2. Caracterización de las hUVEC

Como muestra la Figura 13 las hUVEC son células con una morfología poliédrica y con uniones estrechas entre sí, lo cual da lugar a una organización de “empedrado”⁶⁸. Asimismo, como son capaces de expresar en cultivo ciertos GF para la expansión de las HSC^{69,70}. Entre ellos cabe destacar SCF que induce el mantenimiento y la autorrenovación de las HSC^{71,72}, Flt-3L que regula la proliferación de las células hematopoyéticas más primitivas³⁶, G-CSF que induce la retención y quiescencia de las HSC^{73,74} y Jagged-1 que apoya la autorrenovación y previene el agotamiento celular^{75,76}. En cambio, la expresión de la ANG-1, relacionada con la autorrenovación y supervivencia⁷⁷, es bastante baja.

Tras la caracterización por IF, se demostró que la población aislada a partir de UC, es positiva para CD31 y Ve-cadherina⁷⁸. En el caso de CD34, se sabe que las EC humanas vasculares son positivas para este marcador, sin embargo, la expresión de esta proteína extracelular desaparece tras el cultivo^{79,80}, aunque una pequeña porción de las células pueden seguir expresándolo⁸¹ (Figura 14).

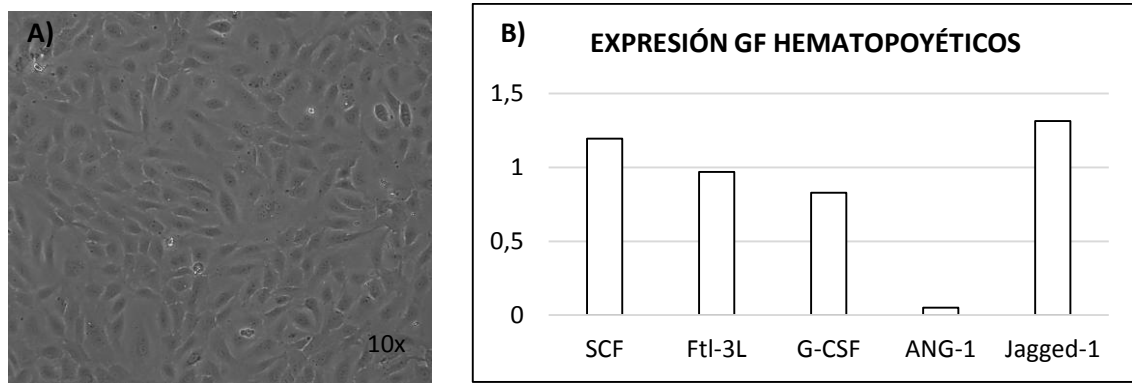


Figura 13: Caracterización de las hUVEC. A) hUVEC en cultivo. B) Expresión de GF hematopoyéticos.

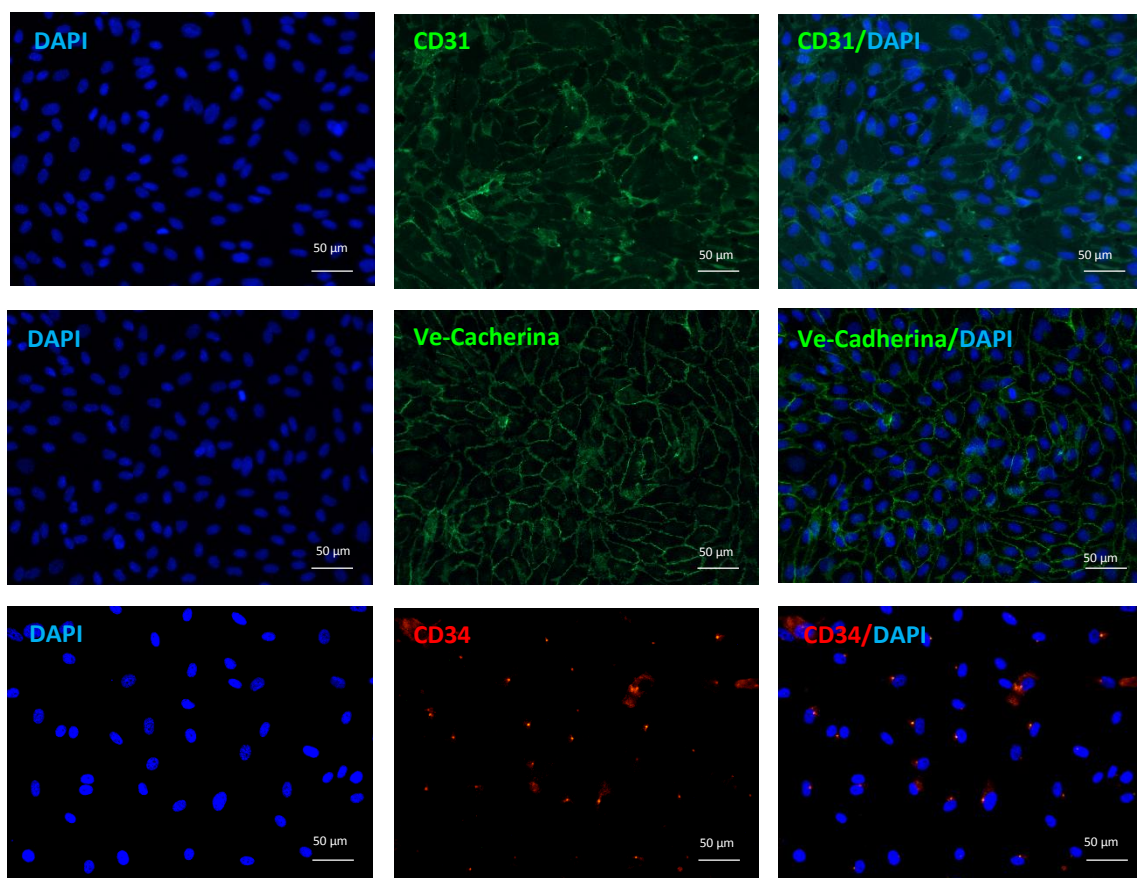


Figura 14: Caracterización de las hUVEC por IF.

3. Caracterización de las HpFEC y de los progenitores hepáticos procedente de FL humanos

Como muestra en la Figura 15, las HpFEC son células adherentes con una morfología fibroblastoide mientras que por su parte los HB humanos se caracterizan por la formación de colonias compuestas por células muy compactas.

Además, esta población celular es capaz de expresar determinados GF importantes para la expansión de las HSC^{69,70} (Figura 15). Entre ellos cabe destacar, al igual que en el caso de las hUVEC, la expresión de SCF^{71,72} y Ftl-3L³⁶. En cambio la expresión de ANG-1⁷⁷ y TGF- β 1, involucrada en el mantenimiento de la quiescencia^{83,84}, es bastante baja.

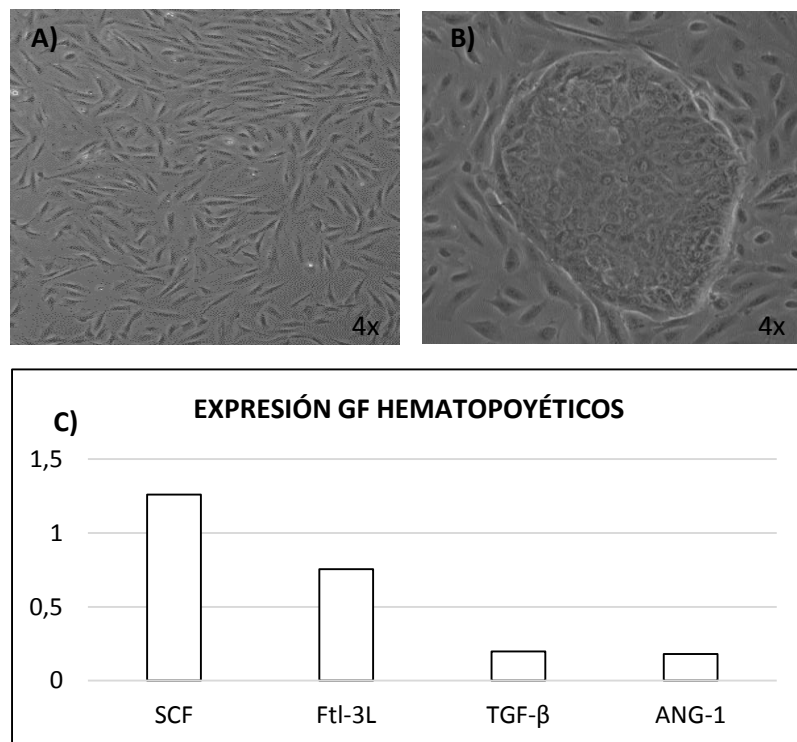


Figura 15: A) HpFEC en cultivo. B) Progenitores hepáticos en cultivo. C) Expresión de GF hematopoyéticos.

Una de las características que define a las MSC es su capacidad de poderse diferenciar en varios tipos celulares: osteocitos, condrocitos y adipocitos⁸². Tras 2 semanas de diferenciación adipocítica, se puede observar la acumulación de gotas lipídicas en el citoplasma (Figura 16).

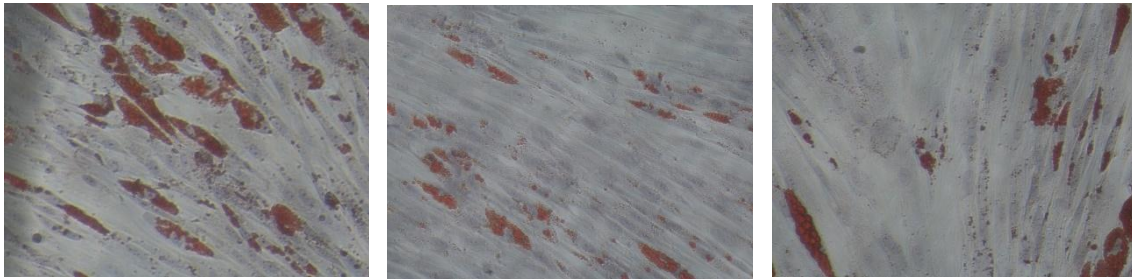


Figura 16: Diferenciación adipocítica de las HpFEC.

Una característica de las MSC es la no expresión de marcadores hematopoyéticos como CD34, CD45 y CD38⁸⁵. Como se muestra en la Figura 17, las HpFEC no expresan ninguno de los marcadores hematopoyéticos mencionados. En cambio, y tal como se esperaba, esta población fue positiva para CD146 y Nestin⁸⁵.

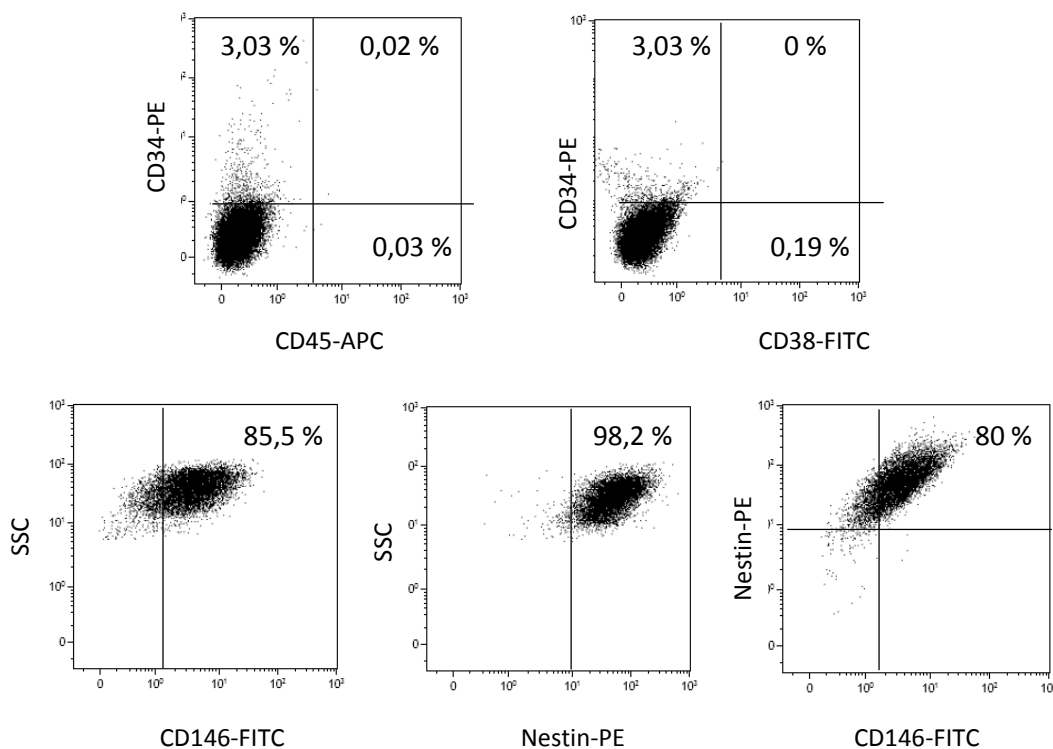


Figura 17: Caracterización de las HpFEC por FC.

