

CARACTERIZACIÓN DE MEGACARIOCITOS HUMANOS DERIVADOS DE PRECURSORES DE MÉDULA ÓSEA, Y OBTENCIÓN DE SUS TRANSCRIPTOMAS. ANÁLISIS DE CD34, CD41 Y CD61.

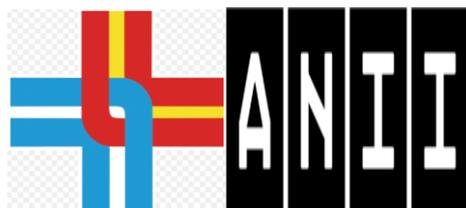
MSc. Gerardo Romanelli

Bajo la orientación de:

Dra. Adriana Mimbacas

Dra. Silvia Olivera – Bravo

Dr. Gustavo Folle



Tesis Doctoral
Montevideo, Noviembre 2017

Agradecimientos:

- Al programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) de la Universidad de la República (UdelaR), en cuyo marco académico se desarrolló la siguiente Tesis de Doctorado.
- A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la Beca de Doctorado concedida bajo el código POS_NAC_2013_1_11969.
- Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y a la Asociación Española Primera en Salud (AEPS), en cuyos laboratorios se desarrolló la presente Tesis.
- A la Dra. Adriana Mimbacas, orientadora de esta Tesis, por aceptar dicha responsabilidad y dar el respaldo e impulso necesarios para la realización de la misma.
- A los Dres. Gustavo Folle y Silvia Olivera, co-orientadores de la presente Tesis, por asumir dicha responsabilidad y colaborar en el desarrollo brindando soluciones precisas para los problemas metodológicos presentados a lo largo de la misma.
- A los miembros del Tribunal Dras. Mónica Brauer, María Vittoria Di Tomaso y Andrea Cristiani por aceptar la evaluación de la siguiente Tesis y brindar sus acertados aportes.
- Al Dr. Roberto Pozner del Laboratorio Trombosis Experimental de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina por las contribuciones en relación al cultivo celular de megacariocitos.
- Al Dr. Ricardo Benavente y a la MSc. Irene Da Cruz del Department of Cell and Developmental Biology Biocenter de la Universidad de Würzburg, Alemania gracias a quienes se pudieron obtener las imágenes de alta resolución utilizando la plataforma de microscopía de iluminación estructural.
- Al Servicio de Medicina Transfusional de la AEPS, de dónde se obtuvieron las muestras para la realización de la investigación en esta Tesis.

- A las Dras. Rossana Bonomi, María de los Ángeles Novoa e Isabel Moro, por sus continuos aportes en el campo hematológico, y brindar siempre su certero enfoque crítico.
- Al Dr. Hugo Giordano, por su orientación técnica y por su experiencia e incondicional apoyo en lo relativo a resolución de problemas en Citometría de Flujo Hematológica.
- A la MSc. Lucía Veiga y a la Lic. Noelia García quienes con destacable amabilidad han colaborado en la adquisición de datos por Citometría de Flujo en la AEPS.
- A mis hermanos Marcelo y Fabián, mis cuñadas Verónica y Fabiana y a la nueva generación Romanelli, Luca, Lucía y Chiara quienes me han y me siguen brindando apoyo y cariño.
- A mis amigos, Alejandra, Ricardito, Mariana, Alejandrita, Paola, Isabel, Rosa, Irene, Jair, Laura, Débora, Fernando, Acacia, Sergio, Rubén, Silvia y muchos más, quienes me acompañan y me seguirán acompañando a lo largo de la vida.
- A Uma y Juan quienes me acompañan día a día en esta maravillosa travesía que es la vida.
- Y a las numerosas personas que brindaron su conocimiento y apoyo incondicional para concluir esta Tesis.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
I.- INTRODUCCIÓN	11
I.1 Hematopoyesis	11
I.2 Células madre hematopoyéticas	12
I.3 Antígeno de membrana CD34	15
I.4 Megacariopoyesis y Trombopoyesis	17
I.4.1 Megacariocitos	19
I.4.2 Plaquetas	23
I.4.3 Factores implicados en la megacariopoyesis y la trombopoyesis	25
I.5 Marcadores específicos de megacariocitos y plaquetas	26
II.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	29
III.- OBJETIVOS	30
III.1 Objetivo general	30
III.2 Objetivos específicos	30
IV.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
IV.1 Cultivos celulares de megacariocitos	31
IV.2 Megacariocitos y citometría de flujo	33
IV.3 Análisis citomorfológico	34
IV.4 Secuenciación masiva	36
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	37

V.1 Medios de cultivo, soluciones y anticuerpos	37
V.1.1 Medios de cultivo celular y estimulantes	37
V.1.2 Soluciones, tampones y reactivos	37
V.1.3 Anticuerpos	40
V.2 Métodos	42
V.2.1 Obtención de muestras y consideraciones éticas	42
V.2.2 Purificación, conteo y viabilidad de precursores CD34+	43
V.2.3 Cultivos celulares de megacariocitos	44
V.2.4 Análisis de la diferenciación megacariocítica	45
V.2.4.1 Preparación de muestras y adquisición de imágenes con microscopía óptica de luz (MOL)	45
V.2.4.2 Inmunocitoquímica, citoquímica y adquisición de imágenes con microscopía láser confocal (MLC)	45
V.2.4.3 Inmunocitoquímica y adquisición de imágenes con <i>Structural Illumination Microscopy</i> (SIM)	46
V.2.4.4 Preparación de muestras y adquisición de imágenes con microscopía de fuerza atómica (MFA)	47
V.2.5 Análisis de la pureza de los cultivos celulares mediante citometría de flujo	47
V.2.6 Obtención de ARN	48
V.2.7 Evaluación del ARN obtenido	49
V.2.8 Secuenciación masiva por NGS	49
V.2.9 Análisis de datos	50
VI.- RESULTADOS	51
VI.1 Puesta a punto de las técnicas a utilizar para la caracterización de MKs en pacientes con patologías extrahematopoyéticas	

y con SMD 5q- aislado	51
VI.1.1 Análisis citomorfológico de MKs obtenidos de aspirados y biopsias de médula ósea	51
VI.1.2 Inmunocitoquímica con marcadores específicos de la megacariopoyesis	52
VI.1.3 Citoquímica para el análisis del citoesqueleto	54
VI.2 Purificación de precursores hematopoyéticos	56
VI.3 Obtención de MKs por diferenciación de células CD34+	57
VI.4 Caracterización de los cultivos celulares de megacariocitos	58
VI.4.1 May Grünwald-Giemsa	58
VI.4.2 Análisis de la expresión de CD34	61
VI.4.3 Análisis de la expresión de CD41 y CD61	63
VI.4.4 Cuantificación utilizando citometría de flujo	66
VI.4.5 Análisis de CD34 y el citoesqueleto en el día 3	67
VI.4.6 Análisis de CD34 en el día 5	69
VI.5 Análisis de la pureza de los cultivos celulares de megacariocitos	70
VI.6 Evaluación del ARN extraído	71
VI.7 Obtención de los transcriptomas utilizando NGS y análisis de los datos brutos	72
VII.- DISCUSIÓN	77
VIII.- CONCLUSIONES	83
IX.- PERSPECTIVAS	85
BIBLIOGRAFÍA	87

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-Aminoactinomicina D

Ac: Anticuerpo.

BSA: Seroalbúmina Bovina.

CD (*cluster of differentiation*): Grupo de diferenciación. Ej: CD34, CD41, CD61.

CMH: Células madre hematopoyéticas.

CU: Cordón umbilical.

EDTA: (Ethylenediaminetetraacetic acid): Ácido etilendiaminotetraacético.

FITC (*Fluorescein IsoThioCyanate*): Isotiocianato de fluoresceína.

GP: Glicoproteína.

HLA: Antígeno de leucocitos humanos.

ISHAGE: International Society for Hematotherapy and Graft Engineering.

MK, MKs: Megacariocito, megacariocitos.

MO: Médula ósea.

PE: Ficoeritrina.

PerCP (*PERidinin Chlorophyll Protein*): Proteína peridina clorofila.

SMD: Síndrome mielodisplásico.

SP: Sangre periférica.

SPM: Sangre periférica movilizada.

SFB: Suero Fetal Bovino.

TPO: Trombopoyetina.

VEs: Vesículas extracelulares.

RESUMEN

Los megacariocitos (MKs) son las células responsables de la producción de plaquetas, células sin núcleo con diversidad de funciones. Para producir plaquetas, los MKs sufren un proceso de diferenciación y maduración, en el cual las divisiones nucleares no son seguidas de las correspondientes divisiones citoplasmáticas. En consecuencia se producen células poliploides multinucleadas de gran tamaño como resultado de la expansión del citoplasma celular. Esto se consigue mediante un proceso denominado endomitosis, en donde los MKs son los únicos en utilizar este mecanismo como estructura funcional normal. La endomitosis es una variedad de endoduplicación, proceso observado frecuentemente en las células neoplásicas; donde muchos de los mecanismos implicados en estos procesos son desconocidos. Como producto de la formación y organización de husos mitóticos multipolares, existe una segregación asimétrica y asincrónica de los cromosomas en cada núcleo. Todo esto conlleva a que el MK sea un modelo particular de estudio.

La relativa escasez de MKs en la médula ósea (MO) (0.03-0.05%) ha dificultado su estudio *in vivo*, por lo que ha sido necesaria la implementación de metodologías de amplificación *in vitro* como son los cultivos celulares a partir de precursores CD34+. CD34 es una glicoproteína de membrana presente en precursores hemato como extrahematopoyéticos. CD41 y CD61 componen el complejo IIIa/IIIb presente en la superficie de los MKs y las plaquetas. En la megacariopoyesis la pérdida de CD34 y la adquisición de algunos complejos proteicos como CD41/CD61 indican la diferenciación y maduración de los MKs. La desaparición de CD34 en los progenitores megacariocíticos se asocia a una

transición de una fase proliferativa a una no proliferativa, proceso crucial de las células madre. Sin embargo, la forma en que CD34 deja de expresarse es mayormente desconocida.

Este trabajo propone profundizar en el conocimiento de los cambios citomorfológicos durante la megacariopoyesis humana, y en la expresión de CD34, CD41, CD61. Se estudiará además, el comportamiento del citoesqueleto celular. Para alcanzar los objetivos propuestos se pusieron a punto las técnicas que permitieran el reconocimiento de los MKs utilizando aspirados y biopsias de MO de pacientes con patologías extrahematopoyéticas y con Síndrome Mielodisplásico 5q- aislado. Posteriormente, se realizaron cultivos celulares de poblaciones enriquecidas de células CD34+ en medio de cultivo libre de suero, de cinco donantes humanos sanos en presencia de trombopoyetina humana. El desarrollo de la megacariopoyesis se analizó desde el primer día hasta el día 14 mediante el uso de diferentes aproximaciones microscópicas y citometría de flujo. Por último se realizó la extracción del ARN de los MKs obtenidos de 3 de los 5 donantes y se realizó la secuenciación masiva por *Next Generation Sequencing* (NGS).

Al día 3 de iniciado el cultivo un gran porcentaje de células ($\bar{x}=55\%$) presentaban una estructura peculiar a la cual denominamos como protrusión. Esta estructura fue detectada en un porcentaje mayor ($\bar{x}=85\%$) en el día 5, donde fue registrado el pico máximo. Dichas protrusiones dejaron de ser tan evidentes a partir del día 7 y hasta el final de los cultivos. Un hallazgo novedoso fue constatar la colocalización de la protrusión con la señal de CD34, de tal manera que en el día 3 la marcación de CD34 se visualizaba en toda la

célula y en la protrusión. En cambio, al día 5 la señal de CD34 se visualizaba exclusivamente en la protrusión y al día 7 prácticamente desaparecía la señal junto con la protrusión. Se evidenció, también, un rearrreglo en la actina F del citoesqueleto la cual aparentemente soportaba esta estructura.

Es la primera vez en nuestro país que: a) se realizaron cultivos celulares de MKs humanos obtenidos de precursores de MO, b) se analizó la diferenciación megacariocítica utilizando citometría de flujo.

Es de destacar que es la primera vez que se reporta: a) asociación entre una prolongación de precursores hematopoyéticos con un antígeno de membrana; b) que se analizan algunos estadios de la megacariopoyesis utilizando microscopía de fuerza atómica; y c) que se obtuvieron datos de secuenciación masiva de MKs humanos.

Hemos demostrado que durante la megacariopoyesis CD34 es eliminado de la membrana celular mediante un proceso muy peculiar el cual requiere profundizar en su conocimiento para determinar su relevancia biológica.

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- HEMATOPOYESIS

Todos los componentes sanguíneos deben mantener una concentración y número óptimo para que los procesos biológicos puedan llevarse a cabo de manera eficiente. Cualquier alteración se manifiesta en un incorrecto funcionamiento de alguna estructura u órgano, como también en la expresión de diversas patologías de variada etiología. La hematopoyesis, que literalmente significa fabricación o producción de células sanguíneas, es el mecanismo fisiológico responsable de la formación continuada de los distintos tipos de elementos formes de la sangre; permitiendo mantener una fórmula sanguínea dentro de los parámetros normales a lo largo de toda la vida del individuo (Florensa et al., 2001). Se estima que un individuo sano adulto produce por día aproximadamente 10^{11} - 10^{12} células, pudiendo aumentar los niveles cuando aumenta la demanda sanguínea. La necesidad de producir a diario las ingentes cantidades de células en la médula ósea (MO) a la misma velocidad que se destruyen (principalmente en el bazo) para mantener la homeostasis es sorprendente. Este proceso constituye uno de los paradigmas biológicos de la diferenciación celular de modo que a partir de un único tipo de célula madre se originan más de diez linajes sanguíneos. Una pequeña población de células progenitoras mantiene la hematopoyesis durante toda la vida del individuo adulto, ya que las células maduras suelen tener una vida media reducida. (Orkin y Zon, 2002; Rieger y Schroeder, 2012).

En los mamíferos, durante la etapa embrionaria y fetal, el sistema hematopoyético se desarrolla en diferentes localizaciones anatómicas. Posteriormente, se desarrolla la hematopoyesis extraembrionaria en la cual las células madre hematopoyéticas (CMH) se forman a partir del saco vitelino y en este período, la hematopoyesis se caracteriza por quedar restringida a la serie eritroide. A partir de la semana 11 de la gestación en humanos se instaura la hematopoyesis medular, el cual es el órgano hematopoyético definitivo. Se puede considerar a la MO como un tejido blando contenido en un estuche óseo que cede células hematopoyéticas maduras a la circulación según una pauta adecuada. La mayoría de estas células completan su maduración en el árbol vascular o en los tejidos. En el humano adulto la hematopoyesis normal está regulada por mecanismos de gran complejidad, en los cuales las células interactúan entre sí, con su microambiente, con factores de crecimiento y con la matriz extracelular (Florensa et al., 2001; Rieger y Schroeder, 2012).

Se sabe que existe una célula madre pluripotente con capacidad de proliferación, diferenciación y auto-renovación, denominada célula madre linfomieloide. A partir de esta célula surgen la célula progenitora linfóide y la progenitora mieloide, generándose así los dos grandes linajes celulares sanguíneos (Florensa et al., 2001).

I.2.- CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Las CMH son las células madre más estudiadas en la actualidad. Al igual que otras células madre tienen la capacidad de auto-renovarse al tiempo que pueden diferenciarse para dar lugar al resto de las células del sistema hematopoyético. Mientras que las células sanguíneas maduras se producen a

una velocidad de más de un millón de células por segundo, en el ser humano adulto en condiciones normales, la mayor parte de las CMH permanecen principalmente en la fase G0 del ciclo celular. Esta capacidad resulta ser un fenómeno celular de gran relevancia, en el cual la célula puede dividirse dando lugar a dos células hijas de las cuales al menos una de ellas es capaz de mantenerse en un estado indiferenciado y metabólicamente quiescente. Gracias a esta propiedad las CMH son capaces de generar y mantener todo el sistema hematopoyético a partir de un único tipo celular durante toda la vida de un individuo. La interrupción de los mecanismos de control subyacentes puede conducir a la degeneración o expansión del pool de CMH, proceso que ocurre en la leucemia o que puede ocurrir después de la irradiación. Por tanto, es muy importante desvelar los mecanismos que rigen la decisión de auto-renovación frente a la diferenciación en la biología de las CMH (Mera Reina et al., 2007; Giebel y Brung, 2008; Seita y Weissman, 2010; Domínguez Pantoja et al., 2015).