En la caracterización del HpFEC por IF, se puede observar que esta población celular es positiva para Vimentina, Nestin, CD146 y NG2 (Figura 18). Se sabe que tanto los hígados adultos como los fetales albergan pericitos, los cuales son similares a los encontrados en otros órganos y distintos a las células estrelladas hepáticas. Recientemente, ha sido

descrita la identificación, purificación y caracterización de este tipo celular en hígados humanos adultos y fetales. Éstos fueron localizados alrededor de los vasos periportales, los cuales son positivos para NG2, Vimentina y CD146⁸⁶. Mientras que son negativos para marcadores de células epiteliales endoteliales y hematopoyéticas⁸⁶. Por otro lado, Khan *et al.* habían puesto de manifiesto que los pericitos Nestin⁺NG2⁺, asociados a los vasos porta, formaban un nicho que promovía la expansión de las HSC⁴⁶.

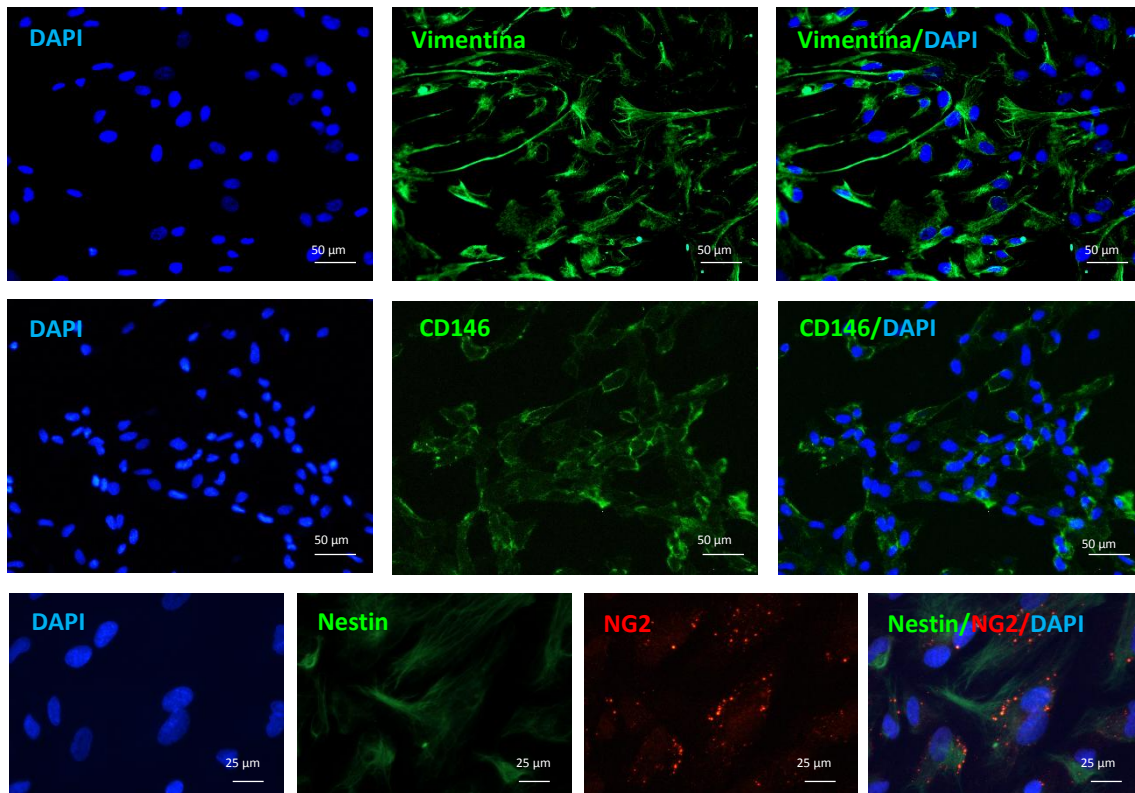


Figura 18: Caracterización de las HpFEC mediante IF.

4. Caracterización del nicho hepático fetal

Para la recreación del nicho hepático fetal se llevaron a cabo dos estrategias distintas, como hemos como se entado anteriormente. Por una parte las células se sembraron en MG (“Organoides Takebe”) y por otro lado, sobre un *scaffold* de rata descelularizado (“Organoides Vyas/Baptista”).

En el caso de los “Organoides Vyas/Baptista”, se puede observar una alta colonización del *scaffold* por parte de las células. Además, gracias a la IF se puede percibir los tres

tipos celulares presentes: HB derivados de las ES4 (CK19 y EpCAM), hUVEC (Ve-cadherina) y HpFEC (Vimentina) (Figura 19).

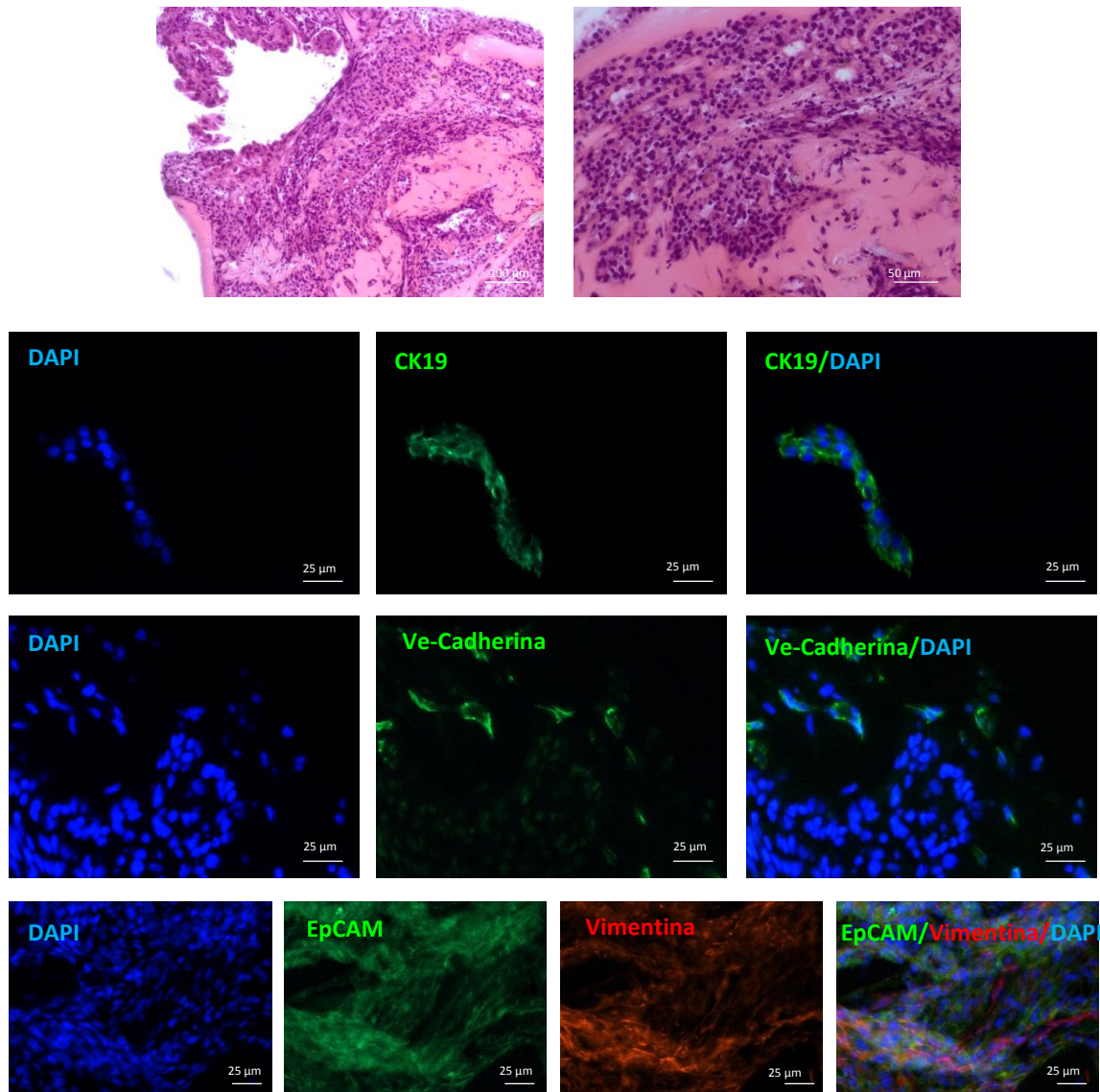


Figura 19: Caracterización de los “Organoides Vyas/Baptista” por H&E e IF.

En el caso de los “Organoides Takebe”, se puede observar igualmente una alta densidad celular con presencia de las tres poblaciones celulares distribuidos homogéneamente por todo el organoide (Figura 20).

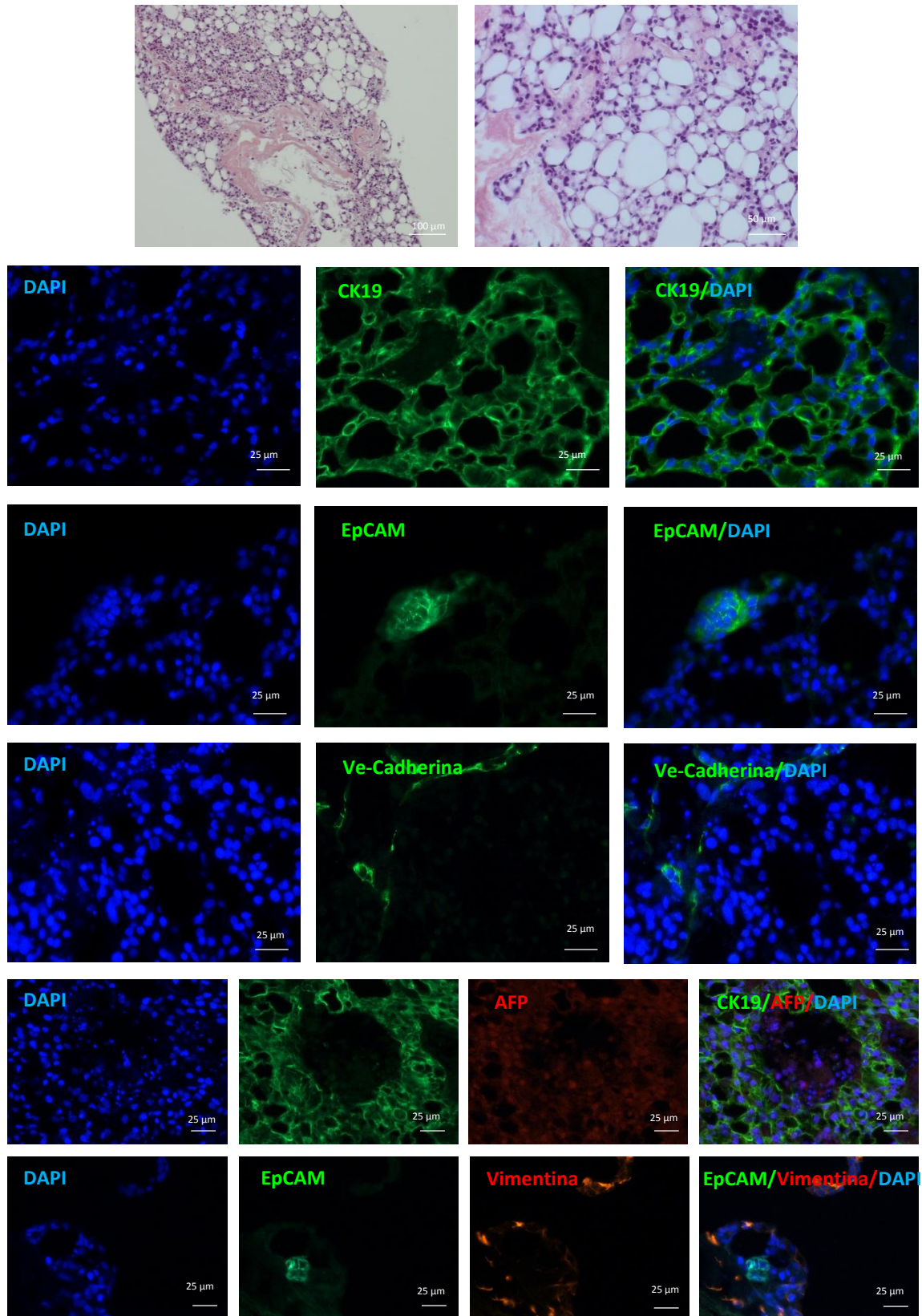


Figura 20: Caracterización de los “Organoides Vyas/Baptista” por H&E e IF.