Estas células se pueden clasificar de dos maneras: i) Según el tejido de origen en células madre embrionarias o adultas ii) Según su potencial de diferenciación en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. Las células totipotentes son aquellas capaces de dar origen a un organismo completo y a un tejido extraembrionario; las células madre pluripotentes producen células derivadas de cualquiera de las tres capas embrionarias, mesodermo, endodermo y ectodermo. Las células multipotentes generan todos los tipos celulares derivados de una sola capa embrionaria (Mera Reina et al., 2007; Domínguez Pantoja et al., 2015).

En seres humanos adultos, las CMH se encuentran fundamentalmente en la MO (0.5 al 3%), en menor porcentaje en el cordón umbilical (CU) (0.1 al 0.5%) y en sangre periférica (SP) (0.01 al 0.2%). A pesar que la MO, la SP y el CU son fuentes adecuadas para su obtención, la cantidad de células aisladas es muy limitada lo que imposibilita su uso a gran escala, de ahí la necesidad de implementar métodos para expandir las mismas. Las dos metodologías más utilizadas para ese fin son la movilización hacia la periferia con el uso de drogas y la amplificación utilizando cultivos celulares. En 1978, Schofield consideró que el nicho o microambiente de la MO en el cual se localizan las CMH juega un rol fundamental en la regulación de la auto-renovación y diferenciación; capacidad regulada por diversas citoquinas. En la actualidad se han aportado nuevos conocimientos en relación al nicho de las CMH. Este nicho es incluso capaz de adaptarse a situaciones de estrés hematopoyético. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la diferenciación como la autorenovación y el conocimiento del microambiente en el cual se desarrollan es de suma importancia para la comprensión de la biología de estas células (Schofield, 1978; Zhang et al., 2003; Ema et al., 2006; Mera Reina et al., 2007; Xie et al., 2009; Domínguez Pantoja et al., 2015; Crane et al., 2017; Asada et al., 2017).

Las CMH de la MO del adulto tienen una capacidad de diferenciación enorme, siendo capaces de realizarlo hacia distintos linajes celulares (hemato y extrahematopoyéticos). En la actualidad no es posible la identificación ni el aislamiento de los precursores totipotentes de forma prospectiva con una certeza o pureza absoluta. Aunque aún queda mucho por conocer sobre estas

células, para la realización de trasplantes de MO se utiliza con éxito un pool de células que expresan el antígeno de membrana CD34 en las cuales hay CMH como precursores. La implementación de nuevas estrategias de trasplante apoya la cinética de injerto rápido con menos posibilidades de recaída de leucemia y disminución del tiempo de hospitalización. Cada día son más los estudios realizados sobre CMH dado que pueden mantener su carácter primitivo cuando son manipuladas en el laboratorio, preservando su capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro* hacia todos los linajes hematopoyéticos. Expresan CD34, contra el cual se han obtenido diversos anticuerpos monoclonales (Burt, 1999; Mera Reina et al., 2007; Singh et al., 2012; Domínguez Pantoja et al., 2015).

I.3.- ANTÍGENO DE MEMBRANA CD34

Las CMH expresan el antígeno de membrana CD34, el cual es un miembro de la familia de proteínas que incluyen otras dos moléculas denominadas Podocalyxin y Endoglycan (Figura 1). Es una fosfoglicoproteína transmembrana de cadena simple, con un peso molecular aproximado de 110 kD identificada por primera vez en 1984 en células madre y progenitores hematopoyéticos inmaduros. (Civin et al., 1984; Katz et al., 1985; Singh et al., 2012). Se la ha encontrado también expresada en células endoteliales de vasos pequeños (Fina et al., 1990), en fibroblastos embrionarios (Brown et al., 1991), tejido adiposo (Suga et al., 2009) y células madre mesenquimales (Peister et al., 2004; Mosna et al., 2010). Posee un dominio extracelular, una única hélice transmembrana y una cola citoplásmica. El ligando más comúnmente descrito para CD34 es L-selectina (CD62L), sin embargo, la proteína adaptadora CrkL,

conocida para la regulación de adhesión, también se une a CD34. Es expresada selectivamente en la membrana celular de progenitores hematopoyéticos linfoides y mieloides y en células endoteliales, y en la actualidad se ha detectado en progenitores epiteliales y del estroma (Civin et al., 1984; Felschow et al., 2001; Nielsen et al., 2008; Singh et al., 2012; Sidney et al., 2014).

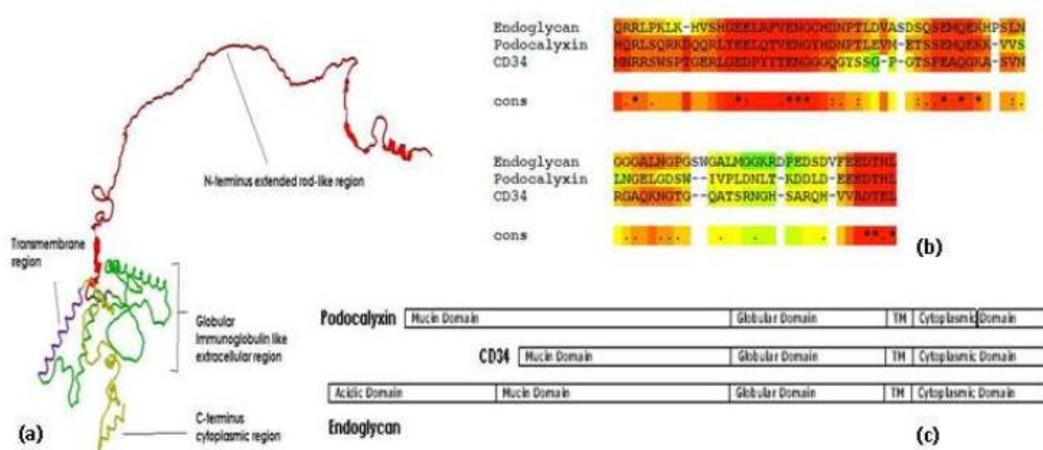


Figura 1.- Estructura de la proteína CD34. (a) Modelo tridimensional predictivo de la proteína CD34 humana mostrando diferentes regiones estructurales (b) Alineación secuencial múltiple del dominio citoplasmático de CD34 con regiones de la cola citoplásmica humana de Podocalyxin y Endoglycan, revelando un alto grado de conservación de secuencias (rojo) (c) Similitudes en el dominio estructural entre la familia de proteínas CD34 (Tomado de Singh et al., 2012).

A pesar de las enormes utilidades clínicas de CD34 poco se sabe sobre su función. Se lo ha relacionado con la inhibición o la facilitación de la adhesión, la proliferación celular y la regulación de la diferenciación (Furness y McNagny, 2006; Nielsen y McNagny, 2008; McNagny y Nielsen, 2009). Existe una correlación entre la plasticidad celular, la expresión y la pérdida de CD34, junto con otros antígenos de superficie celular, lo que sugiere el compromiso de la célula progenitora en mantenerse en un estado quiescente o activarse para

diferenciarse. A menudo la expresión de CD34 está vinculada a una proliferación activa. El cultivo y la propagación de células CD34+ presenta un gran desafío ya que la optimización de las técnicas de cultivo, propagación y diferenciación en muchos tipos de tejidos pueden presentar una fuente que podría utilizarse en estrategias de medicina regenerativa (Nielsen et al., 2008; Scherberich et al., 2013; Sidney et al., 2014; Ru et al., 2015).

En la megacariopoyesis la pérdida de CD34 y la adquisición de CD41 y CD61 están asociadas a la transición de una etapa proliferativa a una fase no proliferativa (Figura 2); pero no se sabe demasiado hasta el momento (Debili et al., 1992; González-Villalba et al., 2010; Singh et al., 2012; Ru et al., 2015; Nishinkii et al., 2017).

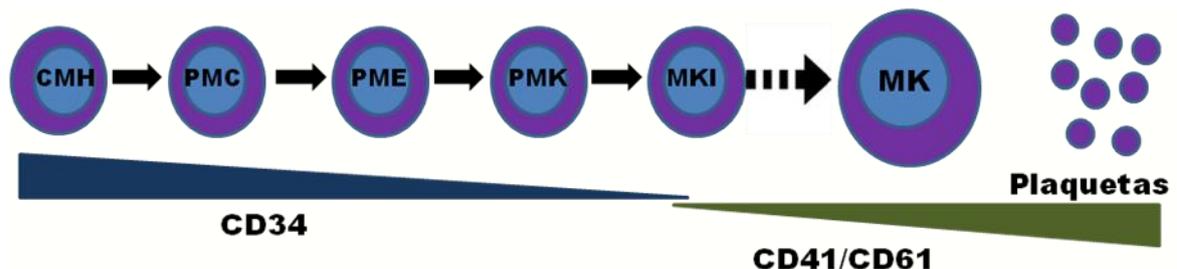


Figura 2.- Esquema del desarrollo de los megacariocitos (MKs). Las células madre hematopoyéticas (CMH) evolucionan a un progenitor mieloide común (PMC), progenitor MK-eritroide común (PME), progenitor MK (PMK), MK inmaduro (MKI), y por último a estadios de MK maduros con liberación de plaquetas sobre la etapa final de la maduración. Se observa que CD34 disminuye y CD41/CD61 se incrementan durante el desarrollo normal de los MKs. (Modificado de Ru et al., 2015 y González-Villalba et al., 2010).

I.4.- MEGACARIOPOYESIS Y TROMBOPOYESIS

La megacariopoyesis es el proceso por el cual las CMH se diferencian dando lugar a megacariocitos (MKs) y la trombopoyesis el proceso de formación y

liberación de plaquetas a partir de los MKs (Figura 3). Cada MK produce aproximadamente 10^4 plaquetas; y por día un adulto produce 10^{11} plaquetas, aunque la producción puede ser incrementada 20 veces más de acuerdo a la demanda corporal (Florensa et al., 2001; Szalai et al., 2006; Kaushansky, 2008; Serebruany et al., 2008).

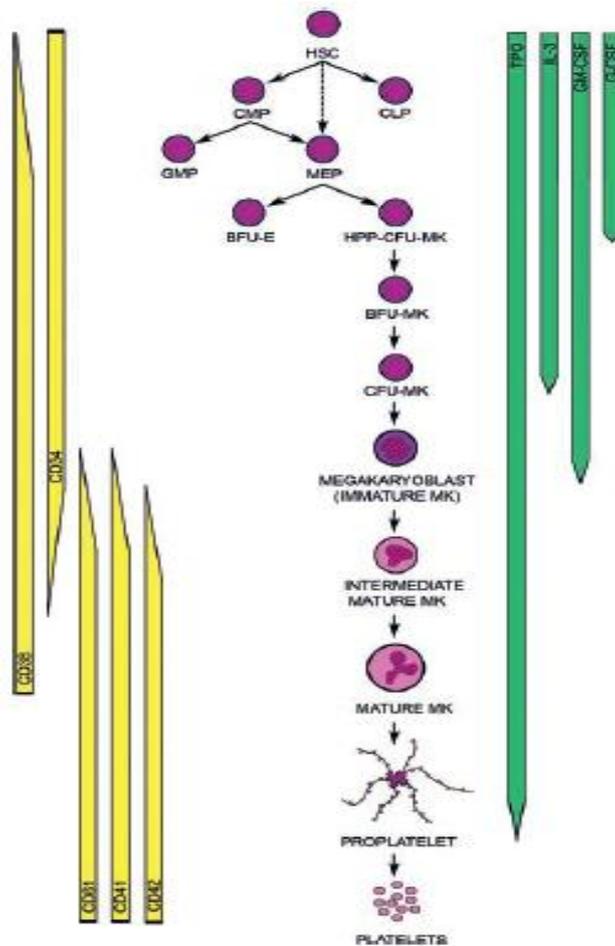


Figura 3. Esquema de la megacariopoyesis y la trombopoyesis. Las flechas amarillas indican la expresión diferencial de determinadas proteínas expresadas a lo largo de la megacariopoyesis y trombopoyesis, y las flechas verdes algunas citoquinas estimulantes (Tomado de Szalai et al., 2006).

I.4.1.- MEGACARIOCITOS

Por más de dos siglos los MKs fueron considerados como células raras de la MO. Recién en 1890, Howell acuña el término MK para caracterizar a este tipo celular (Howell, 1890). Residen principalmente en la región de la MO adyacente a las paredes sinusoidales, siendo una célula de gran talla en relación al resto de las células medulares. Su diámetro oscila entre 30 y 80 μm y se pueden distinguir distintos estadios evolutivos: el promegacarioblasto, el megacarioblasto, el promegacariocito, el promegacariocito granular formador de plaquetas y el megacariocito desprender de plaquetas. En la serie megacariocítica, a diferencia de lo que ocurre en el resto de las células hematopoyéticas, ocurre el proceso de endomitosis (caso particular de endoduplicación). En él las divisiones nucleares no son seguidas de las correspondientes divisiones citoplasmáticas, lo que conduce a la formación de células poliploides multinucleadas (hasta 64N), de gran tamaño a consecuencia de la expansión del citoplasma celular. Asimismo, como producto de la formación y organización de husos mitóticos multipolares, existe una segregación asimétrica de los cromosomas en cada núcleo. Es de resaltar que la única célula conocida hasta el momento que utiliza la endomitosis en su estructura funcional normal es el MK. Sin embargo, se ha observado frecuentemente la utilización de la endoduplicación en células neoplásicas; donde muchos de los mecanismos implicados en estos procesos son desconocidos (Florensa et al., 2001; Roy et al., 2001; Mattia et al., 2002; Deutsch y Tomer, 2006; Szalai et al., 2006; Kaushansky, 2008; Lee et al., 2009; González-Villalba, 2010; Huang et al., 2016).

El estudio de la megacariopoyesis humana se ha visto obstaculizada por la relativa escasez de MKs y colonias formadoras de MKs en la MO. El porcentaje de MKs en la MO oscila entre el 0.03-0.05% lo cual no proporciona un número adecuado para el estudio de estas células. Este hecho ha conducido a que en las últimas décadas se haya estudiado la producción de MKs y plaquetas en cultivos celulares de diferentes fuentes de progenitores, como la sangre del cordón umbilical (CU), MO o sangre periférica movilizada (SPM) (Guerreiro et al., 1995; Ayala et al., 1996; Schulze y Shivdasani, 2005; Szalai et al., 2006). Sin embargo, se han descrito y demostrado diferencias cuali y cuantitativas dependiendo del origen de dichos progenitores (Hao et al., 1995; Kim et al., 1999; Kanamaru et al., 2000; van den Oudenrijn et al., 2000; Yasui et al., 2005), incluyendo que los progenitores proveniente de la MO alcanzan niveles de poliploidía mayores (64N) que aquellos provenientes del CU (8N) (Mattia et al., 2002).

Hace ya muchos años que se relaciona el mayor tamaño y los altos niveles de ploidía de los MKs con la mayor producción plaquetaria (Machlus y Italiano, 2013; Machlus et al., 2014). Sin embargo, se observó que el MK hipolobulado del SMD 5q- aislado es normo o hiperproductor de plaquetas. Este hecho, si bien no contradice estrictamente lo expuesto anteriormente, deja de manifiesto la necesidad de caracterizar las ploidías megacariocíticas en esta patología (Elbert 2009 y 2011; Starczynowski et al. 2010; Pintos y Cabrejo, 2010; Greenberg et al. 2011, Boulwood et al. 2012). La gran dificultad para alcanzar ese objetivo reside en la baja incidencia de este subtipo de SMD, y que el diagnóstico se realiza básicamente por técnicas citogenéticas las cuales, en la

mayoría de los casos, requieren la utilización de toda la muestra e insumen más de una semana en la confirmación del diagnóstico. Esto lleva a que la viabilidad del excedente de muestra que podría emplearse en alguno de los casos para llevar a cabo el correspondiente análisis no sería óptima. Sumado a esto, el control evolutivo al cual es sometido el paciente es realizado después de varios meses, y durante ese tiempo el paciente es tratado con buena respuesta en la mayoría de los casos con lenalidomida (Saft et al., 2014; Wu et al., 2013). Como consecuencia la muestra obtenida en el primer control evolutivo tampoco sería adecuada para el estudio de ploidía dada la disminución en el porcentaje de MK hipolobulados debida a la buena respuesta del paciente frente a lenalidomida (Alessandrino et al., 2008; Saft et al., 2014).