5. Expansión y caracterización de las HSC procedentes de UCB empleando organoides hepáticos de bioingeniería

Experimentos control 2D

Como se observa en la Figura 21, en el caso del co-cultivo en 2D de los HB derivados de las ES4 con las CD34⁺-UCB, se puede observar un mantenimiento de los progenitores eritroides y un ligero aumento de los mismos en la condición dinámica tras 7 días en cultivo. Además, si se compara esta condición con su respectivo control, se observa como en el control no se produce el mantenimiento de esta población celular. Sin embargo, se produjo una reducción en el número de colonias de progenitores más primitivas y maduras. Cuando se retiran los GF del medio de cultivo se observa una reducción de las tres poblaciones, lo cual es comparable con su respectivo control. Además, al comparar los recuentos celulares a los 7 días de expansión, se observa que en nuestro sistema no se produce una expansión tan grande como en su respectivo control, lo cual pensamos que es debido a un cambio en el ratio de células presentes con un claro incremento en el ratio de progenitores eritroides.

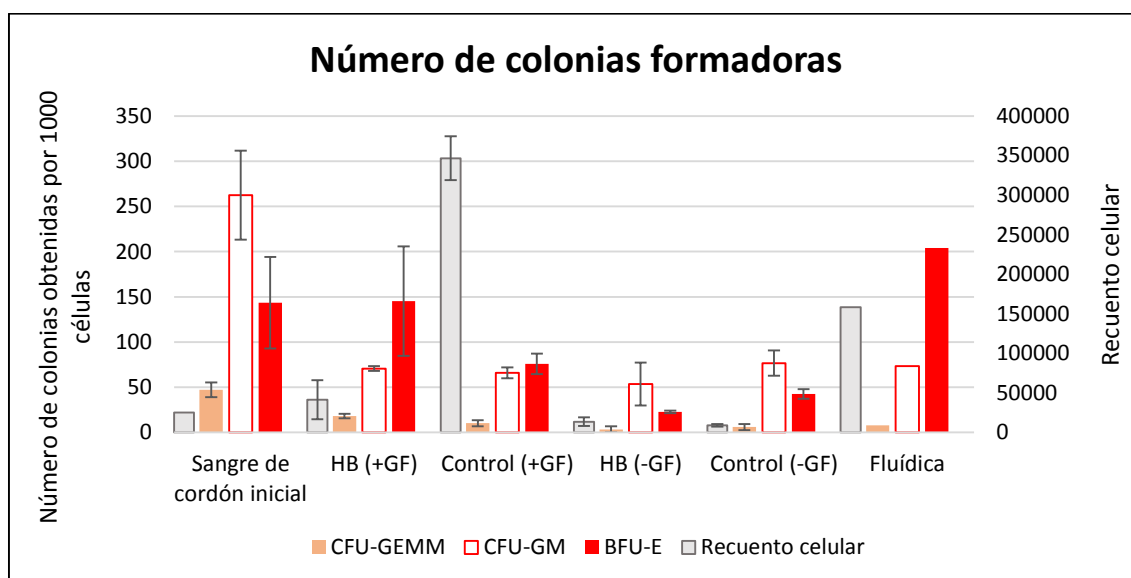


Figura 21: Número de colonias formadoras en el experimento control 2D con los HB derivados de las ES4 en condiciones estáticas y dinámicas.

En el caso de las hUVEC y de las HpFEC, previamente inactivadas con Mitomicina C (véase Apéndice), no se observa el efecto descrito con los HB derivados de las ES4 (Figura 22 y

23). Tanto en nuestro sistema como en los respectivos controles se puede observar gráficas similares, indicando que estas poblaciones por sí solas no poseen una contribución. Al igual que ocurría con los HB derivados de las ES4, al retirar los GF del cultivo, se produce una reducción en el número de colonias formadoras de manera equiparable entre nuestro sistema y los controles. En cambio, en estos experimentos el ratio de células es muy similar tanto en nuestro sistema como en el control, lo cual nos sugiere que no ocurre la misma situación que con los HB derivados de las ES4.

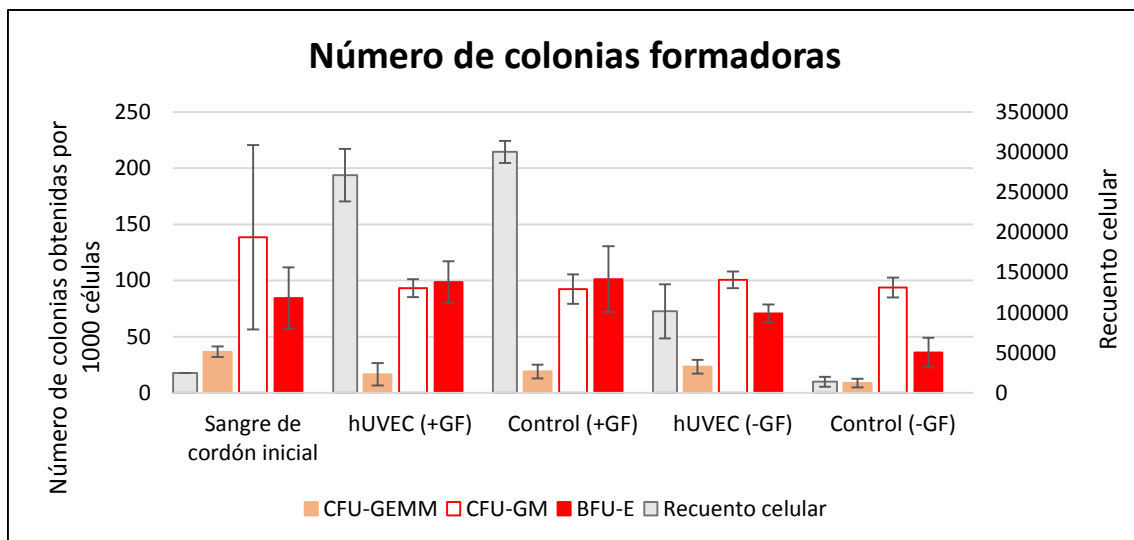


Figura 22: Número de colonias formadoras en el experimento control 2D con las hUVEC.

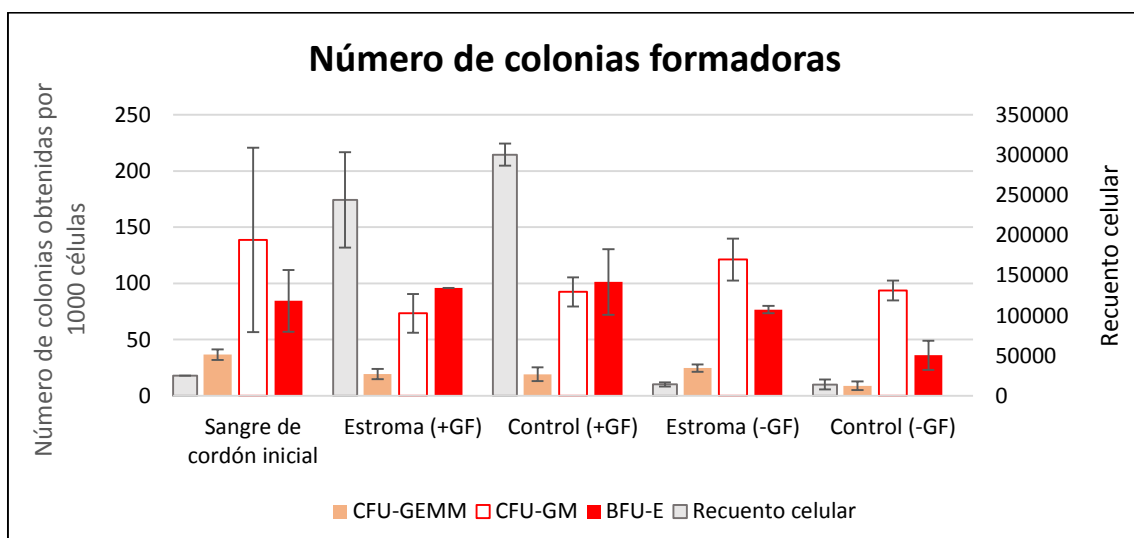


Figura 23: Número de colonias formadoras en el experimento control 2D con las HpFEC.

El proceso de diferenciación de las ES4 en HB es un proceso bastante heterogéneo, en el que la naturaleza de las poblaciones resultantes puede variar de un protocolo o *batch*

de diferenciación a otro. Por ello, con el objetivo de obtener una población más homogénea, se procedió a la selección de la población mediante el marcador extracelular EpCAM. Como se puede observar en la Figura 24, los datos de colonias formadoras fueron bastante similares a los ya obtenidos sin realizar la selección de la población. Sin embargo, un dato muy curioso es la expansión de los progenitores eritroides en la condición sin GF. Esto puede ser debido como resultado de la selección de la población de partida, ya que como se ha demostrado esta población es capaz de producir diferentes GF como SCF y EPO.

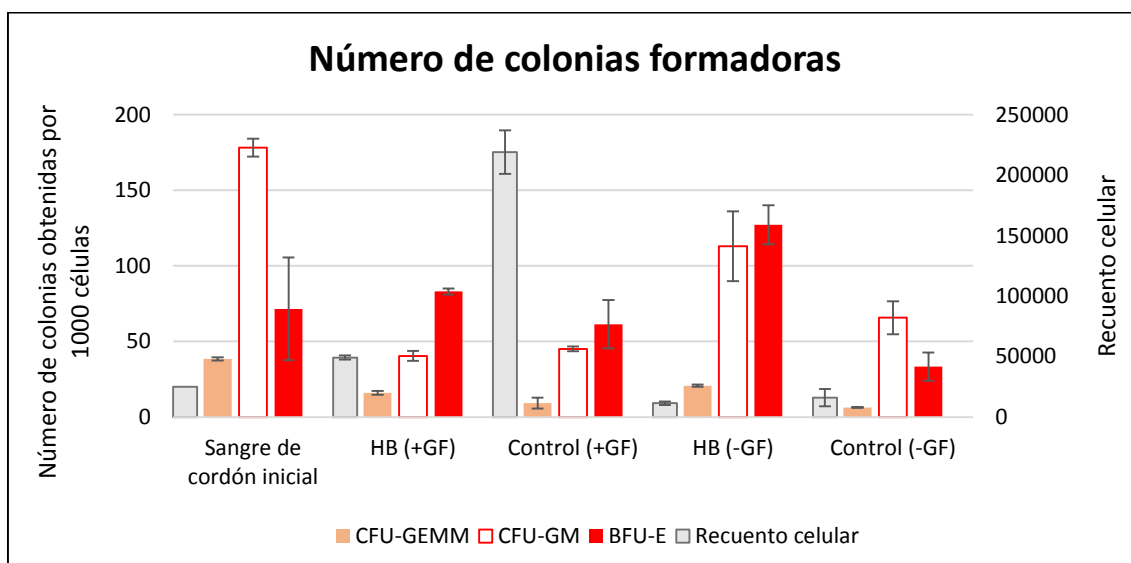


Figura 24: Número de colonias formadoras en el experimento control 2D con los HB derivados de las ES4 tras la selección EpCAM.

Experimento control 3D: Expansión de las HSC usando los organoides hepáticos de bioingeniería con hepatoblastos fetales humanos primarios

Como control de nuestros experimentos en 3D, se usaron HB humanos fetales primarios. Para conocer qué medio era el más idóneo para obtener la mayor expansión de las HSPC, se testaron dos medios distintos: 1) Medio hematopoyético (mHSC), 2) Medio hematopoyético/Medio endotelial 1:1. Tras 7 días en cultivo, se sacaron las células hematopoyéticas del MG y se embebieron en metilcelulosa con el fin de identificar y cuantificar los diferentes progenitores presentes en el cultivo. Como se aprecia en la Figura 25 se obtuvo una gran expansión de los progenitores más primitivos (CFU-GEMM) y una gran expansión eritroide (BFU-E). Además, se obtuvo una gran proliferación de las

células más maduras (CFU-GM), lo cual es más evidente en la condición con el medio hematopoyético/endotelial. Probablemente esto es debido a la presencia de GF presentes en el medio endotelial. Por lo tanto, si se comparan los resultados obtenidos en nuestro sistema 3D con los controles tras 7 días en cultivo, se puede concluir que las células primarias del FL humano pueden mantener la hematopoyesis y eritropoyesis *in vitro*.

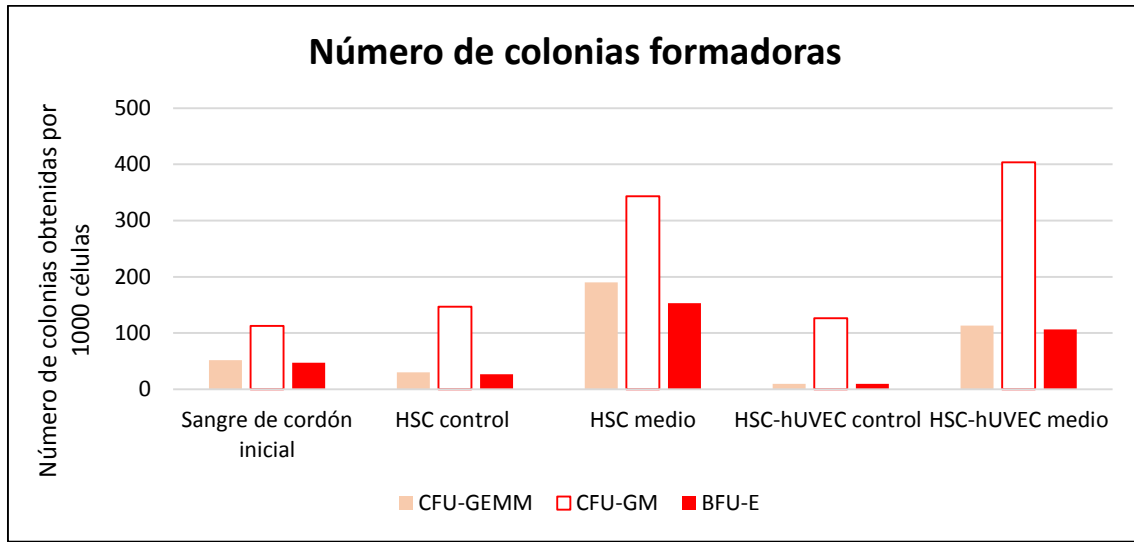


Figura 25: Número de colonias formadoras en el experimento control con HB humanos.

Experimento: Expansión de las HSC usando los organoides hepáticos de bioingeniería

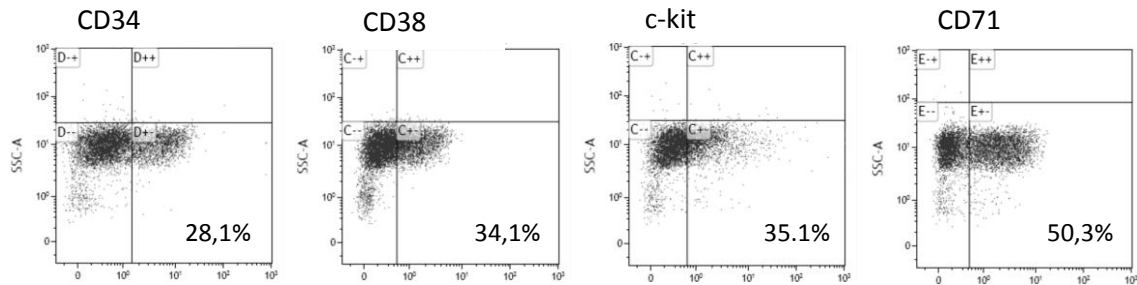
Tras 14 días de expansión de las HSC, se estudió la naturaleza de las células expandidas. Para ello, se escogieron cuatro marcadores de células hematopoyéticas como son CD34 (selección positiva de HSC y HSPC), CD38 (selección positiva de células más diferenciadas), c-kit (receptor de SDF-1) y CD71 (selección positiva de progenitores eritroides). De esta manera, mediante FC se estudiaron dichos marcadores.

En el caso de las células hematopoyéticas expandidas mediante los “Organoides Takebe” se puede observar que las células expandidas poseen una naturaleza mucho más primitiva que las células hematopoyéticas expandidas en los controles 2D (Figura 26).

En los ensayos clonogénicos, se puede observar una expansión moderada de los progenitores eritroides a los 7 días de expansión, lo cual es más evidente a los 14 días así como un mantenimiento en el número de CFU-GEMM. Si se compara el número de células obtenidas a los 7 y 14 días, se percibe que en nuestro sistema no tenemos una

gran expansión como ocurre en el control. Creemos que esto es debido a un cambio en el ratio de progenitores hematopoyéticos tal y como ocurría en los experimentos control 2D (Figura 27).

A)



B)

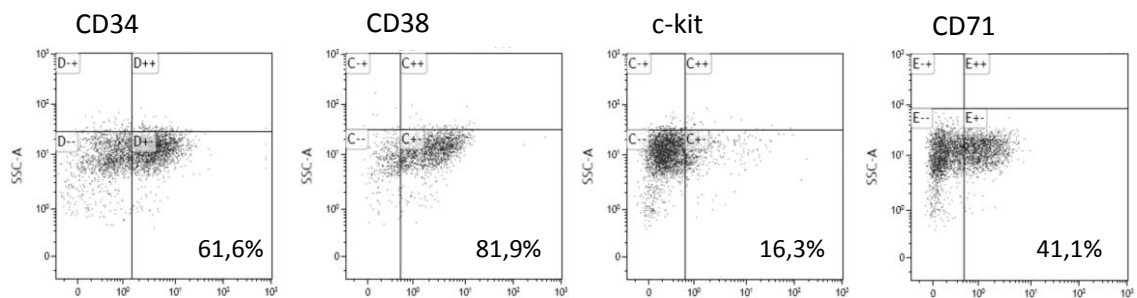


Figura 26: Análisis de la población hematopoyética expandidas a los 14 días mediante FC. A) Control 2D, B) "Organoides Takebe".

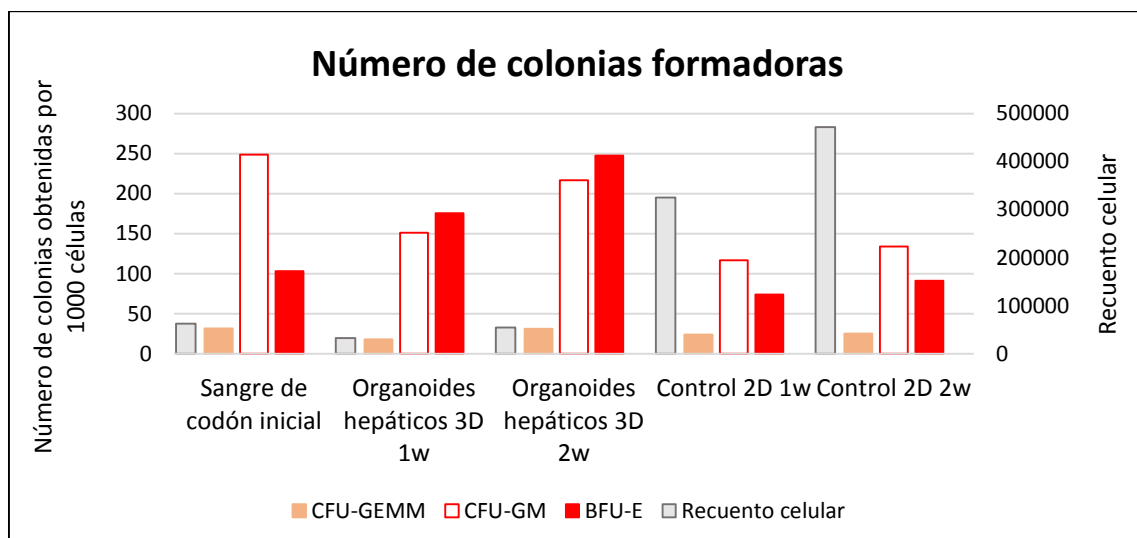
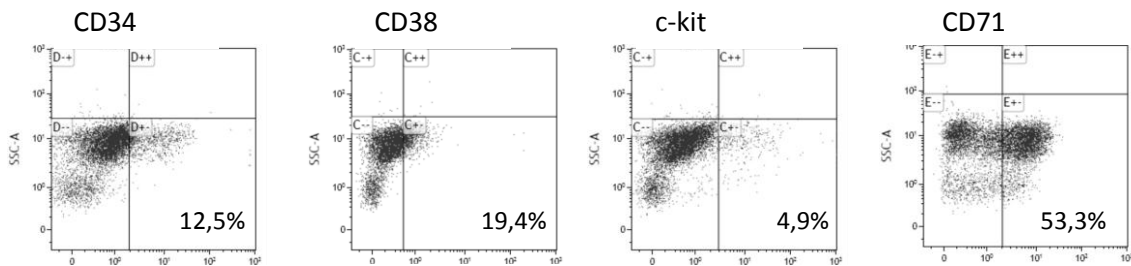


Figura 27: Número de colonias formadoras en los "Organoides Takebe".

En el caso de los “Organoides Vyas/Baptista” obtuvimos unos resultados similares a los “Organoides Takebe”. Como se puede observar en la Figura 28, la naturaleza de las HSPC en nuestro sistema de bioingeniería es mucho más primitivas que la población obtenida en los controles 2D.

A)



B)

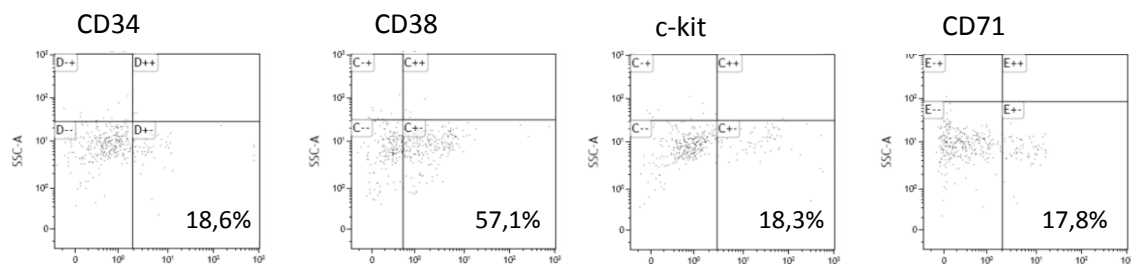


Figura 28: Análisis de la población hematopoyética expandidas a los 14 días mediante FC. A) Control 2D, B) “Organoides Vyas/Baptista”.

Por su parte, en los ensayos clonogénicos se pueden observar resultados similares a los reportados en los “Organoides Takebe” a los 7 días de expansión. Sin embargo, a los 14 días se produce una robusta expansión tanto de los progenitores hematopoyéticos como de las células más maduras, así como, un ligero incremento en el número de células más primitivas. Estos resultados sugieren que se puede lograr una gran expansión de la población BFU-E usando estos organoides hepáticos de bioingeniería *in vitro*. En este caso al igual que en los “Organoides Takebe”, pero de una manera más marcada, se ha producido un incremento en el ratio de progenitores eritroides (Figura 29).

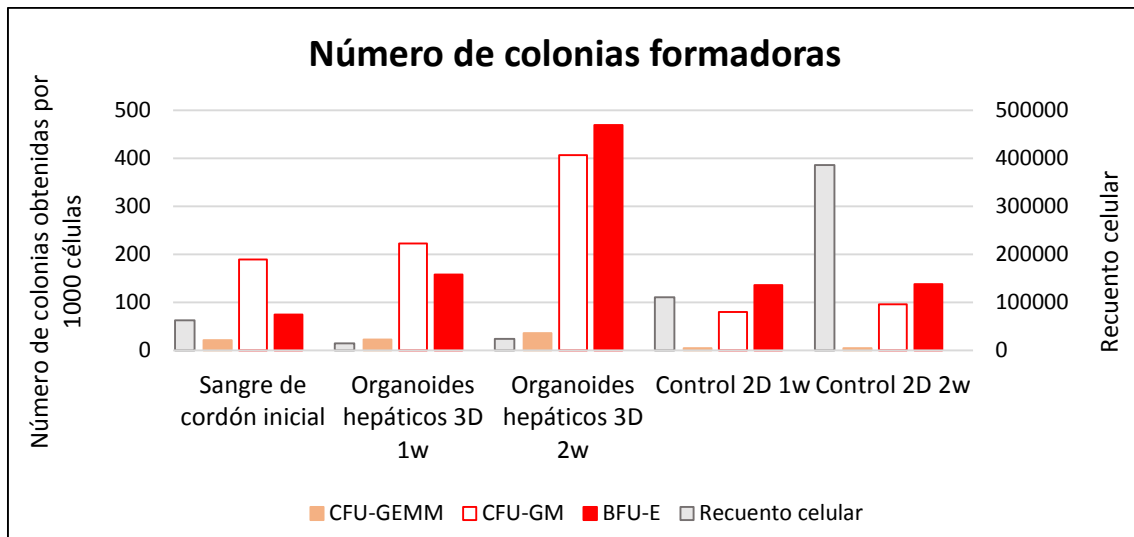


Figura 29: Número de colonias formadoras en los “Organoides Vyas/Baptista”.