El SMD 5q- aislado presenta como sello distintivo y característico la presencia de un alto porcentaje de MKs hipolobulados (Elbert 2009 y 2011). Fue descrito por primera vez en 1974 por Van den Berghe como el primer trastorno hematológico asociado con una delección cromosómica específica y es la única anomalía citogenética que define un subtipo específico de SMD. Este síndrome se caracteriza por una región deletada común de aproximadamente 1,5 megabases que mapea en la banda intersticial q33. Se lo considera un síndrome de buen pronóstico que se presenta fundamentalmente en mujeres en una relación 2:1 respecto a los hombres (Boulwood et al. 1994, Mallo et al. 2001, Cazzola 2008, Giagounidis et al. 2008, Elbert 2009 y 2011, Sans-Sabrafen et al. 2001, Starczynowski et al. 2010, Greenberg et al. 2011, Boulwood et al. 2012). Está caracterizado por una anemia macrocítica refractaria severa, neutropenia variable y un conteo normal o alto de plaquetas

con displasia megacariocítica. El rasgo morfológico distintivo y de presencia obligada es el hallazgo en la MO de un incremento significativo de MKs hipolobulados que superan el 50% del total mientras que en los sujetos normales no sobrepasan el 10%. El número de mieloblastos es inferior al 5% en la MO y menor al 1% en sangre periférica, con ausencia de bastones de Auer. Por razones desconocidas aún, los pacientes con este tipo de SMD tienen un pronóstico muy favorable; a menudo, viven por mucho tiempo y rara vez desarrollan leucemia (Steensma y List 2005; Giagounidis et al., 2008; Elbert 2009 y 2011; Olney y Le Beau 2009; Starczynowski et al.; 2010, Pintos y Cabrejo, 2010; Hasserjian et al., 2008; Greenberg et al., 2011; Schanz et al. 2012; Boulwood et al., 2012; Saft et al. 2014).

La delección del brazo q del cromosoma asociada con el síndrome 5q- contiene 40 genes que codifican proteínas y genes que codifican microARNs (Figura 4).

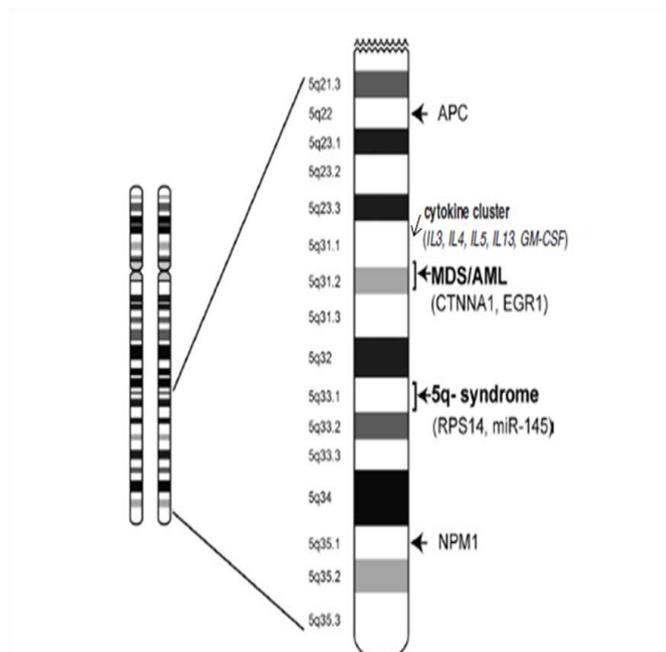


Figura 4.- Esquema de la delección del brazo largo del cromosoma 5 (Modificado de Elbert 2009 y 2011).

I.4.2.- PLAQUETAS

Las plaquetas son pequeñas células (1 a 4 μm de diámetro) que en el pasado se descartaban como "el polvo de sangre", y fueron identificadas en 1881 por Bizzozero (Bizzozero, 1881). Recién en 1906 Wright determinó que eran fragmentos citoplásmicos derivados de los MKs (Wright, 1996; Kaushansky, 2008). El MK maduro produce plaquetas por fragmentación citoplasmática que se producen a través de un proceso dinámico y regulado, llamado formación de proplaquetas, que consiste en alargamientos pseudopodiales largos que se rompen en cientos de plaquetas que circulan por todo el torrente sanguíneo, mientras que los núcleos restantes del MK son fagocitados por los macrófagos. Si bien el desarrollo del MK se realiza en la MO la segmentación de las proplaquetas se da en la circulación general y, sobre todo, en la pulmonar. La vida media de las plaquetas es de sólo 5 a 10 días, y las plaquetas viejas son destruidas por la fagocitosis de los macrófagos en el bazo y por las células de Kupffer en el hígado. Hasta el 40% de las plaquetas se almacenan en el bazo como reserva, y son liberadas cuando es necesario por las contracciones del músculo esplénico inducidas por el sistema simpático (Chang et al., 2007; Patel et al., 2010; Reems et al., 2010; Balduini et al., 2011; Kaufman et al., 2015).

Las plaquetas son discos citoplasmáticos enucleados que circulan en sangre y tienen un papel importante en la hemostasia, la trombosis, la inflamación y la biología vascular. Se demostró que las plaquetas están implicadas en otros procesos como la fibrosis, la arteriosclerosis, la diabetes, así como la diseminación de metástasis, entre otros (Ferroni et al., 2004; Morrell et al., 2014; Dhule y Gawali, 2014; Labellea et al., 2014; Chatterjee y Geisler, 2016;

Lee et al., 2016; Gerdes et al., 2016; Sol y Wurdinger, 2017). Más aún, se ha propuesto como biomarcador periférico de depresión, debido a mecanismos similares de captura, almacenamiento y liberación de serotonina, y de compartir los receptores 5-HT_{2A} presentes en las membranas de las neuronas serotoninérgicas (Moreno et al., 2005; Piletz et al., 2016). Son también requeridas transfusiones de plaquetas para prevenir las complicaciones potencialmente mortales de la trombocitopenia grave que se observan en una variedad de contextos médicos, incluyendo terapias contra el cáncer, traumatismo y sepsis (Deutsch y Tomer, 2006; Fletcher et al., 2015).

Según la Organización Mundial de la Salud, la transfusión de sangre salva vidas y mejora la salud y calidad de vida, pero muchos pacientes que requieren transfusión no tienen acceso oportuno a sangre segura (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/>). Millones de plaquetas son transfundidas cada año en todo el mundo, pero su suministro es limitado. Los grandes requerimientos de plaquetas en los Bancos de Sangre han hecho que la producción de MKs o plaquetas hayan sido motivo de estudio en las últimas décadas. En este contexto, diferentes factores químicos, biológicos y físicos han sido motivo de estudio para optimizar un protocolo en la obtención de estos dos tipos de células a partir de sus precursores. La mayor comprensión de la megacariopoyesis y de la trombopoyesis permitiría la producción de MKs y plaquetas suficientes para los requerimientos terapéuticos (Kaushansky, 2008; Hatami et al., 2014;). La producción *ex vivo* de plaquetas humanas mediante el cultivo de precursores se ha seguido como una medida alternativa para resolver las limitaciones en el suministro y la seguridad de los

productos de transfusión de plaquetas actuales. El objetivo es identificar instrumentos innovadores para estudiar mecanismos de liberación de plaquetas, enfermedades relacionadas con la producción de plaquetas y nuevas dianas terapéuticas a partir de células progenitoras humanas. El uso de biorreactores que simulan físicamente el ambiente *in vivo* y el descubrimiento de factores que promueven la megacariopoyesis y trombopoyesis posibilitan la obtención de plaquetas competentes con una eficacia mejorada. La producción de plaquetas a partir de CMH también podría resolver las complicaciones aloinmunitarias relacionadas con la transfusión a través de la fabricación de plaquetas autólogas compatibles con antígenos de leucocitos humanos (HLA). Más aún, pudiendo suprimir el HLA en las plaquetas se podría obtener un producto universal que se pueda fabricar a nivel industrial para satisfacer la creciente demanda actual (Sugimoto y Eto, 2017; Baigger et al., 2017; Di Buduo et al., 2017).

I.4.3.- FACTORES IMPLICADOS EN LA MEGACARIOPOYESIS Y TROMBOPOYESIS

La trombopoyetina (TPO) es el principal factor regulador de la megacariopoyesis y también provoca la liberación de las plaquetas, siendo capaz de promover la diferenciación megacariocítica *in vitro*. Actúa en todas las fases evolutivas de forma positiva, directa, sinérgica y aditiva con otros factores hematopoyéticos. Su producción tiene lugar en el hígado pero puede ser sintetizado también en el riñón y por las células estromales de la MO. Es una proteína de 332 aminoácidos y 95 kD de peso molecular que contiene dos dominios proteicos: el primero de 153 aminoácidos, que es el biológicamente activo, se une al receptor cMpl para estimular las vías de señalización que

inducen la diferenciación de las CMH en MK y plaquetas y posee alta homología con la eritropoyetina (EPO). El segundo de 178 aminoácidos es rico en glúcidos y es el responsable de mantener la estructura proteica. El gen humano que codifica la TPO se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3 (3q26-27). La TPO está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa basado en los niveles de plaquetas, por lo que los altos niveles de plaquetas resultan en niveles más bajos de TPO, y viceversa (de Sauvage et al., 1994; Guerriero et al., 1995; Deutsch y Tomer, 2006; Szalai et al., 2006; Kaushansky, 2008; Liu et al., 2015; Nishinkii et al., 2017).

I.5.- MARCADORES ESPECÍFICOS DE MEGACARIOCITOS Y PLAQUETAS

En 1918, el pediatra suizo Eduard Glanzmann describió una serie de pacientes con un trastorno hemorrágico hereditario caracterizado por hemorragia mucocutánea en la que el recuento plaquetario era normal, pero la función plaquetaria, medida por la retracción del coágulo, se veía afectada. Él denominó a este trastorno como trombostenia hemorrágica hereditaria la cual fue nombrada posteriormente como trombostenia de Glanzmann, introduciendo el concepto de un trastorno plaquetario cualitativo. A continuación, se reportó que los pacientes con trombostenia tenían tiempos de sangrado prolongados, mientras que otros investigadores observaron que las plaquetas de los pacientes tromboasténicos no se agregaban. Más adelante, fueron denominadas como las glicoproteínas IIb (GPIIb o CD41) y IIIa (GPIIIa o CD61) a las proteínas deficientes o anormales en la trombostenia de Glanzmann.

GPIIb (140 kD) está compuesta por una cadena pesada y una cadena ligera (120 y 20 kD, respectivamente) unidas entre sí por enlaces disulfuro la cual le

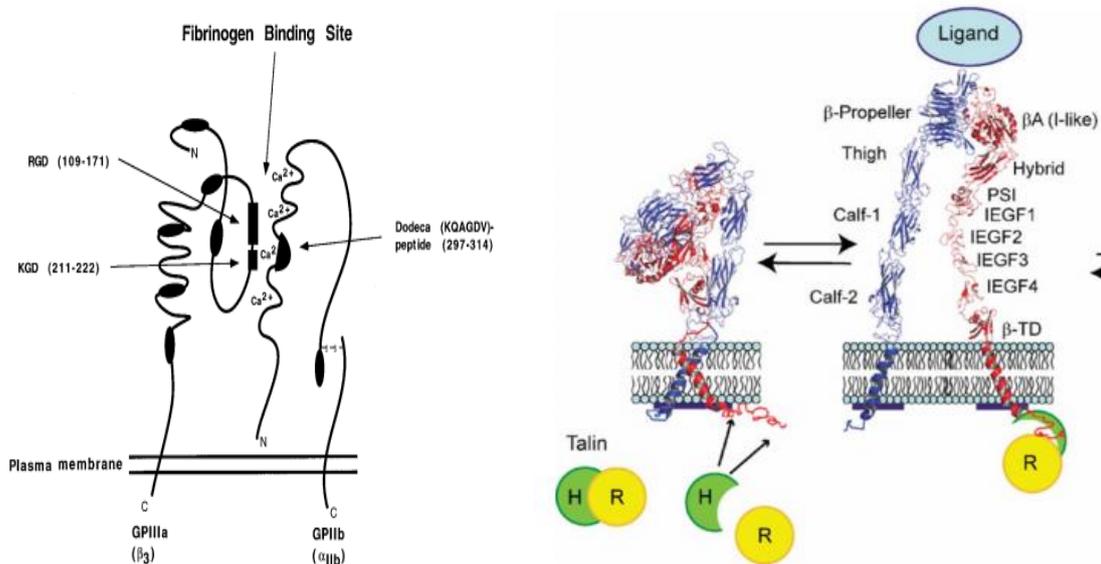


Figura 5.- Estructura del complejo GPIIb/IIIa. A la izquierda se puede apreciar un esquema del complejo, en dónde se expone la región de unión al ligando (Gawaz et al., 1999); y a la derecha un modelo del complejo mostrando el cambio conformacional producido por la unión al ligando (modificado de Collier y Shattil, 2008).

proporciona una estructura compacta, y junto con GPIIIa (95 kD) forman un heterodímero dependiente de calcio (Figura 5). GPIIb y GPIIIa son sintetizadas por separado en el retículo endoplásmico, donde luego son transportadas al aparato de Golgi para su posterior procesamiento. La necesidad que ambas proteínas se completen para expresarse en la superficie celular de plaquetas y MK ofreció una explicación para el enigma de que los pacientes con trombostenia de Glanzmann tenían alteraciones en una u otra de dichas proteínas (Nurden y Caen, 1974; Phillips y Agin, 1977; Gawaz et al., 1999; Bellucci y Caen, 2002; Quinn et al., 2003; Collier y Shattil, 2008).

La pérdida de CD34 de los progenitores en la megacariopoyesis y la aparición de CD41 y CD61 se asocian con una transición de una fase proliferativa a una

no proliferativa, como así también a la maduración y poliploidización megacariocítica (Debili et al., 1992; González-Villalba et al., 2010; Arnold et al., 2015; Ru et al., 2015). Además, en algunas leucemias la presencia de porcentajes $\geq 30\%$ de MK CD34+ constituye una herramienta diagnóstica potencialmente útil para distinguir entre la leucemia mieloide no aguda y la anemia megaloblástica de no megaloblástica (Insuasti-Beltran et al., 2012).

Dada la falta de conocimiento que existe en este campo de investigación como se ha descrito en la introducción, se analizará la megacariopoyesis humana *in vitro* a partir de precursores movilizados de MO estimulados con TPO. Se examinará la pérdida de CD34 y la adquisición de CD41 y CD61, y se obtendrá una concentración de células suficiente para realizar la extracción de ARN. Esto último posibilitará la realización de la secuenciación masiva por *Next-Generation Sequencing* (NGS). De esta manera se contará con el transcriptoma de MKs humanos, el cual no se encuentra reportado.

II.- PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La pérdida de CD34 y la adquisición de CD41 y CD61 son indicadores de una megacariopoyesis normal. Se propone profundizar en el conocimiento de la megacariopoyesis humana tanto en los aspectos citomorfológicos como en los aspectos vinculados a la modificación de estos marcadores inmunofenotípicos.

III.- OBJETIVOS

III.1.- OBJETIVO GENERAL

Analizar y caracterizar la megacariopoyesis humana *in vitro* a partir de precursores movilizados de médula ósea utilizando diversos abordajes metodológicos.

III.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Poner a punto las técnicas a utilizar para la caracterización de la megacariopoyesis humana *in vitro* utilizando aspirados y biopsias de médula ósea.
2. Caracterizar citomorfológicamente la diferenciación megacariocítica *in vitro*.
3. Analizar la expresión de CD34, CD41 y CD61 en la megacariopoyesis humana *in vitro*.
4. Analizar el citoesqueleto de actina durante la megacariopoyesis.
5. Obtener los transcriptomas de los MKs diferenciados *in vitro*.

IV.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los estudios preliminares realizados en aspirados y biopsias de MO de pacientes con SMD 5q- aislado, y de pacientes con patologías extrahematopoyéticas (neuroblastomas y carcinomas) sin compromiso medular han permitido la optimización de las distintas técnicas de marcado para realizar un preciso reconocimiento de los MKs. Las muestras fueron obtenidas de individuos que concurrieron al Laboratorio de Técnicas Especializadas de la AEPS para realizarse los análisis hematológicos correspondientes. Las diferentes alícuotas fueron extendidas en portaobjetos de vidrio y teñidas posteriormente con May Grünwald-Giemsa como se realiza para un mielograma. Se realizó, además, la fijación y permeabilización del material y se utilizaron los anticuerpos, faloidina y DAPI para establecer las concentraciones y condiciones de incubación óptimas.

IV.1.- CULTIVOS CELULARES DE MEGACARIOCITOS

Como se mencionó en la introducción, la escasez de MKs en la MO hace necesaria la implementación de metodologías que optimicen la amplificación megacariocítica disminuyendo los riesgos tanto para los pacientes como para los donantes. Uno de los métodos más utilizados es la realización de cultivos celulares a partir de distintas fuentes de precursores, si bien aún queda mucho por investigar para que esta metodología sea adecuada para su utilización en la medicina (Sugimoto y Eto, 2017; Guan et al., 2017).

Mediante una adecuada metodología y manipulación a partir de CMH se pueden obtener MKs. Los MKs obtenidos pueden crioconservarse y por tanto

serían adecuados como células productoras de plaquetas garantizando de esta manera la disponibilidad de plaquetas en los Bancos de Sangre para la población necesitada. Sin embargo, el escaso conocimiento de los mecanismos que controlan el proceso de desarrollo de los MKs y los mecanismos que rigen la producción de plaquetas dentro de la MO es una gran limitante para alcanzar el objetivo antes mencionado. Para superar estas limitaciones, se han desarrollado y estudiado modelos de tejidos humanos funcionales para extrapolar los resultados *ex vivo* con lo que sucede *in vivo* en la MO. Hay muchos desafíos que estos modelos deben superar, desde imitar fielmente la composición fisiológica y las funciones de la MO, hasta la recolección de las plaquetas generadas y la validación de su viabilidad y función para uso humano (Sugimoto y Eto, 2017; Baigger et al., 2017; Di Buduo et al., 2017).

Debido a que en la literatura científica existen variaciones metodológicas y no existe precedente en el país sobre cultivos celulares de MKs humanos fue preciso llevar a cabo experimentos preliminares para definir las condiciones de cultivo óptimas que permitieran la expansión y diferenciación megacariocítica. Se llegó a establecer un protocolo que permite la amplificación de un gran número de MKs como se detallará en materiales y métodos.

IV.2.- MEGACARIOCITOS Y CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CF) comenzó su desarrollo en la década de los 60, y en aquella época su aplicación era casi exclusiva para el recuento y medida del tamaño de las partículas en laboratorios de investigación básica (Caunedo, 2004). Es una técnica que permite medir múltiples características físicas de una sola célula, tales como tamaño y granularidad simultáneamente a medida que

las células de una población heterogénea u homogénea fluyen en suspensión a través de un dispositivo de medición. Su potencial analítico reside principalmente en la posibilidad de medir diversos parámetros en millares de células individuales en pocos segundos a través de la recolección de señales luminosas generadas por la interacción de las células bajo investigación con la intensa iluminación de uno o varios láseres. Las señales medidas pueden derivar de colorantes o anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas en la superficie celular o intracelulares, proporcionando uno de los mejores métodos para el estudio de receptores proteicos. En general es empleada para recuento de células, detección de biomarcadores y clasificación celular (Jennings et al., 1986; Monteiro et al., 2002; Saeys et al., 2016; Han et al., 2016; Adan et al., 2017).

El bajo porcentaje de MKs en la MO no permite obtener un número adecuado de células para determinadas investigaciones a partir de un aspirado de MO. El estándar actual para la cuantificación exacta del número de MKs en la médula es el análisis inmunohistoquímico de secciones de MO con anticuerpos contra antígenos de superficie de los MKs, incluyendo componentes de los complejos de integrina CD41/CD61 (GpIIb/IIIa) y CD42a-d (GPIX/GP1B α /Gp1B β /GPIV). La inmunohistoquímica permite la identificación de MKs a lo largo de su maduración y es ideal para el análisis de MKs grandes y frágiles mientras permanecen inmovilizados en la médula ósea. La CF proporciona un método para el análisis de poblaciones de células debido a su rapidez, sensibilidad y capacidad para realizar múltiples mediciones cuantitativas en un gran número de células individuales. Por lo tanto, es capaz de evaluar poblaciones de

células raras incluso en mezclas complejas como es el caso de la MO. El marcado de ciertas proteínas de membrana y la adquisición de datos con esta técnica proporciona gran utilidad para el conteo, la viabilidad y el estudio de la diferenciación megacariocítica. Por último, cabe mencionar que una de las dificultades que se ha encontrado para estudiar los MKs por CF es el de disponer de un equipo que cuente con boquillas suficientemente grandes para el paso de los MK y un programa adecuado para realizar una clasificación de células o partículas de gran tamaño (Jackson et al., 1994; Tomer et al., 1988; Niswander et al., 2014; Gertz et al., 2017).

IV.3.- ANÁLISIS CITOMORFOLÓGICO

El análisis citomorfológico sobre la diferenciación megacariocítica se llevó a cabo utilizando microscopía óptica de luz (MOL) y microscopía láser confocal (MLC) el cual permitió el análisis de los marcadores de superficie CD34, CD41 y CD61, y el citoesqueleto de actina. La utilización de diferentes clones de un mismo anticuerpo permitió descartar errores artefactuales, ya que identifica distintos epítopes del blanco en estudio. El uso de diferentes fluorocromos para un mismo anticuerpo obedece a la necesidad de un multimarcado. En el presente trabajo se requirió el uso de CD34-PE-Cy7 para formar un multipanel de anticuerpos junto con CD41-PE y CD61-FITC en la adquisición de datos por CF. La principal ventaja en la utilización de MLC reside en que permite la adquisición de imágenes de buena calidad mediante técnicas de filtrado espacial que eliminan la luz que proviene de planos fuera de foco permitiendo controlar la profundidad del campo.

Para el análisis de la estructura celular a una mayor resolución se utilizó la microscopía de Iluminación estructural (SIM, *Structural Illumination Microscopy*) y microscopía de fuerza atómica (MFA).

SIM se basa en un patrón de cuadrícula que reside en una de las aperturas de iluminación para generar un campo de ondas de excitación sinusoidal que puede usarse para extraer información del plano focal de la imagen (rechazando así el desenfoque) (Langhorst et al., 2009; Karadaglic y Wilson, 2008; Barlow y Guerin, 2007).

El MFA es un instrumento mecano-óptico que forma imágenes de las superficies utilizando una sonda o micropalanca. Ésta recorre la muestra haciendo una exploración línea por línea, escaneando la muestra en función de la posición y de esta manera genera una imagen. Esta técnica permite obtener imágenes topográficas en 3D, hacer mediciones del orden de los nm, detectar fuerzas de nN, hacer mediciones de visco-elasticidad y dureza de la muestra. La punta de AFM se encuentra montada en una micropalanca, a la cual se le hace incidir un láser, así cada vez que la punta sube o baja debido a la interacción con la superficie que se encuentra analizando, la micropalanca refleja la desviación del láser a un fotodetector y es interpretada por el software generando una imagen. Este abordaje microscópico no requiere trabajar en condiciones de vacío, la muestra no requiere una preparación sofisticada y tampoco es necesario que la muestra a analizar sea conductora o se encuentre recubierta (Eghiaian F, Schaap IA, 2011; Plodinec M et al., 2010).

La caracterización del citoesqueleto es una herramienta fundamental en el estudio morfológico de las células eucariotas, pudiendo reflejar información

relevante del comportamiento celular. La faloidina se une selectivamente a la actina-F impidiendo su polimerización, lo cual interfiere en las actividades esenciales de las células, siendo un buen marcador para el estudio del citoesqueleto en células fijadas.

IV.4.-SECUENCIACIÓN MASIVA

Se solicitará la secuenciación masiva en un servicio externo. La secuenciación será pareada (lecturas de 100 pb), obteniéndose como mínimo 20 millones de lecturas mapeables de cada muestra. Las lecturas estarán libres de ARN ribosomales para no generar ruido en el análisis bioinformático. Si bien ya se ha obtenido el transcriptoma de las plaquetas reticuladas humanas, el transcriptoma de los MKs humanos no se ha reportado aún.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

V.1.- MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES y ANTICUERPOS

V.1.1.- MEDIOS DE CULTIVO CELULAR Y ESTIMULANTES

- **Stem Pro-34 SFM (1X):** Medio de cultivo libre de suero para el mantenimiento de células primarias hematopoyéticas (10640-019 Gibco) suplementado con antibióticos: penicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (125 mg/mL).
- **Nutrient Supplement:** Suplemento de nutrientes el cual es adicionado al medio de cultivo mencionado anteriormente (10641-025 Gibco).
- **RPMI Medium 1640 (1X):** Medio de cultivo para leucocitos normales y neoplásicos. Con la adición de algunos suplementos puede soportar el crecimiento de otros tipos celulares (11875-093 Gibco).
- **SFB (Suero fetal bovino):** Suplemento de nutrientes de los medios de cultivo para la proliferación celular *in vitro* (16000-044 Gibco).
- **Recombinant Human Trombopoietin:** Principal factor estimulante de la megacariopoyesis (PHC9514 Gibco).

V.1.2.- SOLUCIONES, TAMPONES Y REACTIVOS

- **Phosphate Buffered Saline (PBS):** Solución amortiguadora de fosfatos cuya composición química es: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 2 mM; pH 7.2.
- **BSA (Albúmina de suero bovino):** Proteína de gran tamaño presente en el suero, rica en aminoácidos esenciales y compuestos con puentes

disulfuro y grupos tiol (grupos azufrados). MACS BSA Stock Solution 1:20 (130-091-376 Miltenyi Biotec).

- **HSA (Albúmina de suero humano):** Principal proteína de la sangre que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo (A1653 Sigma).
- **autoMACS Rinsing Solution:** Se utiliza para la limpieza del sistema de fluidos de los Sistemas de Separación de Células MACS. En combinación con la solución MACS BSA se utiliza como tampón de separación MACS óptimo, libre de conservantes, que se puede utilizar para la clasificación de células. (130-091-222 Miltenyi Biotec).
- **4% PAF + 0.2% Triton:** Solución que posibilita la fijación y permeabilización de las células en estudio.
- **DAPI-glicerol:** 50% de glicerol conteniendo 1 µg/mL DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) que se intercala en el surco menor del ADN (Sigma).
- **Faloidina-Rodamina:** Sonda de alta afinidad para F-actina conjugada con tetrametilrodamina (TRITC). La faloidina es un péptido bicíclico perteneciente a una familia de toxinas aisladas de *Amanita phalloides* y comúnmente es utilizada para estudiar el comportamiento del citoesqueleto celular (Invitrogen).
- **May Grünwald-Giemsa:** Técnica de tinción que se utiliza principalmente en frotis sanguíneos o extendidos de MO. Permite diferenciar cuali- y cuantitativamente los elementos formes hematopoyéticos. La solución de May-Grünwald contiene eosina (como colorante aniónico) y azul de

metileno (como colorante catiónico) disueltos en metanol. La solución de Giemsa contiene eosina, azul de metileno y productos de la oxidación del azul de metileno (azur A, azur B, violeta de metilo y azul de metilo) (Sigma-Aldrich).

- **7AAD:** 7-aminoactinomicina D es un compuesto químico fluorescente que tiene fuerte afinidad por el ADN. Se intercala en el ADN con una alta afinidad a las regiones ricas en GC. En hematología se utiliza como marcador de viabilidad ya que indica las células no viables porque no es permeable a la membrana celular (A1310 Invitrogen).
- **Trizol Reagent:** Reactivo utilizado para el aislamiento de ADN, ARN y proteínas en muestras de células y tejidos humano, animal, así también como de levaduras y bacterias. Es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares (15596-018 Ambion).
- **Cloroformo:** Es utilizado en la extracción de ácidos nucleicos. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y la otra orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y puede ser recuperado por precipitación con alcohol, una vez removida la fase (Ambion).
- **Isopropanol:** Se utiliza para la precipitación de los ácidos nucleicos (Biopack).

- **70% metanol:** También es utilizado para la precipitación de los ácidos nucleicos (Dorwil).
- **Agua DEPC:** Agua ultrapura con 0.1% de dietilpirocarbonato la cual es una sustancia química que elimina las ribonucleasas (Thermo Fisher).
- **Marcador de Peso Molecular:** De 100 pares de bases (15628-050 Invitrogen)
- **Agarosa:** Se utiliza en la preparación de geles para la caracterización, identificación y aislamiento ácidos nucleicos mediante electroforesis (Invitrogen).

V.1.3.- ANTICUERPOS

- **CD34-PE, CD34-FITC y CD34-PE-Cy7:** Anticuerpos dirigidos a la glicoproteína transmembrana de cadena simple CD34 que se expresa selectivamente en las células progenitoras hematopoyéticas.
 - ✓ CD34-PE lleva conjugado el fluorocromo ficoeritrina (PE) excitable con láser de 488 nm de longitud de onda y máximo de emisión a 575 nm. Este fluorocromo correspondiente a la fluorescencia de color rojo permite que el anticuerpo CD34 sea detectado por el fotomultiplicador FL2 del citómetro de flujo y por microscopía láser confocal (MLC) (IM11420, clon Immu133 Beckman Coulter).
 - ✓ CD34-FITC lleva conjugado el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) también excitable a 488 nm de longitud de onda y máximo de emisión a 530 nm. Este fluorocromo correspondiente a la fluorescencia de color verde permite que el

anticuerpo CD34 sea detectado por el fotomultiplicador FL1 del citómetro de flujo y por MLC. (IM1870U, clon S81 Beckman Coulter).

- ✓ CD34PE-Cy7 lleva conjugado un fluorocromo en tándem que combina PE y un colorante de cianina que puede ser excitado con un láser de 488 nm de longitud de onda y máximo de emisión a 785 nm. Los reactivos conjugados de PE-Cy7 son tan brillantes como los conjugados de PE. Este fluorocromo permite que el anticuerpo CD34 sea detectado por el fotomultiplicador FL3 correspondiente a la fluorescencia de color rojo (A51077, clon S81 Beckman Coulter).

➤ **CD34 MicroBead Kit:** Anticuerpos antiCD34 conjugados con microperlas metalizadas que posibilitan la purificación de las células CD34+ por separación magnética (130-097-047 Miltenyi Biotec).

➤ **CD41-PE:** Anticuerpo dirigido al complejo GPIIb/GPIIIa conjugado a PE cuyas longitudes de onda son 488 nm y 575 nm. Este fluorocromo permite que el anticuerpo CD41 sea detectado por el fotomultiplicador FL2 del citómetro de flujo correspondiente a la fluorescencia color amarillo-naranja y por MLC (IM1416U, clon P2 Beckman Coulter).

➤ **CD45-PE-Texas Red y CD45- FITC:** Anticuerpos dirigidos a la proteína tirosina-fosfatasa que se encuentra presente en todos los leucocitos.

- ✓ CD45-PE-Texas Red lleva conjugado el fluorocromo PE-Texas Red (excitación: 488 nm, emisión: 615 nm). Este fluorocromo

permite que el anticuerpo CD45 sea detectado por el fotomultiplicador FL2 del citómetro de flujo correspondiente a la fluorescencia color amarillo-naranja (IM2710U, clon J33 Beckman Coulter).

✓ CD45-FITC lleva conjugado el fluorocromo FITC. Este fluorocromo permite que el anticuerpo CD45 sea detectado por el fotomultiplicador FL1 del citómetro de flujo correspondiente a la fluorescencia color verde (IM0782U, clon J33 Beckman Coulter).

➤ **CD61-FITC:** Anticuerpo dirigido a la glicoproteína GPIIIa. Lleva unido el fluorocromo FITC. Este fluorocromo correspondiente a la fluorescencia de color verde permite que el anticuerpo CD61 sea detectado por el fotomultiplicador FL1 del citómetro y por MLC (IM1758U, clon SZ21 Beckman Coulter).

V.2.- MÉTODOS

V.2.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras (3 hombres y 2 mujeres, entre 28 y 41 años) fueron proporcionadas por el Servicio de Medicina Transfusional de la Asociación Española Primera en Salud (AEPS). Las mismas fueron obtenidas por leucoaféresis de donantes voluntarios para trasplante alogénico de MO, luego de efectuarse la movilización de precursores CD34+ hacia la periferia. Durante la aféresis se extrae la sangre por una vena principal del brazo o por un catéter venoso central. La sangre pasa por un equipo que separa los precursores

hematopoyéticos y es regresada al donante. El procedimiento dura aproximadamente de 4 a 6 horas.