DISCUSIÓN

El trasplante de HSC de UCB ha aumentado las posibilidades de encontrar un donante compatible en un tiempo razonable. No obstante, el uso de esta fuente de HSC en pacientes adolescentes y adultos es bastante limitado como consecuencia del bajo número de células CD34⁺ por unidad de UCB y por la velocidad lenta de injerto debido a la naturaleza tan primitiva de estas células. Asimismo, la permanente escasez de RBC hace que sea necesaria una expansión y maduración de los progenitores eritroides *ex vivo*.

Sin embargo, actualmente no existen protocolos robustos que permitan la expansión de HSPC *in vitro*. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos métodos que permitan la obtención de los números necesarios de células tanto para poder tratar pacientes adultos como para aumentar la velocidad de injerto gracias al incremento en el número de progenitores más maduros. Basándonos en la premisa de que durante el desarrollo embrionario, el FL posee un papel bastante importante sobre la hematopoyesis y la eritropoyesis³, nuestro objetivo es la expansión de HSPC procedentes de UCB mediante el uso de organoides hepáticos humanos de bioingeniería.

Para reproducir en un primer lugar el nicho hepático fetal, se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de los distintos componentes celulares presentes en el hígado fetal: HB derivados de ESC (*Capítulo 2*), hUVEC, HpFEC y las HSC procedentes de UCB.

Todas estas células han sido caracterizadas como se ha descrito anteriormente y representan poblaciones bastante puras. Para las HSPC de UCB se obtuvieron unas poblaciones con una pureza de 86,4%. Los datos de caracterización de las hUVEC y de las HpFEC mostraron también poblaciones bastante homogéneas.

Las hUVEC analizadas fueron capaces de expresar ciertos GF hematopoyéticos (SCF, Flt-3L, G-CSF, ANG-1 y Jagged-1) muy importantes en la autorrenovación, proliferación y quiescencia de las HSC⁶⁹. Se sabe que las HSC y HSPC se encuentran en estrecha asociación con las células que forman su microambiente⁸⁷⁻⁹¹, por ello se han desarrollado diferentes sistemas *ex vivo* con cultivos sobre monocapas de células alimentadoras de estroma. Se ha demostrado que las células estromales, particularmente las MSC, son capaces de promover la expansión de las células más

primitivas *ex vivo* en un proceso que se debe no solo al contacto células-célula sino también a la secreción de citoquinas hematopoyéticas^{42,92}. Adicionalmente, Mokhtari *et al.* ha demostrado que el estroma procedente de FL proporcionaba el equilibrio perfecto entre la preservación de las HSC más primitivas y la diferenciación de las HSC procedentes del UC³⁴. Anteriormente, Khan *et al.* habían puesto de manifiesto que los pericitos Nestin⁺NG2⁺, asociados a los vasos porta, formaban un nicho que promovía la expansión de las HSC⁴⁶. Por todo ello, se decidió aislar y caracterizar el estroma hepático fetal humano. Estas células mostraron tener una morfología fibroblastoide y cierta capacidad para diferenciarse hacia el linaje adipocítico⁸². Al igual que las hUVEC, estas células fueron capaces de expresar ciertos factores de crecimiento hematopoyéticos (SCF, Ftl-3L, ANG-1 y TGF-β1) muy importantes en la autorrenovación, proliferación y quiescencia de las HSC⁶⁹. En la caracterización por citometría de flujo, se demostró la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45 y CD38)⁸⁵ y la expresión de CD146 y Nestin⁸⁵. En la caracterización del HpFEC por inmunofluorescencia, se observó que esta población celular era positiva para para Vimentina, Nestin, CD146 y NG2. Recientemente, ha sido descrita la identificación, purificación y caracterización de pericitos en hígados humanos adultos y fetales. Estas células positivas para NG2, Vimentina y CD146 y negativas para marcadores de células epiteliales endoteliales y hematopoyéticas, fueron localizadas alrededor de los vasos periportales⁸⁶. Además, Khan *et al.* pusieron de manifiesto que los pericitos Nestin⁺NG2⁺, asociados a los vasos porta, formaban un nicho que promovía la expansión de las HSC⁴⁶. Por ello, se puede concluir que la población estromal aislada a partir de FL, será muy probablemente estas células pericíticas.

En cuanto al aislamiento y caracterización de los progenitores hepáticos procedentes de hígados fetales humanos, cabe destacar como ya se ha mencionado anteriormente que su acceso no es nada fácil y su cultivo y expansión *in vitro* es realmente un reto. Tras el aislamiento de los HB humanos, estos fueron expandidos en p0 y usados a continuación.

Una vez aislados y caracterizados todos los tipos celulares, se llevó a cabo la recreación del nicho hepático fetal. Para ello, se emplearon distintas conformaciones con el objetivo de reproducir al máximo el microambiente fetal hepático. Finalmente, se llevaron a cabo dos estrategias distintas: “Organoides Takebe” y “Organoides

Vyas/Baptista". Takebe *et al.* habían demostrado, por primera vez, la generación de un hígado humano funcional a partir de iPSC humanas *in vitro*³¹. En él, se producía no solo una reorganización de los progenitores hepáticos, sino que además ha sido capaz de rescatar a un modelo murino de insuficiencia hepática letal inducida por fármacos, mediante la maduración de las células gracias a la formación de una vasculatura funcional³¹. Por otro lado, Vyas/Baptista han demostrado la formación de organoides hepáticos 3D con hepatocitos y ductos biliares cuando sembrados con células progenitoras fetales de hígados humanos sobre la ECM de hígados acelulares. Estos organoides ha sido capaces de imitar diversos aspectos de la organogénesis hepatobiliar dando como resultado la formación concomitante de hepatocitos, progresivamente más diferenciados, y estructuras biliares³². Esto demostraba que los *scaffolds* procedentes de tejido hepático contenían determinadas moléculas procedentes de la ECM que regulaban la diferenciación celular, función, expansión y regeneración³³. Adicionalmente, se usaron también condiciones de cultivo en hipoxia (1% O₂). El motivo de incubar los cultivos en condiciones de hipoxia, se basó sobre los conocimientos actuales que existen sobre disponibilidad de oxígeno tanto en la BM como en el FL. Se sabe que en la región endosteal de la BM existe un gradiente de oxígeno donde las HSC se distribuyen de manera selectiva a lo largo de la región más hipóxica⁹³. Además, se conoce que el lóbulo derecho hepático en el feto posee una mayor actividad hematopoyética que el izquierdo⁹⁴, lo cual coincide con el hecho de que la UV irriga las porciones izquierda y central del FL humano, mientras que la PV lo hace en el lóbulo derecho⁹⁵.

El día de la siembra de los organoides el medio elegido fue el medio de cultivo de expansión de los HB derivados de ES4 con el fin de no crear un cambio muy brusco el día de la siembra. Sin embargo, al día siguiente se procedió al cambio de medio, añadiendo un medio hematopoyético suplementado con IGF-1 y VEGF, para aumentar la supervivencia de las hUVEC.

En ambos organoides, se observó una alta colonización celular. El marcaje con CK19, EpCAM y AFP reveló la presencia de los HB derivados de las ES4, el marcaje con V-cadherina la presencia de EC y el marcaje con Vimentina la presencia del HpFEC. Sin embargo, cabe destacar la morfología celular en los "Organoides Takebe", se puede

observar igualmente una alta densidad celular. En este caso también se pueden percibir los tres tipos celulares, sin embargo, observamos una morfología celular bastante peculiar. Esto puede ser debido a la existencia de cierta diferenciación celular de los HB derivados de las ES4 hacia la línea colangiocítica.

En el co-cultivo en 2D con los HB derivados de las ES4, se testaran tres tipos de cultivo: estático, dinámico y *sorting* de la población. En el cultivo estático, se observó un mantenimiento de los progenitores eritroides tras 7 días de expansión. En cambio, se observó un aumento moderado de los progenitores eritroides. Sin embargo, se produjo una reducción en el número de colonias de progenitores más primitivos y maduros. Al comparar el número de colonias de progenitores eritroides (BFU-E) con el control en 2D, vemos como en este último no se produce ningún mantenimiento en el número de progenitores eritroides. Además, si se tiene en cuenta el recuento celular a los 7 días de expansión, no se obtuvo una expansión celular tan grande como ocurrió en el control. Creemos que esto es debido a un cambio en el ratio de las células presentes con un claro incremento en el ratio de progenitores eritroides. Para la condición en dinámico se diseñaron varios dispositivos hechos tanto en una impresora 3D como de una manera “más casera”. Los dispositivos generados con la impresora 3D tenían el inconveniente de que estaban hechos con un material que no permitía el paso de la luz, por lo que para poder seguir el cultivo al microscopio era necesario añadirle como base un cubreobjetos (datos no mostrados). El problema de este dispositivo fue una baja adherencia celular, por lo que se prefirió realizar un dispositivo a partir de una placa de cultivo de 48 pocillos. Como se muestra, se realizó una entrada y salida y se eliminaron el resto de pocillos, pudiendo funcionar así de reservorio de desecho. Sin embargo, el motivo de realizar el resto de experimentos en estático y no en dinámico a pesar de la obtención de mejores resultados, se debe a las dificultades asociadas a estos dispositivos: formación de burbujas, fugas de medio o disminución de la adhesión celular con el tiempo, entre otros.

Con el fin de intentar homogenizar la población de partida entre diferenciación y diferenciación, se llevó a cabo un *sorting* de la población inicial gracias al marcador extracelular EpCAM, marcador presente en las células madre/progenitoras hepáticas⁹⁶. Los ensayos clonogénicos llevados a cabo sobre la población celular tras 7 días de

expansión, revelaron resultados similares a los ya obtenidos sin realizar la selección inicial de la población. Sin embargo, se observó un dato muy curioso en la condición sin GF, donde se obtuvo una gran expansión de los progenitores eritroides. Esto puede ser debido como resultado de la producción de factores de crecimiento hematopoyéticos (SCF y EPO) (*Capítulo 2*) por parte de una población más pura de HB derivados de ES4. En el co-cultivo en 2D con las hUVEC y las HpFEC no se observaron diferencias entre nuestro sistema y el control, lo cual indica que estas poblaciones por sí solas no poseen una contribución sobre la hematopoyesis/eritropoyesis. Además, al igual que ocurría con los HB derivados de las ES4, al retirar los factores de crecimiento del cultivo, se produce una reducción en el número de colonias formadoras de manera equiparable entre nuestro sistema y el control. En cambio, en estos experimentos el número de células es bastante similar entre condiciones, lo cual nos sugiere que en estos casos no existe un aumento en el ratio de progenitores hematopoyéticos.

A continuación se llevó la expansión de las HSC pero sobre unos organoides 3D compuestos por HB fetales humanos, hUVEC y HpFEC. La obtención de una gran expansión de los progenitores eritroides, de las células más primitivas y de las células más maduras. Esto demuestra que el FL humano puede mantener la hematopoyesis y eritropoyesis *in vitro*, lo cual ya había sido demostrado anteriormente³⁴.

Tras los experimentos controles, se llevó a cabo la expansión de las células CD34⁺-SCU usando los organoides hepáticos de bioingeniería (“Organoides Takebe” y “Organoides Vyas/Baptista”). En ambos casos, los cultivos se llevaron hasta las dos semanas. Tras ese tiempo se quiso estudiar la naturaleza de las células expandidas. Para ello, se escogieron cuatro marcadores de células hematopoyéticas más primitivas y más maduras, como son CD34, CD38, c-kit y CD71, y se estudiaron mediante citometría de flujo. En ambos casos las células obtenidas tras 14 días de expansión eran mucho más primitivas que las células obtenidas en los controles (Figura 26 y 28). En los ensayos clonogénicos de las células expandidas usando los “Organoides Takebe”, se observó una moderada expansión de los progenitores eritroides a los 7 días, siendo más evidente a los 14 (Figura 27). Además, se mantuvo el número de colonias de CFU-GEMM. En cambio, al comparar estos resultados con los de las células expandidas empleando los “Organoides Vyas/Baptista”, a los 14 días se observó una robusta expansión tanto de los progenitores

hematopoyéticos como de las células más maduras y un ligero incremento en el número de células más primitivas (Figura 29). En ambos sistemas, si se compara el número de células obtenidas a los 7 y 14 días de expansión, se percibe que no hay una gran expansión y diferenciación celular como ocurre en el control, sino que lo se está observando es un cambio en el ratio celular con un claro incremento de progenitores eritroides.

Los resultados obtenidos al utilizar los “Organoides Vyas/Baptista” sugieren que se puede lograr una gran expansión de la población BFU-E a partir de UCB mediante el uso de estos organoides hepáticos de bioingeniería *in vitro*. De esta manera el microambiente hepático fetal podría ser usado para obtener RBC a gran escala y suplir por lo tanto las necesidades clínicas que a día de hoy existen. Sin embargo, sería necesario prolongar en el tiempo la expansión de estas células con el objetivo de obtener una mayor producción celular. Asimismo, sería conveniente realizar algún ensayo de funcionalidad para verificar que las células obtenidas poseen las características propias de los RBC.

CONCLUSIONES

1. Los HB generados a partir de las células embrionarias humanas, generaron una población de células que expresan factores de crecimiento específicos que respalda el mantenimiento y expansión de las HSC y BFU-E.
2. Ambos organoides hepáticos mantuvieron un mayor número de HSPC que los controles.
3. Los “Organoides Vyas/Baptista” produjeron un mayor número de BFU-E en comparación con los controles 2D o los “Organoides Takebe”.
4. Los organoides hepáticos (fetales) humanos de bioingeniería mostraron un papel importante en el mantenimiento de las HSC y de la eritropoyesis, por lo que podrían ser usados como un modelo *in vitro* para estudiar la hematopoyesis fetal humana/eritropoyesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ballen, K.K., Spitzer, T. R. The great debate: haploidentical or cord blood transplant. *Bone marrow transplantation* **46**, 323-329 (2011).
2. Ballen, K.K., Koreth, J., Chen, Y. B., Dey, B. R., Spitzer, T. R. Selection of optimal alternative graft source: mismatched unrelated donor, umbilical cord blood, or haploidentical transplant. *Blood* **119**, 1972-1980 (2012).
3. Mikkola, H.K. & Orkin, S.H. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**, 3733-3744 (2006).
4. Godoy, P., *et al.* Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology* **87**, 1315-1530 (2013).
5. Lin, R.Z. & Chang, H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal* **3**, 1172-1184 (2008).
6. Glicklis, R., Merchuk, J.C. & Cohen, S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnology and bioengineering* **86**, 672-680 (2004).
7. Moscona, A. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Experimental cell research* **22**, 455-475 (1961).
8. Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R. & Marceau, N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *The Journal of cell biology* **101**, 914-923 (1985).
9. Brophy, C.M., *et al.* Rat hepatocyte spheroids formed by rocked technique maintain differentiated hepatocyte gene expression and function. *Hepatology* **49**, 578-586 (2009).
10. Koide, N., *et al.* Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Experimental cell research* **186**, 227-235 (1990).
11. Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M. & Nielsen, L.K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and bioengineering* **83**, 173-180 (2003).
12. Shteyer, E., *et al.* Reduced liver cell death using an alginate scaffold bandage: a novel approach for liver reconstruction after extended partial hepatectomy. *Acta biomaterialia* **10**, 3209-3216 (2014).
13. Lin, J., *et al.* Use an alginate scaffold-bone marrow stromal cell (BMSC) complex for the treatment of acute liver failure in rats. *International journal of clinical and experimental medicine* **8**, 12593-12600 (2015).
14. Turner, W.S., *et al.* Human hepatoblast phenotype maintained by hyaluronan hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **82**, 156-168 (2007).
15. Katsuda, T., Teratani, T., Ochiya, T. & Sakai, Y. Transplantation of a fetal liver cell-loaded hyaluronic acid sponge onto the mesentery recovers a Wilson's disease model rat. *Journal of biochemistry* **148**, 281-288 (2010).
16. Shang, Y., *et al.* Hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells. *Journal of bioscience and bioengineering* **117**, 99-106 (2014).
17. Chien, H.W., Lai, J.Y. & Tsai, W.B. Galactosylated electrospun membranes for hepatocyte sandwich culture. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **116**, 576-581 (2014).

18. Berthiaume, F., Moghe, P.V., Toner, M. & Yarmush, M.L. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **10**, 1471-1484 (1996).
19. Kaihara, S., *et al.* Survival and function of rat hepatocytes cocultured with nonparenchymal cells or sinusoidal endothelial cells on biodegradable polymers under flow conditions. *Journal of pediatric surgery* **35**, 1287-1290 (2000).
20. Kim, S.S., *et al.* Dynamic seeding and in vitro culture of hepatocytes in a flow perfusion system. *Tissue engineering* **6**, 39-44 (2000).
21. Rad, A.T., *et al.* Conducting scaffolds for liver tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A* **102**, 4169-4181 (2014).
22. Kanninen, L.K., *et al.* Hepatic differentiation of human pluripotent stem cells on human liver progenitor HepaRG-derived acellular matrix. *Experimental cell research* **341**, 207-217 (2016).
23. Tiwari, A., *et al.* Expansion of Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells on Decellularized Matrix Scaffolds. *Current protocols in stem cell biology* **36**, 1C 15 11-11C 15 16 (2016).
24. Gattazzo, F., Urciuolo, A. & Bonaldo, P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et biophysica acta* **1840**, 2506-2519 (2014).
25. Bissell, M.J., Hall, H.G. & Parry, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of theoretical biology* **99**, 31-68 (1982).
26. Wang, Y., *et al.* Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* **53**, 293-305 (2011).
27. Vorotnikova, E., *et al.* Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **29**, 690-700 (2010).
28. Petersen, T.H., *et al.* Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science* **329**, 538-541 (2010).
29. Allen, R.A., *et al.* Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro. *Tissue engineering. Part A* **16**, 3363-3374 (2010).
30. Gilbert, T.W. Strategies for tissue and organ decellularization. *Journal of cellular biochemistry* **113**, 2217-2222 (2012).
31. Takebe, T., *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**, 481-484 (2013).
32. Vyas, D., *et al.* Self-assembled liver organoids recapitulate hepatobiliary organogenesis in vitro. *Hepatology* (2017).
33. Maher, J.J. & Bissell, D.M. Cell-matrix interactions in liver. *Seminars in cell biology* **4**, 189-201 (1993).
34. Mokhtari, S., *et al.* Evaluating Interaction of Cord Blood Hematopoietic Stem/Progenitor Cells with Functionally Integrated Three-Dimensional Microenvironments. *Stem cells translational medicine* **7**, 271-282 (2018).
35. Inamori, M., Mizumoto, H. & Kajiwara, T. An approach for formation of vascularized liver tissue by endothelial cell-covered hepatocyte spheroid integration. *Tissue engineering. Part A* **15**, 2029-2037 (2009).
36. Koestenbauer, S., Zisch, A., Dohr, G. & Zech, N.H. Protocols for hematopoietic stem cell expansion from umbilical cord blood. *Cell transplantation* **18**, 1059-1068 (2009).
37. Chivu, M., *et al.* The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine* **8**, 223-231 (2004).

38. da Silva, C.L., *et al.* A human stromal-based serum-free culture system supports the ex vivo expansion/maintenance of bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Experimental hematology* **33**, 828-835 (2005).
39. Madkaikar, M., Ghosh, K., Gupta, M., Swaminathan, S. & Mohanty, D. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells using different combinations of cytokines and stromal cells. *Acta haematologica* **118**, 153-159 (2007).
40. Robinson, S.N., *et al.* Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone marrow transplantation* **37**, 359-366 (2006).
41. Huang, G.P., *et al.* Ex vivo expansion and transplantation of hematopoietic stem/progenitor cells supported by mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Cell transplantation* **16**, 579-585 (2007).
42. Jang, Y.K., *et al.* Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Annals of hematology* **85**, 212-225 (2006).
43. Wang, J.F., *et al.* Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica* **89**, 837-844 (2004).
44. Zhang, Y., *et al.* Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. *Experimental hematology* **32**, 657-664 (2004).
45. Wang, Y., Yu, X., Chen, E. & Li, L. Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases. *Stem cell research & therapy* **7**, 71 (2016).
46. Khan, J.A., *et al.* Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science* **351**, 176-180 (2016).
47. Giarratana, M.C., *et al.* Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* **118**, 5071-5079 (2011).
48. Giarratana, M.C., *et al.* Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nature biotechnology* **23**, 69-74 (2005).
49. Leberbauer, C., *et al.* Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood* **105**, 85-94 (2005).
50. Fujimi, A., *et al.* Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *International journal of hematology* **87**, 339-350 (2008).
51. Timmins, N.E., Athanasas, S., Gunther, M., Buntine, P. & Nielsen, L.K. Ultra-high-yield manufacture of red blood cells from hematopoietic stem cells. *Tissue engineering. Part C, Methods* **17**, 1131-1137 (2011).
52. Migliaccio, A.R., Rana, R.A., Vannucchi, A.M. & Manzoli, F.A. Role of GATA-1 in normal and neoplastic hemopoiesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1044**, 142-158 (2005).
53. Back, J., Dierich, A., Bronn, C., Kastner, P. & Chan, S. PU.1 determines the self-renewal capacity of erythroid progenitor cells. *Blood* **103**, 3615-3623 (2004).
54. Tian, C., Gregoli, P. & Bondurant, M. The function of the bcl-x promoter in erythroid progenitor cells. *Blood* **101**, 2235-2242 (2003).
55. Quang, C.T., Pironin, M., von Lindern, M., Beug, H. & Ghysdael, J. Spi-1 and mutant p53 regulate different aspects of the proliferation and differentiation control of primary erythroid progenitors. *Oncogene* **11**, 1229-1239 (1995).
56. Kosmider, O., *et al.* Kit-activating mutations cooperate with Spi-1/PU.1 overexpression to promote tumorigenic progression during erythroleukemia in mice. *Cancer cell* **8**, 467-478 (2005).
57. Coppola, J.A. & Cole, M.D. Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukemia cell differentiation but not commitment. *Nature* **320**, 760-763 (1986).

58. Nakamura, Y., Hiroshima, T., Miharada, K. & Kurita, R. Red blood cell production from immortalized progenitor cell line. *International journal of hematology* **93**, 5-9 (2011).
59. Hiroshima, T., *et al.* Establishment of mouse embryonic stem cell-derived erythroid progenitor cell lines able to produce functional red blood cells. *PLoS one* **3**, e1544 (2008).
60. Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R. & Thomson, J.A. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10716-10721 (2001).
61. Vodnyanik, M.A., Bork, J.A., Thomson, J.A. & Slukvin, I.I. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* **105**, 617-626 (2005).
62. Qiu, C., *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Experimental hematology* **33**, 1450-1458 (2005).
63. Chadwick, K., *et al.* Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* **102**, 906-915 (2003).
64. Mazurier, C., Douay, L. & Lapillonne, H. Red blood cells from induced pluripotent stem cells: hurdles and developments. *Current opinion in hematology* **18**, 249-253 (2011).
65. Baptista, P.M., *et al.* Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference* **2009**, 6526-6529 (2009).
66. Baptista, P.M., *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* **53**, 604-617 (2011).
67. Takebe, T., *et al.* Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature protocols* **9**, 396-409 (2014).
68. Schor, A.M., Schor, S.L. & Allen, T.D. Effects of culture conditions on the proliferation, morphology and migration of bovine aortic endothelial cells. *Journal of cell science* **62**, 267-285 (1983).
69. Chou, S. & Lodish, H.F. Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7799-7804 (2010).
70. Kumar, S. & Geiger, H. HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends in molecular medicine* **23**, 799-819 (2017).
71. Calvi, L.M., *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
72. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G. & Morrison, S.J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-462 (2012).
73. Winkler, I.G., *et al.* Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **116**, 4815-4828 (2010).
74. Taichman, R.S. & Emerson, S.G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1677-1682 (1994).
75. Butler, J.M., *et al.* Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* **6**, 251-264 (2010).
76. Poulos, M.G., *et al.* Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis. *Cell reports* **4**, 1022-1034 (2013).
77. Arai, F., *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149-161 (2004).
78. Yang, S., Graham, J., Kahn, J.W., Schwartz, E.A. & Gerritsen, M.E. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *The American journal of pathology* **155**, 887-895 (1999).