El presente trabajo contó con la aprobación de los Comités de Ética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y la AEPS, y el consentimiento informado de cada voluntario. Se procesó una alícuota de 5 mL del producto de leucoaféresis de cada donante para el análisis.

V.2.2.- PURIFICACIÓN, CONTEO Y VIABILIDAD DE PRECURSORES CD34+

Los precursores CD34+ fueron purificados partiendo de la alícuota del producto de leucoaféresis recurriendo a la tecnología de separación magnética. Se utilizaron CD34 MicroBead Kit, LS Columns (130-042-401, Miltenyi Biotec) y un separador magnético MidiMACS Separator (130-042-302, Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Previo y posteriormente a la purificación, se realizó un conteo y se verificó la viabilidad de las células CD34+. Se utilizó la Guía ISHAGE (“International Society of Hematotherapy and Graft Engineering”) (Keeney et al., 1998) para el recuento de células CD34+, utilizando los AcMo antiCD34-PE y antiCD45-FITC. El protocolo ISHAGE propone una estrategia de plataforma única proporcionando el recuento de células CD34+ como fracción de los leucocitos. Se basa en el reconocimiento de un marcador de membrana panleucocitario denominado CD45, de elevada expresión en linfocitos maduros y débilmente expresados por los linfoblastos, población enriquecida en células CD34+. La calibración y el recuento absoluto fueron realizados mediante la utilización de perlas cuya concentración y tamaño son conocidos. Para evaluar la viabilidad celular se utilizó 7AAD, el cual marca a las células muertas. La adquisición de

datos se realizó en un CF CyAn™ ADP (DakoCytomation) perteneciente a la AEPS, utilizando el protocolo que está establecido internacionalmente como procedimiento habitual en los trasplantes de MO.

V.2.3.- CULTIVOS CELULARES DE MEGACARIOCITOS

Se efectuaron cultivos celulares a 37°C y con 5% de CO₂ de poblaciones enriquecidas de células CD34+ a una concentración de 2,5 x 10⁵ células/mL en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Greiner Bio-one) en el medio de cultivo StemPro-34 suplementado con Nutrient Supplement y HSA según las instrucciones del fabricante. Además, se le adicionó penicilina (100 U/mL) y estreptomina (125 mg/mL), y se estimularon con 20 µL/mL de TPO con una actividad específica de 10⁶ U/mg, realizándose pasajes, en los días siguientes, si la concentración superaba 1 x 10⁶ células/mL. El conteo celular se realizó utilizando cámara de Neubauer. Se reabastecieron los pocillos de cultivo con 20 µL/mL más de TPO al séptimo día de cultivo. Se adquirieron imágenes de las células durante los días de cultivo directamente en los pocillos de cultivo utilizando un microscopio invertido Wilovert, Wetzlar (40x) provisto con una cámara Dino-Eye AM-423X y el software proporcionado por dicha cámara.

Fueron extraídas alícuotas (1 mL) de los cultivos para los análisis que serán detallados posteriormente. Los cultivos celulares fueron incubados durante un máximo de 14 días, momento en el cual fueron recolectados para efectuar la extracción de ARN tal cual se explicitará más adelante.

V.2.4.- ANÁLISIS DE LA DIFERENCIACIÓN MEGACARIOCÍTICA

El análisis de la diferenciación megacariocítica se llevó a cabo utilizando microscopía óptica de luz (MOL), microscopía láser confocal (MLC), microscopía de Iluminación estructural (SIM, *Structural Illumination Microscopy*) y microscopía de fuerza atómica (MFA). Se tomaron alícuotas las cuales fueron extendidas en portaobjetos de vidrio, donde se realizaron diferentes procedimientos según las técnicas de microscopía a utilizar.

V.2.4.1- PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES CON MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ (MOL)

Las alícuotas extendidas fueron teñidas por el método tradicional de May Grünwald-Giemsa. Primeramente, las láminas fueron teñidas durante 1 min. con May Grünwald, y luego fueron lavadas con agua destilada para posteriormente ser teñidas con Giemsa diluido en agua común a una concentración de 1:9 durante 10 min. Por último fueron lavadas y secadas al aire. Todo el procedimiento fue realizado a temperatura ambiente.

Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Olympus Vanox provisto con una cámara Dino-Eye AM-423X y el software proporcionado por dicha cámara. Todas las fotografías fueron adquiridas con un aumento de 100x.

V.2.4.2- INMUNOCITOQUÍMICA, CITOQUÍMICA Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES CON MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL (MLC)

El análisis se realizó empleando tres marcadores de superficie: CD34, CD41 y CD61. Los núcleos fueron evidenciados utilizando DAPI y el citoesqueleto celular con Faloidina-Rodamina. Las muestras fueron fijadas con 4% PFA y permeabilizadas con 0.2% de Triton durante 10 min. Luego fueron lavadas con

PBS (3 x 1 min). Posteriormente se realizó el marcado utilizando 1:100 antiCD34-PE y/o antiCD34-FITC; o 1:100 antiCD41-PE y 1:100 antiCD61-FITC; o 1:200 Phalloidin-Rhodamine por 20 min. A continuación se lavaron los preparados con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos o sondas (1 x 1 min), y por último fueron montados en 50% de glicerol conteniendo 1 µg/mL de DAPI. Todo el procedimiento fue realizado a temperatura ambiente y bajo condiciones de oscuridad.

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Olympus FV300 que posee láseres de 405, 488, 543 y 633 nm de longitud de onda. Todas las imágenes se obtuvieron a 2048 x 2048 con gran aumento (160 o 200x) preservando los parámetros de adquisición en todas las condiciones. El procesamiento de imágenes se realizó utilizando Adobe Photoshop CS6.

V.2.4.3- INMUNOCITOQUÍMICA Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES CON STRUCTURAL ILLUMINATION MICROSCOPY (SIM)

Se realizó el mismo procedimiento de fijación, permeabilización e inmunocitoquímica que para MLC. Las imágenes de alta resolución se adquirieron utilizando SIM, ELYRA S.1 SR (Carl Zeiss) con el correspondiente software ZEN en el *Department of Cell and Developmental Biology, Biocenter (Biozentrum, Universität Würzburg)* en Alemania. Los láser de excitación utilizados fueron de 405, 488 y 568 nm para cada par de anticuerpos analizados. Se utilizó un objetivo de inmersión DIC M27 de inmersión Plan Achromat 63x/1.4 y cámaras EM-CCD (AndoriXon) para cada canal. Las imágenes se adquirieron en forma de *Z stacks*, producidas individualmente en un intervalo de 0.1 µm por canal. El patrón de rejilla se hizo girar tres veces y

con cinco movimientos de fase de la rejilla de difracción. Las imágenes digitales fueron procesadas con la función *Structured Illumination* del software ZEN, realizándose un análisis más extenso utilizando el procesador de imágenes *Open Source* del software Fiji (Schindelin et al., 2012).

V.2.4.4- PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES CON MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (MFA)

Los preparados ya fijados fueron lavados 3 veces con agua ultrapura Mili-Q y directamente expuestos al aire. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fuerza atómica (Bioscope Catalyst, Bruker) acoplado con un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus IX81). El microscopio de epifluorescencia fue utilizado para seleccionar las células que posteriormente fueron analizadas por AFM. Se utilizó una sonda (ScanAssyst-Air de Bruker) con una punta de nitruro de silicio de geometría triangular, con 2 nm de radio y un *cantilever* triangular de 115 μm de largo con una constante elástica de 0.4 N/m, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron imágenes de 35 x 35 μm en el modo intermitente de fuerza de pico, con una frecuencia de barrido de 0,1 Hz y una resolución de 512 x 512-píxeles. Adobe Photoshop CS6 fue utilizado para procesar las imágenes.

V.2.5.- ANÁLISIS DE LA PUREZA DE LOS CULTIVOS CELULARES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Los cultivos celulares fueron analizados tomando alícuotas de los mismos a diario utilizando MOL y MLC después de haber realizado los procedimientos detallados anteriormente utilizando los anticuerpos monoclonales antiCD34-PE, antiCD34-FITC, antiCD41-PE, antiCD61-FITC, Faloidina-Rodamina y DAPI.

La pureza de los cultivos y el conteo final de las células obtenidas fueron determinados por citometría de flujo utilizando en un citómetro CYAN ADP™ (Dako). Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD34-PE-Cy7, CD45-PE-Texas Red, CD41-PE y CD61-FITC. Se realizó una pequeña variación al protocolo de la Guía ISHAGE (Keeney et al., 1998) introduciendo los anticuerpos antiCD41 y antiCD61 utilizando las mismas concentraciones y volúmenes que el resto de los anticuerpos. Fueron adquiridos al menos 10.000 eventos para cada muestra analizada y la calibración y conteo absoluto fue realizado mediante la utilización perlas.

V.2.6.- OBTENCIÓN DE ARN

Los cultivos fueron recolectados a los 14 días de iniciados. Previo a la extracción las células fueron lavadas en RPMI y luego centrifugadas, extrayendo el sobrenadante. La extracción de ARN se llevó a cabo de acuerdo al protocolo detallado en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Protocolo para extracción de ARN con algunas modificaciones a lo estipulado por el fabricante para optimizar la extracción.

1. Agregar 1000 μL de Trizol por cada $5-10 \times 10^6$ células.
2. Mezclar en vortex para homogeneizar.
3. Agregar 200 μL de cloroformo.
4. Mezclar en vortex para homogeneizar y reposar por 15 min.
5. Centrifugar a 12.000 x g durante 15 min.
6. Separar las fases y a la fase más clara agregar 500 μL de isopropanol.
7. Dejar reposar a 4°C durante 1 hora para que precipite.
8. Centrifugar a 12.000 x g durante 15 min.
9. Aspirar el sobrenadante y agregar 70% de metanol con agua DEPC.
10. Mezclar en vortex para homogeneizar.
11. Centrifugar a 12.000 x g durante 10 min.
12. Sacar el sobrenadante y dejar secar el pellet obtenido.
13. Agregar 20 μL de agua DEPC.

V.2.7.- EVALUACIÓN DEL ARN OBTENIDO

Se midió la concentración y se evaluó la pureza e integridad del ARN obtenido utilizando un NaDrop lite (Thermo Scientific) y electroforesis en geles de agarosa al 1%.

V.2.8.- SECUENCIACIÓN MASIVA POR NGS

Las muestras fueron liofilizadas en un liofilizador BW-18B Freeze dryer (Bluewave Industry Co., Ltd.) para luego proceder al envío de las mismas a un servicio de secuenciación externo (Macrogen Inc.).

Se realizó la secuenciación del ARN obtenido utilizando la tecnología Illumina.

Se generaron bibliotecas direccionales, y se realizó secuenciación pareada

(lecturas de 100 pb), obteniéndose como mínimo 20 millones de lecturas mapeables de cada muestra.

Se realizó el análisis de los datos brutos utilizando el programa FastQC.

V.2.9.- ANÁLISIS DE DATOS

Todos los resultados fueron analizados por dos investigadores independientes en régimen de ciego. Al menos fueron contadas 350 células de 5 campos diferentes de cada donante por cada muestra obtenida a lo largo del experimento, realizando cada procedimiento por triplicado. El análisis descriptivo y comparativo de las medidas de resumen y dispersión fue realizado utilizando el programa Origin 8.5, y las gráficas obtenidas también fueron realizadas utilizando el mismo programa.

VI.- RESULTADOS

VI.1.- PUESTA A PUNTO DE LAS TÉCNICAS A UTILIZAR PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MKs EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS EXTRAHEMATOPOYÉTICAS Y CON SMD 5q- AISLADO

VI.1.1- ANÁLISIS CITOMORFOLÓGICO DE MKs OBTENIDOS DE ASPIRADOS Y BIOPSIAS DE MO

La Figura 6 muestra MKs de distintos individuos, en donde se observa la hiperlobulación nuclear característica de esta estirpe celular, y también se puede observar el MK hipolobulado característico del SMD 5q- aislado (arriba a la derecha). Es bien notorio el gran tamaño de ellos en relación al resto de los componentes celulares de la MO.

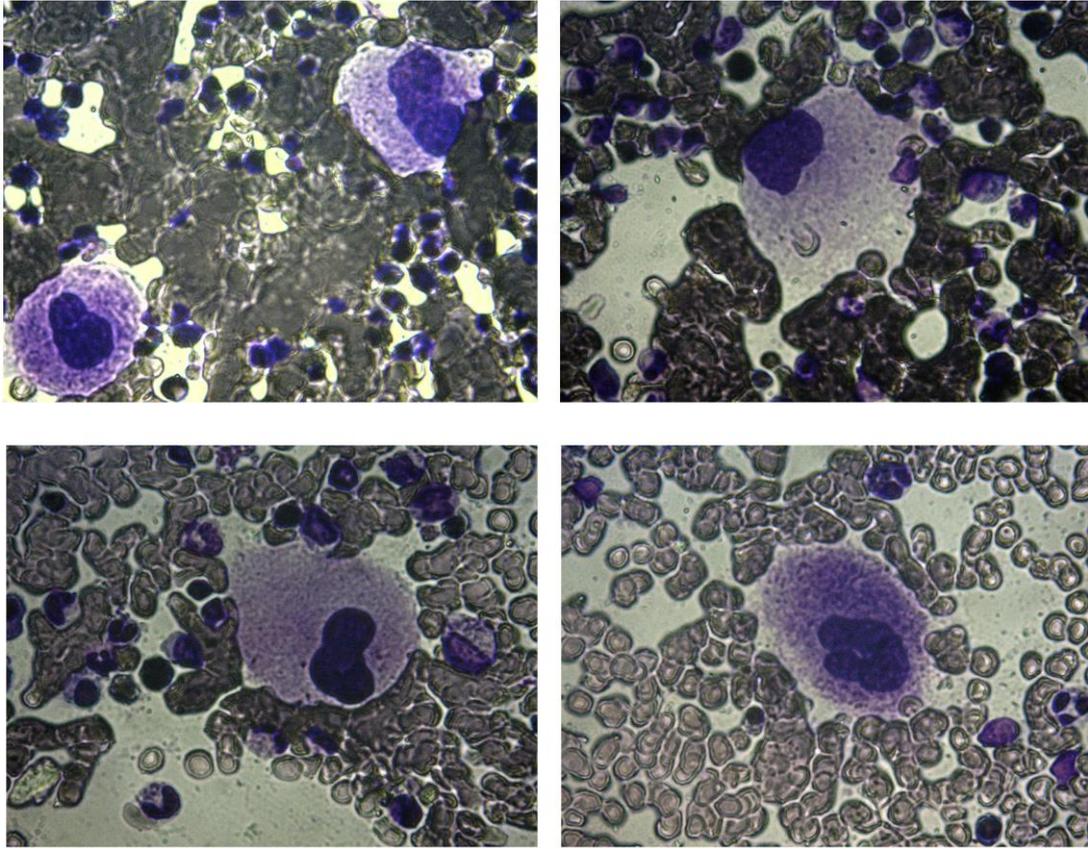


Figura 6.- Extendidos de aspirados y biopsias de MO de pacientes e individuos controles teñidos con la técnica de May Grünwald-Giemsa (100x). Se observan que los MK tienen un tamaño mayor y se colorean diferentes que el resto de los grupos celulares. También se puede visualizar los numerosos núcleos que poseen y la hipolobulación característica del Síndrome Mielodisplásico 5q- aislado (arriba a la derecha).

VI.1.2.- INMUNOCITOQUÍMICA CON MARCADORES ESPECÍFICOS DE LA MEGACARIOPOYESIS

A las muestras extendidas y fijadas en portaobjetos se les realizó inmunocitoquímica utilizando los anticuerpos monoclonales antiCD41 y antiCD61. La identificación nuclear fue efectuada mediante la utilización de DAPI. En la Figura 7 se puede observar también el gran tamaño celular en comparación con el resto, y el gran número de núcleos que poseen los MK. Las imágenes fueron adquiridas con MLC.