79. Siemerink, M.J., *et al.* CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis* **15**, 151-163 (2012).
80. Delia, D., *et al.* CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* **81**, 1001-1008 (1993).
81. van Beijnum, J.R., van der Linden, E. & Griffioen, A.W. Angiogenic profiling and comparison of immortalized endothelial cells for functional genomics. *Experimental cell research* **314**, 264-272 (2008).
82. Bobis, S., Jarocho, D. & Majka, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia histochemica et cytobiologica* **44**, 215-230 (2006).
83. Yamazaki, S., *et al.* Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **147**, 1146-1158 (2011).
84. Zhao, M., *et al.* Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* **20**, 1321-1326 (2014).
85. Lv, F.J., Tuan, R.S., Cheung, K.M. & Leung, V.Y. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells* **32**, 1408-1419 (2014).
86. Gerlach, J.C., *et al.* Perivascular mesenchymal progenitors in human fetal and adult liver. *Stem cells and development* **21**, 3258-3269 (2012).
87. Mayani, H., Guilbert, L.J. & Janowska-Wieczorek, A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *European journal of haematology* **49**, 225-233 (1992).
88. Scadden, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* **441**, 1075-1079 (2006).
89. Morrison, S.J. & Spradling, A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598-611 (2008).
90. Nagasawa, T., Omatsu, Y. & Sugiyama, T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends in immunology* **32**, 315-320 (2011).
91. Ding, L. & Morrison, S.J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231-235 (2013).
92. Wagner, W., *et al.* Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem cells* **25**, 2638-2647 (2007).
93. Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.A., Sackstein, R. & Down, J.D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5431-5436 (2007).
94. Emery, J.L. Functional Asymmetry of the Liver. *Annals of the New York Academy of Sciences* **111**, 37-44 (1963).
95. Lind, J. Changes in the Liver Circulation at Birth. *Annals of the New York Academy of Sciences* **111**, 110-120 (1963).
96. Yoon, S.M., *et al.* Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* **53**, 964-973 (2011).

APÉNDICE

Estudio proteómico

Tubulointerstitial nephritis antiqen like 1

Se trata de una glucoproteína procedente de la ECM la cual es conocida por jugar un papel importante en la adhesión celular y en la interacción con receptores celulares¹, así como con otras proteínas de la ECM como la LN, COL y FN. Recientemente, se ha conocido que la expresión de esta proteína podría jugar un papel importante en mujeres con preeclampsia².

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Myeloid derived growth factor

Inicialmente se pensó que la función de esta proteína era la de sustentar la proliferación de las células linfoides, por lo que se consideró una interleuquina. Sin embargo, recientemente le ha sido atribuida la función paracrina de reparación tisular y función cardíaca³. Sintetizada por monocitos y macrófagos de la MO, promueve la supervivencia y la angiogénesis de los miocitos cardíacos tras un infarto de miocardio³.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Azurocidin

Se trata de una glucoproteína con actividad antimicrobiana de amplio espectro y actividad quimiotáctica sobre los monocitos y macrófagos, sintetizada durante la etapa promielocítica del desarrollo de los neutrófilos⁴. Sin embargo, pronto se hizo evidente que esta proteína, al igual que otras proteínas antimicrobianas, era capaz no solo de ejercer actividad microbiana sino que además era capaz de modular la función inmune. Se encuentra almacenada tanto en vesículas secretoras como en gránulos primarios, de esta manera es liberada durante la extravasación de los leucocitos polimorfonucleares en el lugar de la inflamación⁵.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis hepática fetal.

EMILIN-1 y Multimerin-2

El dominio EMI es un pequeño dominio rico en cisteínas. Se encuentra preferentemente en el extremo N terminal de proteínas extracelular que son compatibles con la formación de multímeros y un C-terminal globular (C1q)⁶.

EMILIN-1 y *Multimerin-2* son dos glicoproteínas homotriméricas que se ensamblan en multímeros de gran peso molecular. Se expresan predominantemente en la ECM y contribuyen a diferentes funciones celulares gracias a la asociación a otros dominios C1q⁷.

EMILIN-1 es una glucoproteína de la ECM perteneciente a la familia C1q/TNF⁸, la cual está probablemente implicada en la deposición de la EL⁶. Forma una red fibrillas en la ECM en cultivos *in vitro* y en la matriz de varios tejidos, codistribuyéndose con la EL en la mayoría de los sitios⁸. Se le ha atribuido también actividad proadhesiva tanto a líneas celulares hematopoyéticas como no hematopoyéticas^{7,9}.

Por su parte, *Multimerin-2* ha sido encontrada a lo largo de los vasos sanguíneos, en proximidad a las EC, tanto en vasculaturas normales como tumorigénicas. Además, contribuye a la homeostasis del mantenimiento de los vasos sanguíneos mediante su implicación en el sistema VEGF-A/VEGFR2. Recientemente, se ha descubierto la implicación de esta proteína en la regulación de la activación plaquetaria, la formación de trombos y la retracción del coágulo¹⁰.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de estas proteínas sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Lectin, mannose binding 2

Esta una proteína perteneciente al grupo de las colectinas, un subgrupo de lectinas. Es producida por el hígado y juega un importante papel en el sistema inmunitario innato de los mamíferos. Reconoce residuos de manosa y n-acteilglucosamina situados en las membranas de numerosos microorganismos, favoreciendo su eliminación por fagocitosis gracias a la activación del complemento^{11,12}. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la unión al complemento desempeña un papel fundamental en la movilización de las HSC y HSPC desde la BM a la PB¹³.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis hepática fetal.

High mobility group protein B2

Se trata de una proteína multifunción. En el compartimento extracelular actúa como un potente antimicrobiano¹⁴ y como una quimioquina, ya que promueve la proliferación y migración de las EC¹⁵.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Collagen type XIV alpha 1 chain y Collagen type XXI alpha 1 chain

El *Collagen* es la proteína estructural más abundante en mamíferos. Se encuentra presente en el espacio extracelular de diversos tejidos conectivos y conjuntivos como la piel, las articulaciones y los huesos. Esta superfamilia comprende un total de 28 miembros ordenados en números romanos (I-XXVIII), cuya estructura está formada por una triple hélice homo o heterotrípica¹⁶. Ambas proteínas pertenecen al grupo de COL asociados a fibrillas con triple hélices interrumpidas. Estas proteínas parecen conectar las fibrillas de COL a otros componentes o células de la matriz¹⁷. El *Collagen type XIV alpha 1 chain* se encuentra en asociación con el *Collagen I* de la piel, tendones, pulmones, hígado, placenta y de las paredes de los vasos. Además, participa en la regulación de la fibrillogénesis¹⁸. En 1998 se demostró la presencia de esta proteína sobre la BM humana la cual era capaz de adherirse, lo más probable, mediante receptores compuesto por proteoglicanos de heparansulfato a poblaciones definidas de células hematopoyéticas¹⁹. El *Collagen type XXI alpha 1 chain* es secretada a la ECM de las paredes de los vasos sanguíneos por parte de las células del músculo liso. Se encarga de contribuir al ensamblaje de la ECM de la red vascular durante la formación de los vasos sanguíneos²⁰.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Fibrillin 2

Glucoproteína secretada a la ECM donde se une a otras proteínas para formar filamentos filamentosos llamados microfibrillas. Esta proteína se produce durante el desarrollo y remodelación tisular^{21,22}.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Microfibril associated protein 2

Se trata de una glucoproteína perteneciente a la familia *microfibril-associated glycoproteins* la cual se asocia covalentemente con las microfibrillas y posee capacidad para interactuar con los factores de crecimiento de la familia TGF- β y Notch²³⁻²⁵. Se ha puesto de manifiesto que esta proteína podría tener funciones discretas en la hematopoyesis, ya que la pérdida de la proteína no solo altera significativamente la masa ósea y su arquitectura, sino que ratones deficientes para esta proteína son neutropénicos²⁶.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Kynurenine aminotransferase 1 y Kynurenine aminotransferase 3

Estas enzimas catalizan la síntesis del ácido quinurénico. Niveles anormales de estas enzimas en cerebros humanos, están asociados a esquizofrenia, Alzheimer y otros trastornos neurológicos²⁷.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis hepática fetal.

Elastase, neutrophil expressed

Serín proteasa sintetizada por neutrófilos cuya función es la de hidrolizar proteínas tanto dentro de los lisosomas como en la ECM. Jassinskaja *et al.* encontraron una fuerte expresión de varias serín proteasas por parte de las HSPC adultas en comparación con las fetales, donde actuaba como un regulador negativo de la producción de neutrófilos en las HSPC fetales²⁸. En la etapa promielocítica del desarrollo estas proteínas son sintetizadas en gránulos primarios donde sus principales funciones son las de

eliminación de patógenos intracelulares y la degradación tisular en sitios de inflamación^{29,30}. Sin embargo, esta alta expresión era aún más notoria en las ST-HSC que en las LT-HSC, como consecuencia de una mayor presencia de progenitores ya que promiilocitos son más frecuentes en el FL que en la BM³¹.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Aromatic-L-amino-acid decarboxylase

Se trata de una enzima liasa, la cual cataliza diversas reacciones de descarboxilación.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Asporin

Pertenece a la misma familia de proteoglicanos ricos en leucina que *biglycan* y *decorin*³². A diferencia de otros miembros de la familia, carece de un sitio de unión a los glicosaminoglicanos, por lo que, no es un proteoglicano estricto³³. Está presente en muchos tejidos humanos como la aorta, útero corazón o hígado. Al igual que la *decorin*, esta proteína se une directamente al TGF- β y al COL³⁴.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Nephronectin

Se trata de una proteína perteneciente a la ECM que inicialmente se identificó en el desarrollo embrionario de los riñones³⁵, sin embargo, posee un papel importante en el desarrollo y función de otros tejidos como los pulmones, hígado, huesos y músculo. Inagaki *et al.* mostraron como la expresión de esta proteína se encuentra elevada en modelos murinos tanto de hepatitis aguda como crónica, donde ésta era principalmente secretada principalmente por MSC y, en menor medida, por colangiocitos³⁶. Sin embargo, la expresión ectópica por parte de los hepatocitos conlleva al reclutamiento de células T CD4⁺ o células NKT en los focos de inflamación³⁶.

Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

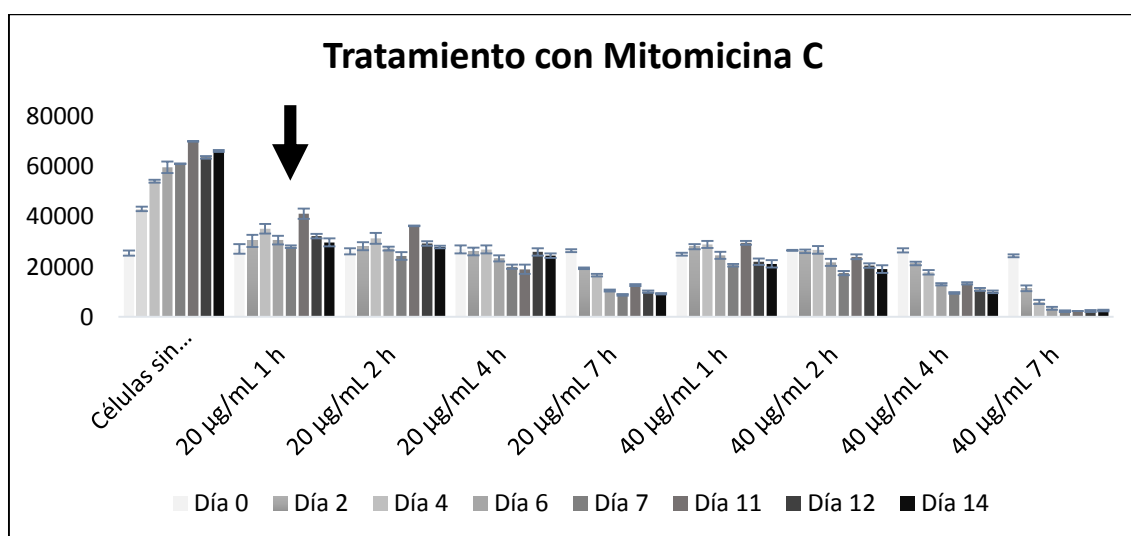
Latent transforming growth factor beta binding protein 1

Se trata de una proteína secretada perteneciente a la familia de proteínas transportadoras *latent transforming growth factor beta binding protein*. Interactúa con una gran variedad de proteínas de la ECM y juega un papel importante en la regulación de la biodisponibilidad de TGF- β . *Latent transforming growth factor beta binding protein* y *fibrillins* son moléculas con una alta homología, donde la colocalización de ambas ha sido descrita en cultivos celulares. Isogai *et al.* demostraron que se trata de una proteína asociada a la fibrilina presente en ciertos tejidos³⁷. Recientemente, se ha propuesto un nuevo papel de esta proteína como biomarcador para diferenciar el carcinoma hepatocelular de una hepatitis crónica³⁸.

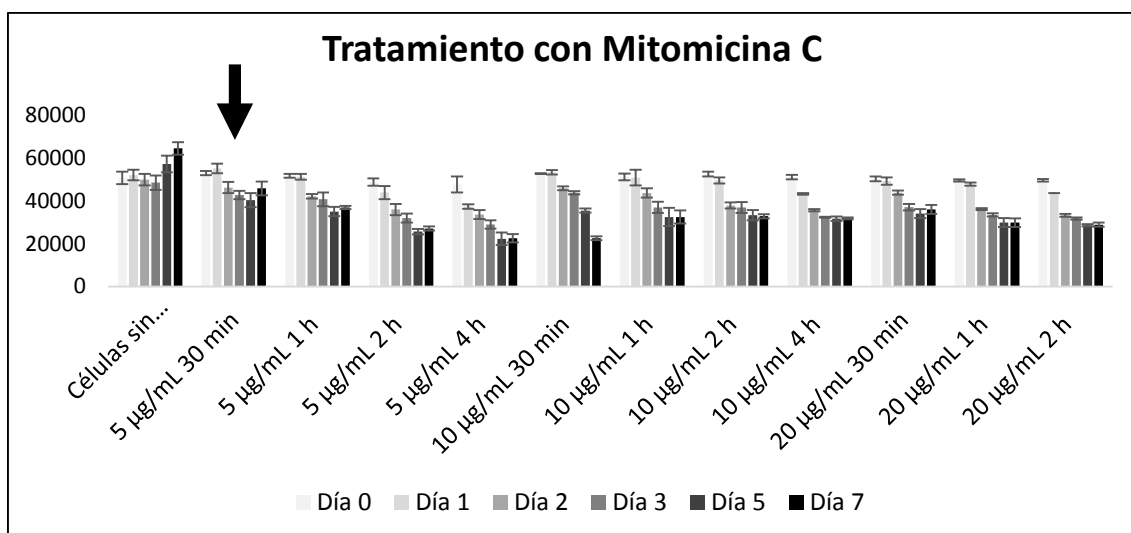
Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito ningún papel de esta proteína sobre la hematopoyesis fetal.

Inactivación celular

Las HpFEC se inactivaron con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Mitomicina C durante 1 h de Mitomicina C y las hUVEC con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30 min (Gráfica 1 y 2).



Gráfica 1: Tratamiento de las HpFEC con Mitomicina C.



Gráfica 2: Tratamiento de las hUVEC con Mitomicina C.

Integridad del RNA

Para verificar y comprobar la integridad y calidad del RNA; las muestras se cargaron en un chip comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, 700-7103).

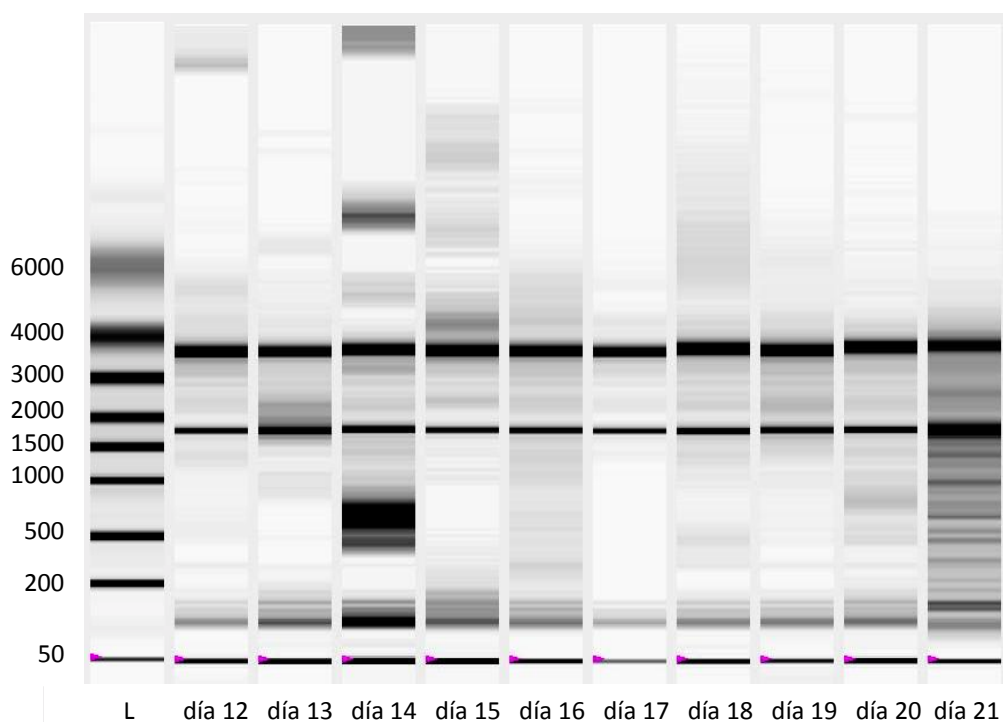


Figura 1: Integridad del RNA.

El Chip Experion™ de Bio-Rad no solo ofrece la concentración del RNA y el ratio 28S:18S sino además, sino que también es un indicador de la calidad del RNA (RQI). De este modo, ratios con valor de 10 corresponden a una muestra intacta de RNA, mientras que valores de 1 muestra degradación total del RNA. Por lo que valores con un RQI > 7 se consideraron aceptables, tal y como indica el fabricante. Como se muestra en la Tabla 1, todas las muestras de RNA resultaron óptimas. La integridad y la calidad del RNA se muestra en la Figura 1, donde se observan dos bandas correspondientes a los ácidos ribonucleicos ribosómicos (rRNA) 28S y 18S. El tamaño de los rRNA 28S y 18S de mamífero poseen un tamaño de aproximadamente 5 kb y 2 kb, por lo que el ratio teórico 28S:18S es alrededor de 2,7: 1; sin embargo, una relación de 2:1 es considerada aceptable.

Muestra	Ratio [28S:18S]	RQI
Día 12	2,41	9,8
Día 13	2,20	9,4
Día 14	1,15	9,5
Día 15	1,20	7,0
Día 16	2,27	9,8
Día 17	1,70	8,5
Día 18	2,01	10,0
Día 19	1,73	9,2
Día 20	1,49	9,6
Día 21	1,65	8,1

Tabla 1: Ratios [28S:18S] y RQI de las muestras.

Caracterización de los HB derivados de las ES4

La pluripotencia de las células se comprobó mediante la expresión de los marcadores de pluripotencia Oct4 y Rex1 (Figura 2).

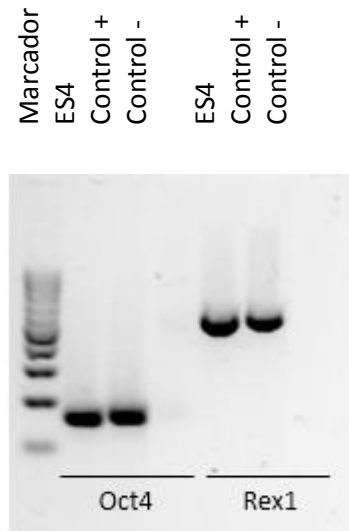


Figura 2: Pluripotencia de las ES4. Control positivo: H1, Control negativo: hUVEC.

Bibliografía

1. Li, D., *et al.* Adrenocortical zonation factor 1 is a novel matricellular protein promoting integrin-mediated adhesion of adrenocortical and vascular smooth muscle cells. *The FEBS journal* **274**, 2506-2522 (2007).
2. Mary, S., Kulkarni, M.J., Mehendale, S.S., Joshi, S.R. & Giri, A.P. Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 protein is downregulated in the placenta of pre-eclamptic women. *Clinical proteomics* **14**, 8 (2017).
3. Korf-Klingebiel, M., *et al.* Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nature medicine* **21**, 140-149 (2015).
4. Almeida, R.P., *et al.* Azurocidin, a natural antibiotic from human neutrophils: expression, antimicrobial activity, and secretion. *Protein expression and purification* **7**, 355-366 (1996).
5. Tapper, H., Karlsson, A., Morgelin, M., Flodgaard, H. & Herwald, H. Secretion of heparin-binding protein from human neutrophils is determined by its localization in azurophilic granules and secretory vesicles. *Blood* **99**, 1785-1793 (2002).
6. Doliana, R., Bot, S., Bonaldo, P. & Colombatti, A. EMI, a novel cysteine-rich domain of EMILINs and other extracellular proteins, interacts with the gC1q domains and participates in multimerization. *FEBS letters* **484**, 164-168 (2000).
7. Colombatti, A., *et al.* The EMILIN/Multimerin family. *Frontiers in immunology* **2**, 93 (2011).
8. Bressan, G.M., *et al.* Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *The Journal of cell biology* **121**, 201-212 (1993).
9. Doliana, R., *et al.* EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**, 16773-16781 (1999).
10. Huang, M., *et al.* EMILIN2 regulates platelet activation, thrombus formation, and clot retraction. *PLoS one* **10**, e0115284 (2015).
11. Turner, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology today* **17**, 532-540 (1996).
12. Thiel, S., *et al.* A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* **386**, 506-510 (1997).
13. Adamiak, M., *et al.* Novel evidence that the mannan-binding lectin pathway of complement activation plays a pivotal role in triggering mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells by activation of both the complement and coagulation cascades. *Leukemia* **31**, 262-265 (2017).
14. Kuchler, R., Schroeder, B.O., Jaeger, S.U., Stange, E.F. & Wehkamp, J. Antimicrobial activity of high-mobility-group box 2: a new function to a well-known protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 4782-4793 (2013).
15. Wang, W., *et al.* Overexpression of high mobility group box 1 and 2 is associated with the progression and angiogenesis of human bladder carcinoma. *Oncology letters* **5**, 884-888 (2013).
16. Ricard-Blum, S. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a004978 (2011).
17. Gogiel, T. & Bankowski, E. [New collagenous proteins: FACIT collagens, transmembrane collagens and multiplexins]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* **55**, 133-156 (2001).
18. Ansoorge, H.L., *et al.* Type XIV Collagen Regulates Fibrillogenesis: PREMATURE COLLAGEN FIBRIL GROWTH AND TISSUE DYSFUNCTION IN NULL MICE. *The Journal of biological chemistry* **284**, 8427-8438 (2009).

19. Klein, G., *et al.* Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **16**, 307-317 (1998).
20. Chou, M.Y. & Li, H.C. Genomic organization and characterization of the human type XXI collagen (COL21A1) gene. *Genomics* **79**, 395-401 (2002).
21. Quondamatteo, F., *et al.* Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **21**, 637-646 (2002).
22. Zhang, H., Hu, W. & Ramirez, F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *The Journal of cell biology* **129**, 1165-1176 (1995).
23. Gibson, M.A., Finnis, M.L., Kumaratilake, J.S. & Cleary, E.G. Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2) is specifically associated with fibrillin-containing microfibrils but exhibits more restricted patterns of tissue localization and developmental expression than its structural relative MAGP-1. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **46**, 871-886 (1998).
24. Hanssen, E., Hew, F.H., Moore, E. & Gibson, M.A. MAGP-2 has multiple binding regions on fibrillins and has covalent periodic association with fibrillin-containing microfibrils. *The Journal of biological chemistry* **279**, 29185-29194 (2004).
25. Mecham, R.P. & Gibson, M.A. The microfibril-associated glycoproteins (MAGPs) and the microfibrillar niche. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **47**, 13-33 (2015).
26. Combs, M.D., *et al.* Microfibril-associated glycoprotein 2 (MAGP2) loss of function has pleiotropic effects in vivo. *The Journal of biological chemistry* **288**, 28869-28880 (2013).
27. Han, Q., Cai, T., Tagle, D.A. & Li, J. Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**, 353-368 (2010).
28. Jassinskaja, M., *et al.* Comprehensive Proteomic Characterization of Ontogenic Changes in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell reports* **21**, 3285-3297 (2017).
29. Eyles, J.L., Roberts, A.W., Metcalf, D. & Wicks, I.P. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature clinical practice. Rheumatology* **2**, 500-510 (2006).
30. Pham, C.T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **6**, 541-550 (2006).
31. Cabezas-Wallscheid, N., *et al.* Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell stem cell* **15**, 507-522 (2014).
32. Lorenzo, P., *et al.* Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan. *The Journal of biological chemistry* **276**, 12201-12211 (2001).
33. Xu, L., Li, Z., Liu, S.Y., Xu, S.Y. & Ni, G.X. Asporin and osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* **23**, 933-939 (2015).
34. Kalamajski, S. & Oldberg, A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **29**, 248-253 (2010).
35. Brandenberger, R., *et al.* Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin alpha8beta1 in the embryonic kidney. *The Journal of cell biology* **154**, 447-458 (2001).
36. Inagaki, F.F., *et al.* Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochemical and biophysical research communications* **430**, 751-756 (2013).

37. Isogai, Z., *et al.* Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2750-2757 (2003).
38. Cao, B., *et al.* Latent transforming growth factor-beta binding protein-1 in circulating plasma as a novel biomarker for early detection of hepatocellular carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology* **8**, 16046-16054 (2015).