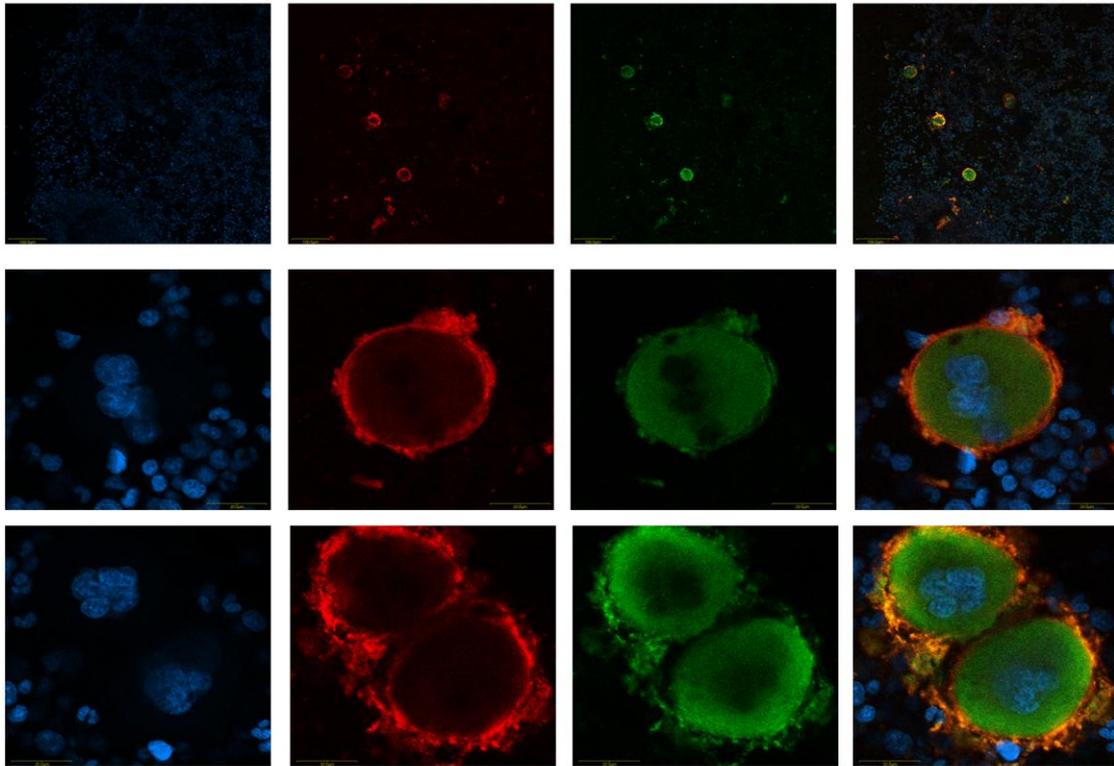


Figura 7.- Extendidos de aspirados de MO de individuos controles inmunomarcados con CD41PE (rojo) y CD61FITC (verde) (20x y 160x). Imágenes de MLC donde se aprecia la hiperlobulación nuclear característica de los MK teñidos con DAPI (azul). También se aprecia su mayor tamaño comparados con el resto de los grupos celulares.

La Figura 8 muestra el MK característico del SMD 5q- aislado. Se puede apreciar aquí también la hipolobulación nuclear.

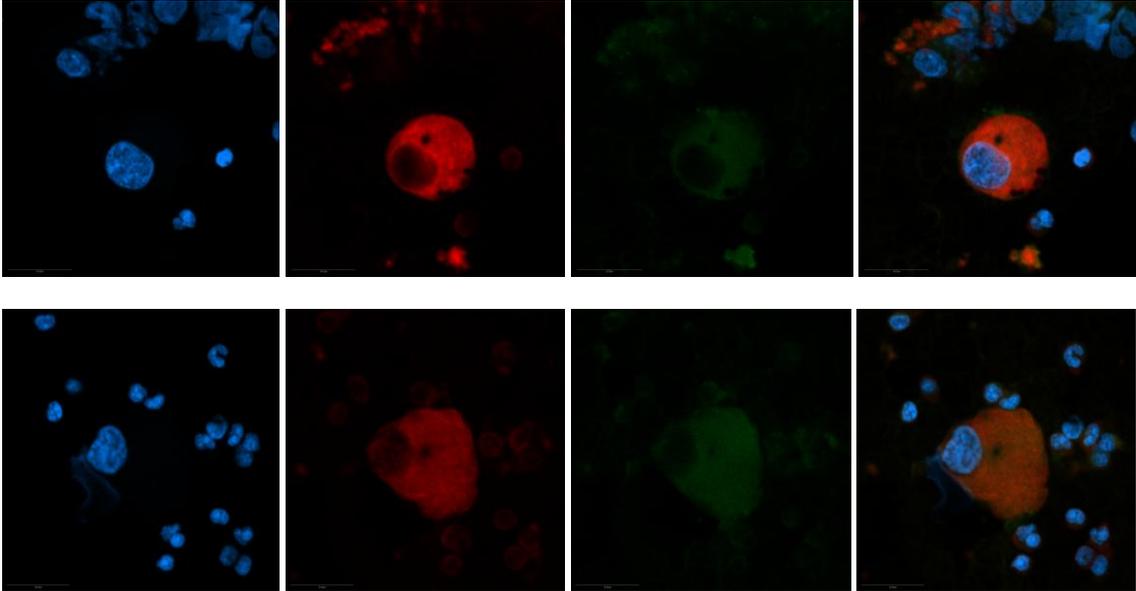


Figura 8.- Extendidos de aspirados de MO de pacientes con SMD 5q- aislado inmunomarcados con CD41PE (rojo) y CD61FITC (verde) (160x). Imágenes de MLC en las cuales se observa la hipolobulación nuclear característica de los MK del SMD 5q- aislado teñidos con DAPI (azul).

VI.1.3.- CITOQUÍMICA PARA EL ANÁLISIS DEL CITOESQUELETO

En la Figura 9 se ilustran MKs provenientes de aspirados de MO. Se puede observar la cantidad de núcleos que se generan por endomitosis empleando la tinción con DAPI.

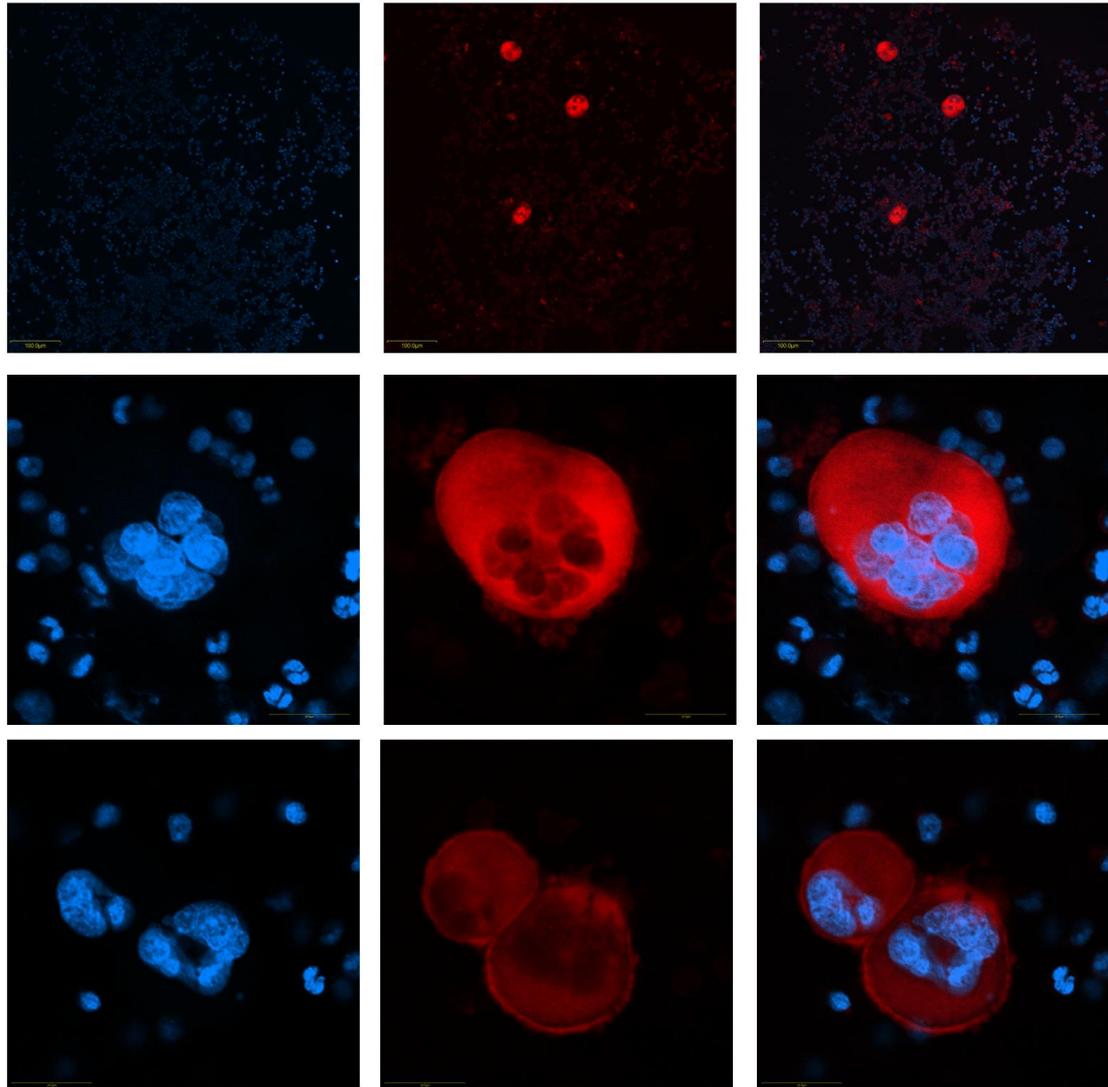


Figura 9.- Extendidos de aspirados de MO de individuos controles con Faloidina-Rodamina (rojo) y DAPI (azul) (20x y 160x). Imágenes de MLC en las cuales se presentan los núcleos teñidos con DAPI y el citoesqueleto coloreado con faloidina-rodamina. También se visualiza el gran tamaño megacariocítico en relación al resto de los linajes celulares alojados en la MO.

En la Figura 10 se pueden apreciar la distribución de los filamentos de actina en el citoesqueleto de MK hipolobulados característicos del SMD 5q- aislado. En la mayoría de ellos se puede observar que el contenido nuclear se encuentra cerca de la membrana celular.

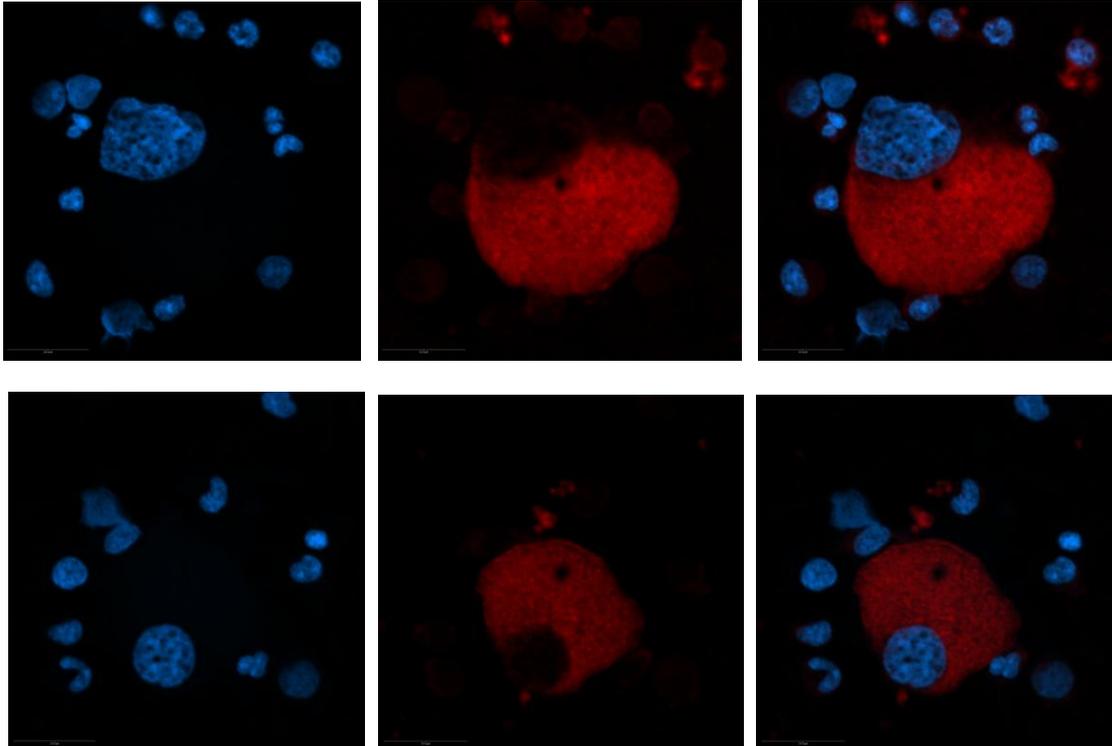


Figura 10.- Extendidos de aspirados de MO de pacientes SMD 5q- aislado teñidos con Faloidina-Rodamina (rojo) para visualizar el citoesqueleto y DAPI (azul) para detectar el núcleo celular (160x). Las imágenes muestran la peculiar localización nuclear en los bordes del citoplasma celular.

VI.2.- PURIFICACIÓN DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS

En base a lo descrito en materiales y métodos la purificación de células CD34+ de los productos de leucoaféresis se realizó utilizando la tecnología MACS. Se realizó un conteo celular y se comprobó la viabilidad celular de cada muestra en forma previa (Figura 11 a) y posterior (Figura 11 b) a la purificación utilizando 7AAD mediante citometría de flujo.

La viabilidad celular en los cinco casos fue mayor o igual al 90% después de la purificación. En la Figura 11 se muestran los gráficos de puntos de dos de los cinco donantes. Los otros tres donantes reflejaron resultados similares pre- y post-purificación.

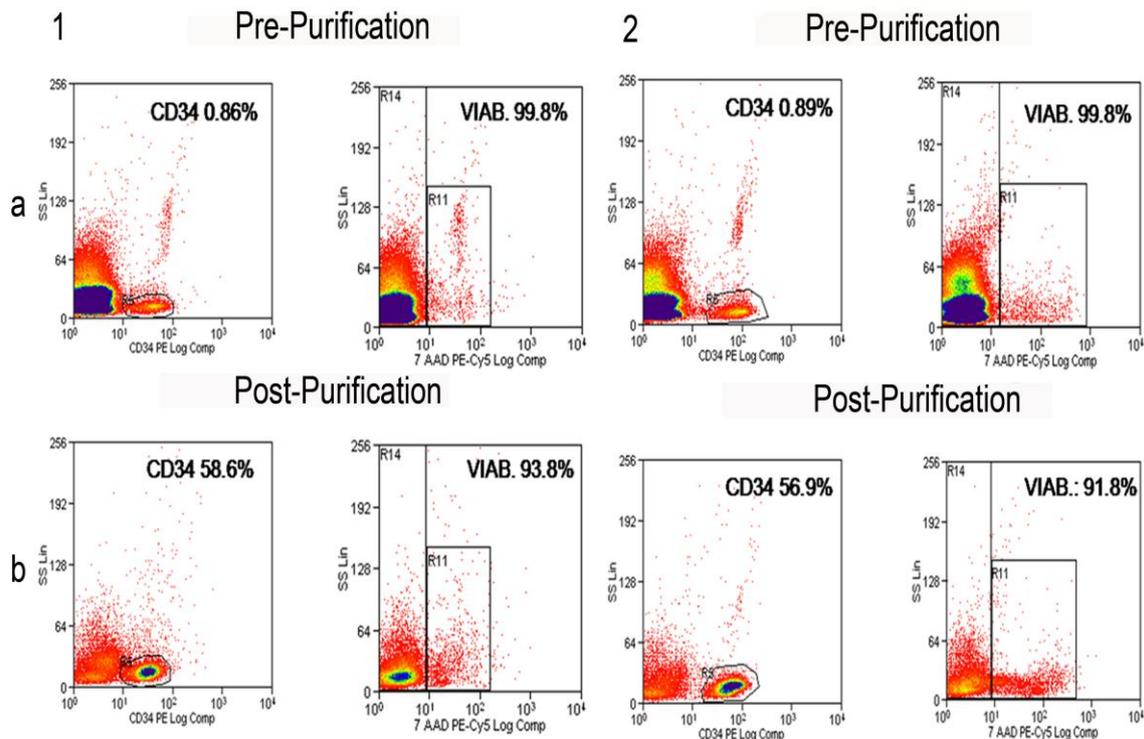


Figura 11.- Purificación de células CD34+ movilizadas de MO utilizando MACS. Los dot plots de citometría de flujo reflejan el porcentaje de células CD34+ y la viabilidad celular en dos donantes diferentes (1 y 2) previo (a) y posterior (b) a la purificación. Las células fueron marcadas con anticuerpos antiCD34 para obtener el porcentaje en relación al total de células. La viabilidad fue evaluada utilizando 7-AAD. Resultados similares se obtuvieron en los tres donantes restantes.

VI.3.-OBTENCIÓN DE MEGACARIOCITOS POR DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS CD34+

Las células purificadas utilizando la tecnología MACS fueron puestas en cultivo, observadas y fotografiadas cada dos días de manera de controlar el estado y la evolución de los mismos. Se tomaron imágenes directamente de los cultivos como se muestra en la Figura 12 en la cual se ilustra el crecimiento y diferenciación megacariocítica durante los 14 días de cultivo.

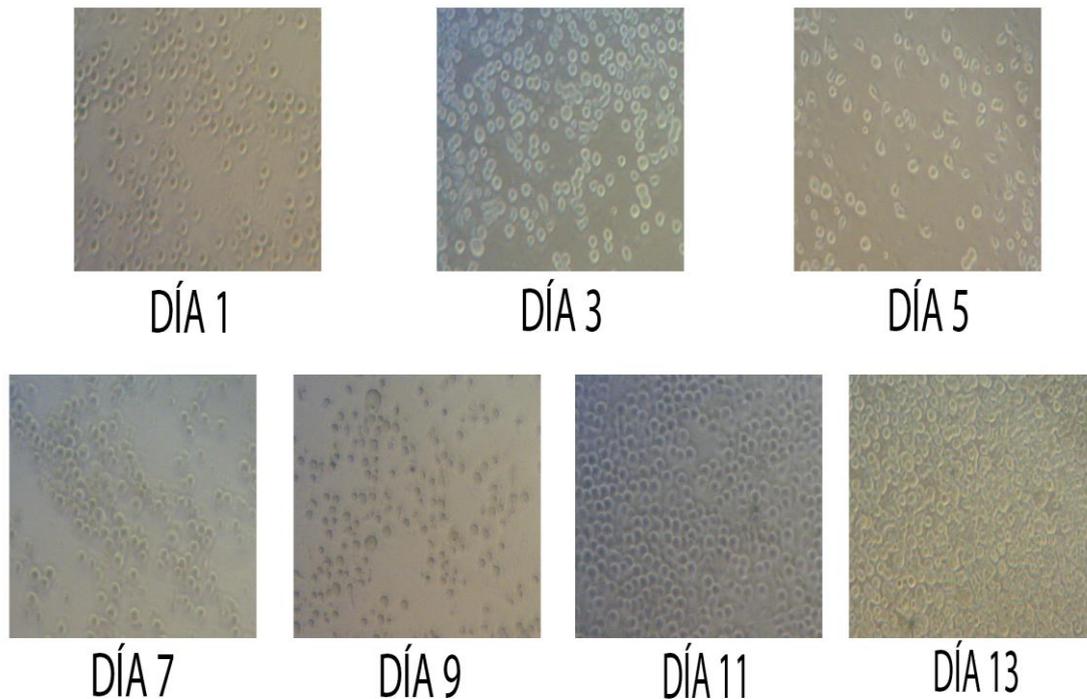


Figura 12.- Cultivos celulares de MK a partir de precursores de MO. Se puede observar la evolución de los cultivos cada dos días. Las imágenes (40x) fueron adquiridas directamente de los pocillos de cultivo utilizando un microscopio invertido.

VI.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES DE MEGACARIOCITOS

VI.4.1.- MAY GRÜN WALD-GIEMSA

La Figura 13 muestra el desarrollo de los cultivos y la diferenciación megacariocítica utilizando la tinción May Grünwald-Giemsa, desde el primer día hasta el día 13. Este relevamiento permitió analizar las características morfológicas, densidad y evolución de los cultivos. Se puede observar la presencia de grandes protrusiones celulares en los días 3 y 5 (flechas) las cuales ya no son tan evidentes en los días subsiguientes.

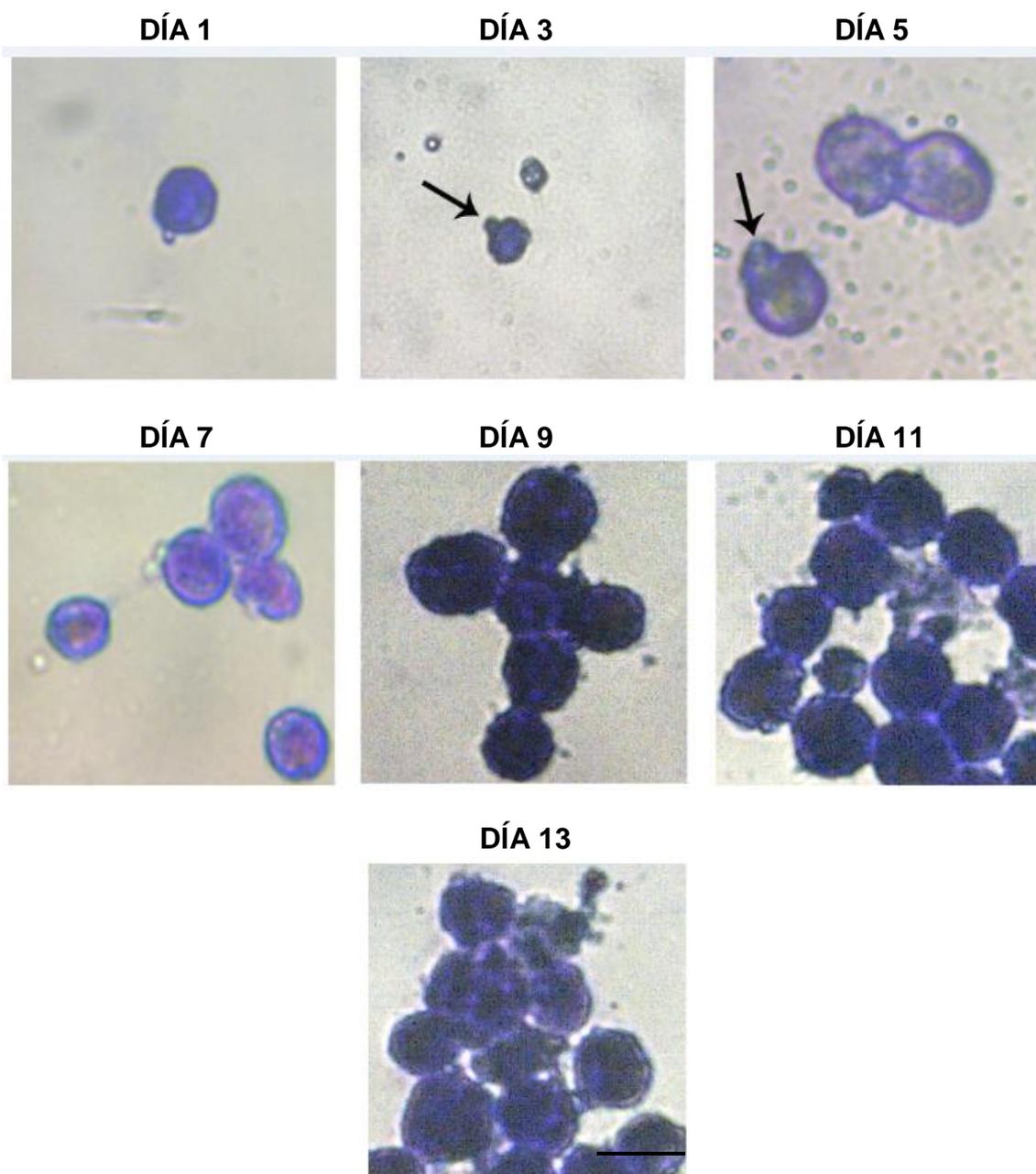


Figura 13.- Morfología de los cultivos celulares en medio libre de suero suplementados con TPO desde el día 1 al día 13. Imágenes tomadas mediante microscopía óptica de luz (100x) de extendidos con tinción May Grünwald-Giemsa. Se puede observar el desarrollo del cultivo a lo largo del experimento. Nótese las grandes protrusiones celulares (flechas) presentes en los días 3 y 5 que no se evidencian durante el resto de los días en cultivo (barra: 40 μ m).

Dichas estructuras (flechas) fueron observadas directamente en los pocillos de cultivo celular tal como se puede observar en la Figura 14. Sólo fueron evidenciadas desde el día 3 hasta el día 7 de cultivo.

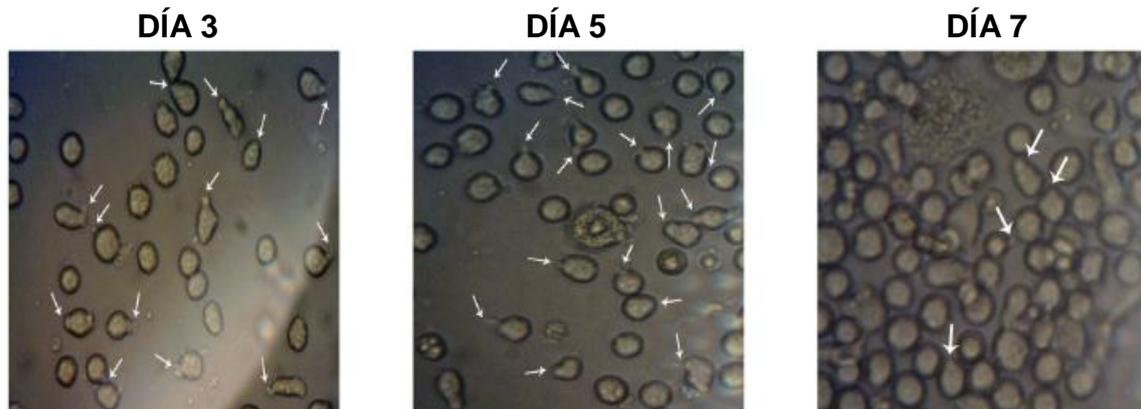


Figura 14- Protrusiones celulares durante la primera semana de cultivo. Imágenes de microscopía de contraste de fases (40x) directamente de los cultivos celulares en las cuales se observan las protrusiones (flechas) en los días 3, 5 y 7.

El porcentaje de células que presentaban protrusiones en relación al total fue calculado mediante el conteo de ellas tanto en láminas con tinción de May Grünwald-Giemsa como directamente de los pocillos de cultivo. Este relevamiento reflejó los valores que se muestran en el gráfico de la Figura 15.

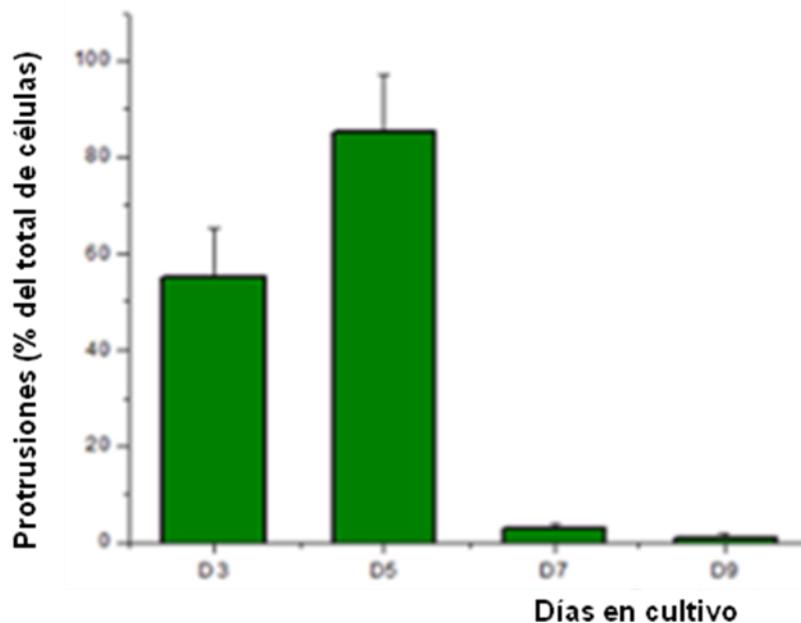


Figura 15.- Porcentaje de células con protrusiones. El gráfico refleja el porcentaje de células con protrusiones en relación al total de células. El valor máximo fue observado al día 5. Al día 7 los valores decrecen drásticamente.

Se constató un aumento de células con protrusiones en el día 3, llegando a un pico máximo en el día 5 en todos los donantes, y disminuyendo abruptamente al día 7.

VI.4.2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD34

Se realizó también el análisis de los cultivos celulares utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD34 (Figura 16). La señal CD34 se puede visualizar hasta el día 5 inclusive, estando prácticamente ausente a partir del 7 y hasta el final del experimento (día 14). En el día 3 se puede observar que la señal de CD34 se incrementa en un polo de la célula hasta que en el día 5 se concentra completamente en ese polo.

En el gráfico de la Figura 17 se presenta la cuantificación realizada para CD34 entre los días 3 al 7. Se observó una disminución significativa al día 6, disminuyendo aún más en el día 7.

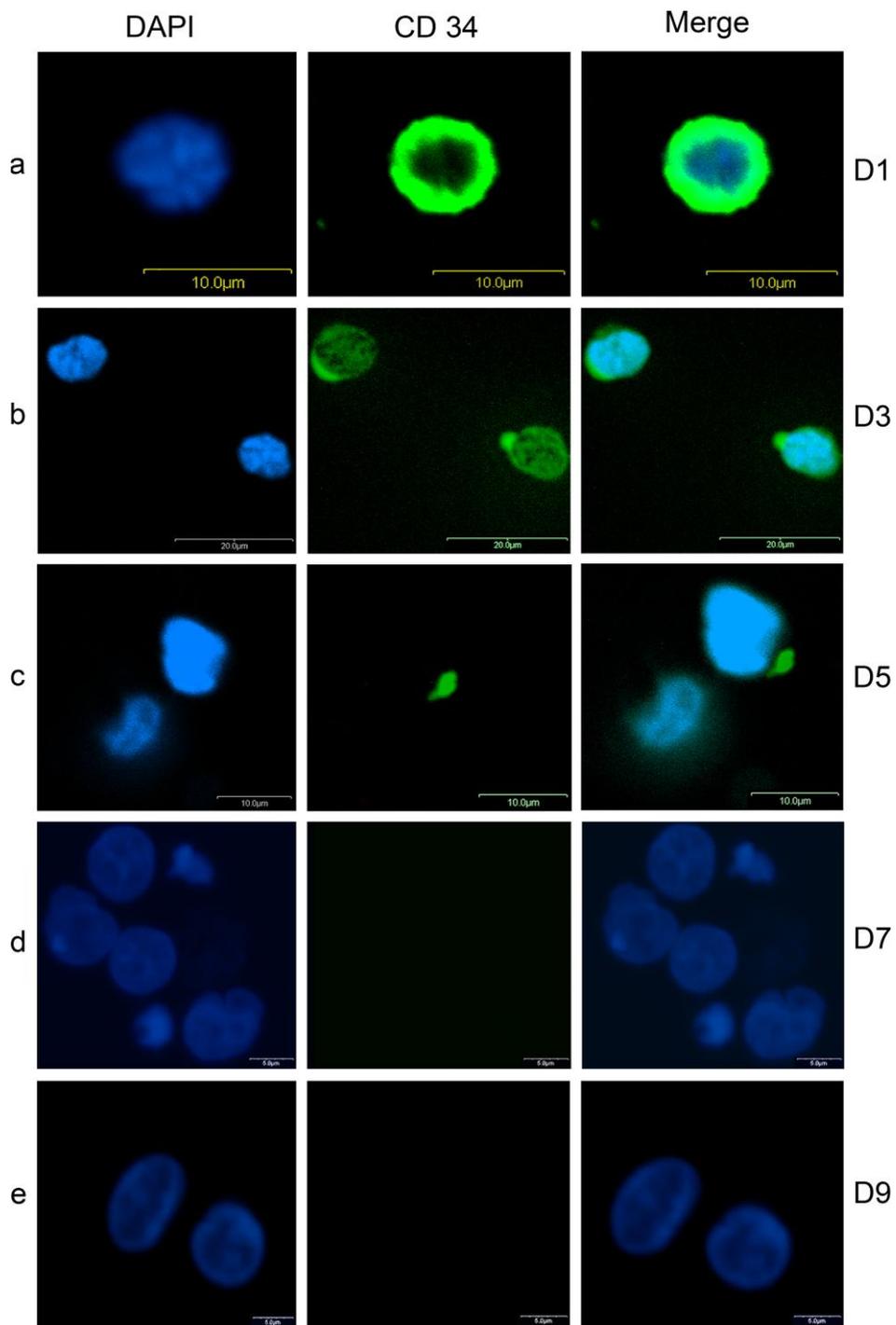


Figura 16.- Expresión de CD34 desde el día 1 hasta el día 9. Las imágenes de MLC muestran que la expresión de CD34 (verde) es observada hasta el día 5 de cultivo (a y c 200x, b 160x). En el día 7 no se evidencia señal CD34 en casi todas las células y al día 9 en ninguna (d y e 160x). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul).

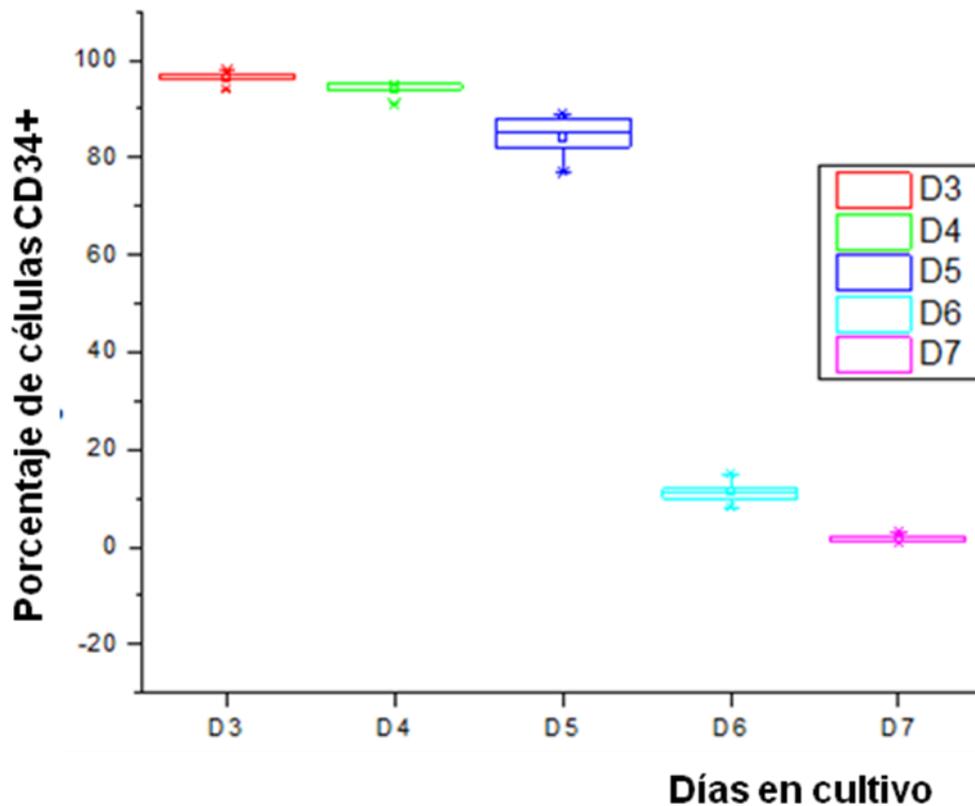


Figura 17.- Cuantificación de CD34 durante los días 1 a 9 de cultivo. Se observa una disminución significativa de células CD34+ en el día 7 el cual disminuye más aún al día 9. Los valores observados muestran las medidas de posición y dispersión de los 5 donantes.

VI.4.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD41 y CD61

La utilización de estos marcadores permitió constatar la diferenciación megacariocítica. Como se puede visualizar en la Figura 18 la señal de los dos marcadores se aprecia recién a partir del día 7, no evidenciándose señal del día 1 al día 5. A su vez, las señales permanecieron hasta el día 13.

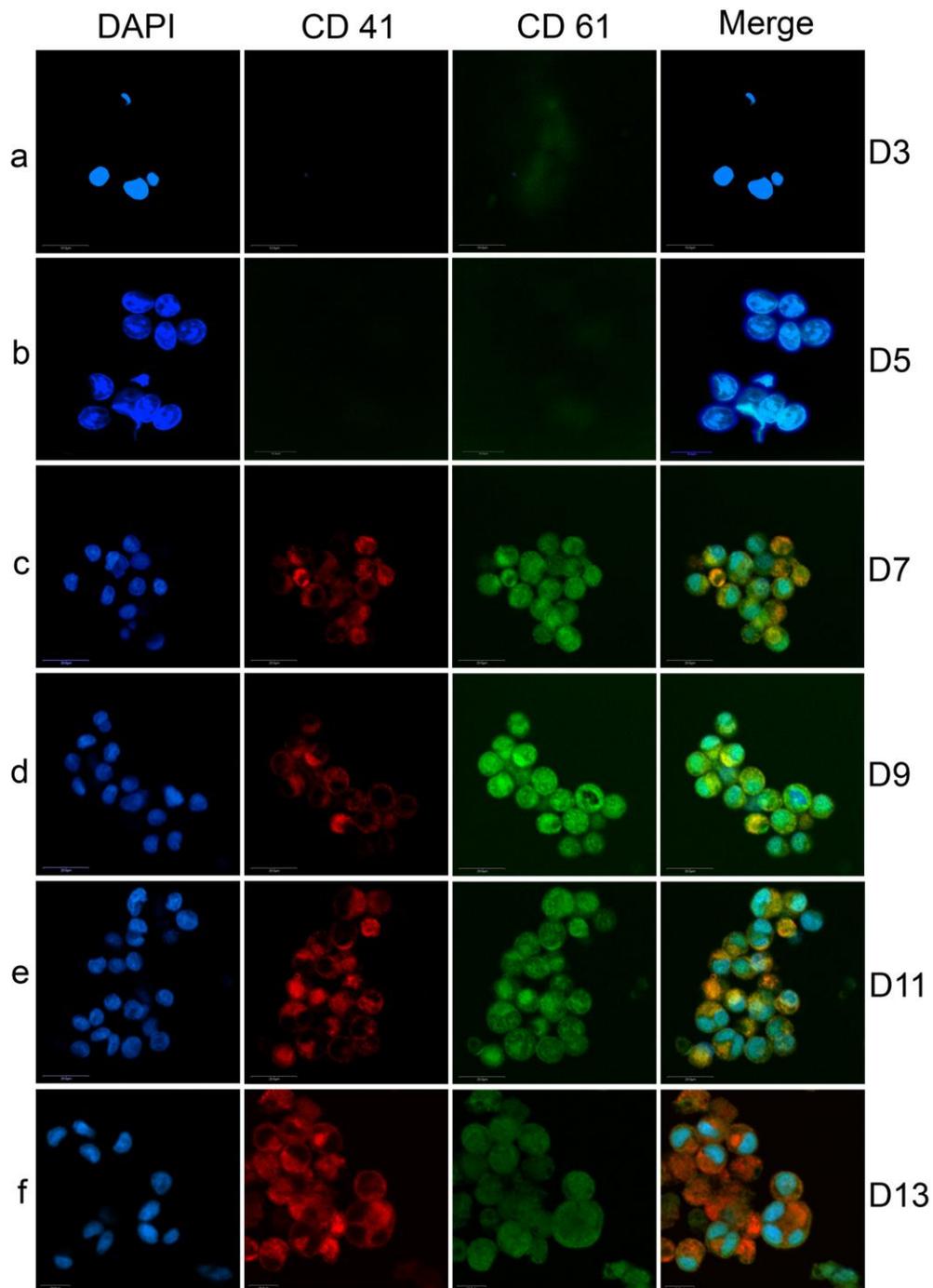


Figura 18.- Expresión de CD41 y CD61 durante los días de cultivo. Las imágenes tomadas por MLC (a-e 160x, f 200x) muestran que hasta el día 5 inclusive no aparece señal para ninguno de los marcadores (a y b). Recién en el día 7 las señales para CD41 (rojo) y CD61 (verde) son positivas (c). Ambas señales permanecieron hasta el día 13 inclusive (d-f). Los núcleos celulares se evidenciaron utilizando DAPI (azul).

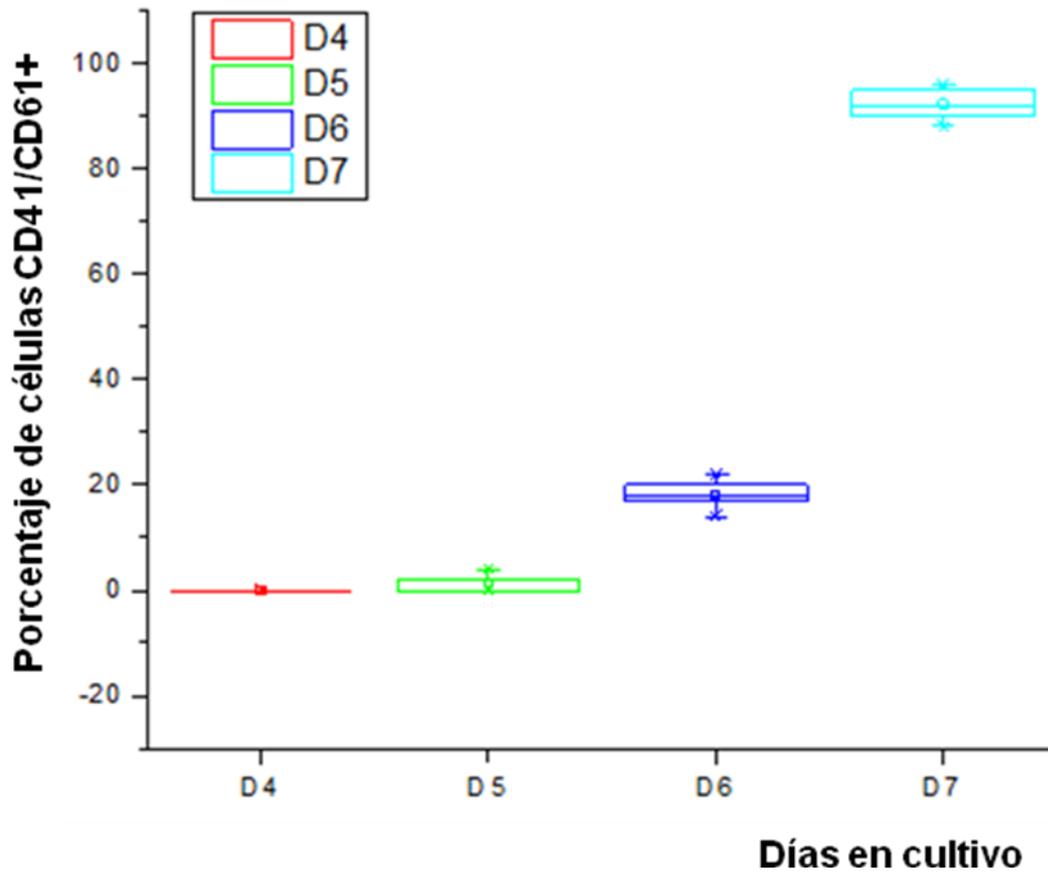


Figura 19.- Cuantificación de CD41/CD61 durante los días 4 a 7 de cultivo. Se observa un incremento significativo de ambos marcadores en el día 6 el cual se vuelve más pronunciado al día 7. Los valores observados muestran las medidas de posición y dispersión de los 5 donantes.

En la Figura 19 se aprecia la cuantificación realizada para los marcadores CD41 y CD61 entre los días 4 y 7, período durante el cual se observa un leve aumento en el día 6, siendo el aumento considerablemente mayor en el día 7.

VI.4.4.- CUANTIFICACIÓN UTILIZANDO CITOMETRÍA DE FLUJO

Se realizó la cuantificación de CD34 y CD41/CD61 mediante citometría de flujo.

Se observó también un comportamiento similar de los marcadores al obtenido por conteo directo (Figura 20).

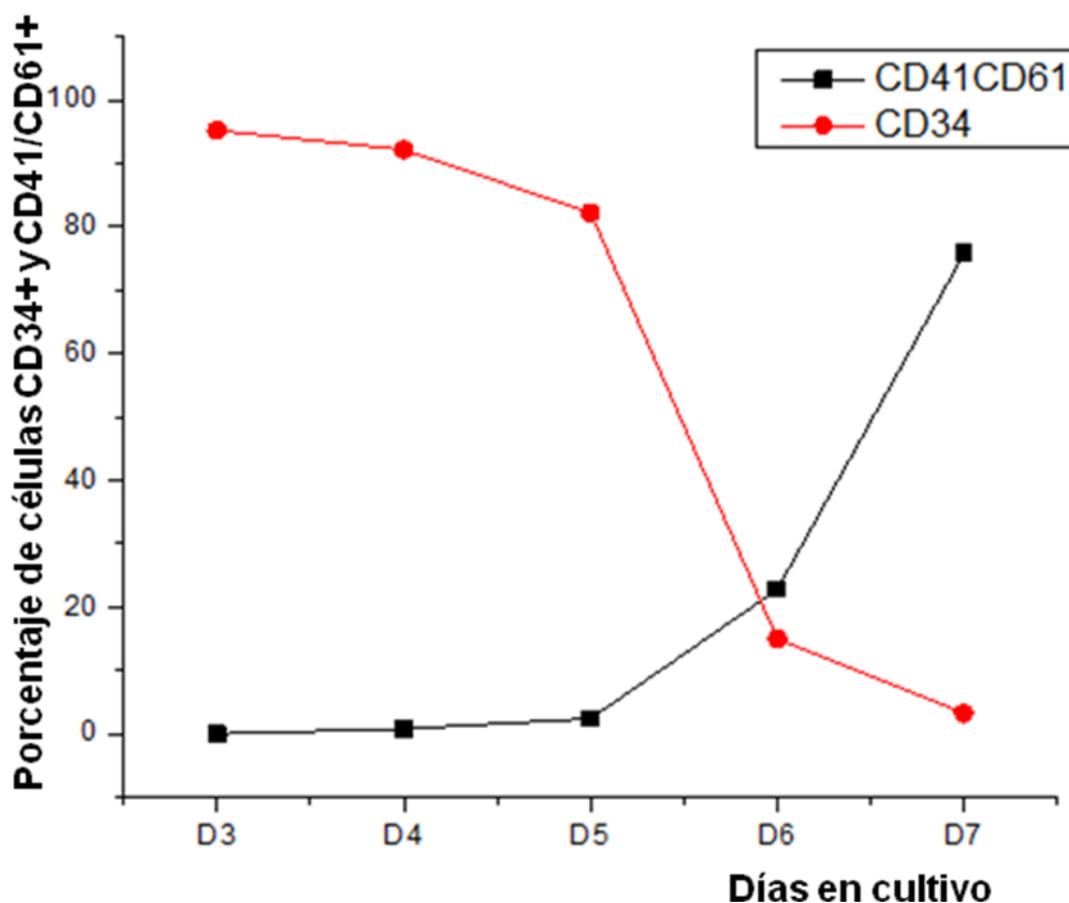


Figura 20.- Cuantificación de CD34 y CD41/CD61 utilizando citometría de flujo durante los días 3 a 7 de cultivo. Se observa un incremento significativo de CD41/CD61 en el día 6 el cual se vuelve más pronunciado al día 7. Al contrario el decremento de CD34 es significativamente notable al día 6, disminuyendo aún más al día 7. Los valores observados muestran las medidas de posición de los 5 donantes.

VI.4.5.- ANÁLISIS DE CD34 Y EL CITOESQUELETO EN EL DÍA 3

La estructura denominada como protrusión, la cual era inmunopositiva frente a CD34 condujo a la utilización de técnicas de alta resolución como SIM y AFM para confirmar y sustentar el proceso visualizado.

Como se comentó anteriormente, al día 3 de cultivo se observa una concentración de CD34 en un polo de la célula (Figura 21 a, flecha). Esa estructura fue constatada utilizando microscopía de alta resolución. La Figura 21 b muestra una imagen adquirida por SIM con dos clones diferentes del anticuerpo antiCD34, uno conjugado con FITC (verde) y otro con PE (rojo). Se evidencia la superposición de ambas señales en el cuerpo celular y en la estructura previamente mencionada. En la Figura 21 c se puede constatar esa misma estructura mediante epifluorescencia (izquierda) y es visualizada a nanoresolución por AFM (centro y derecha). Estas aproximaciones permitieron distinguir que la estructura a la cual se denominó protrusión comienza a separarse del cuerpo celular. Por último en la Figura 21 d se puede observar un reordenamiento en la actina-F del citoesqueleto, el cual acompaña este proceso de acumulación de CD34.

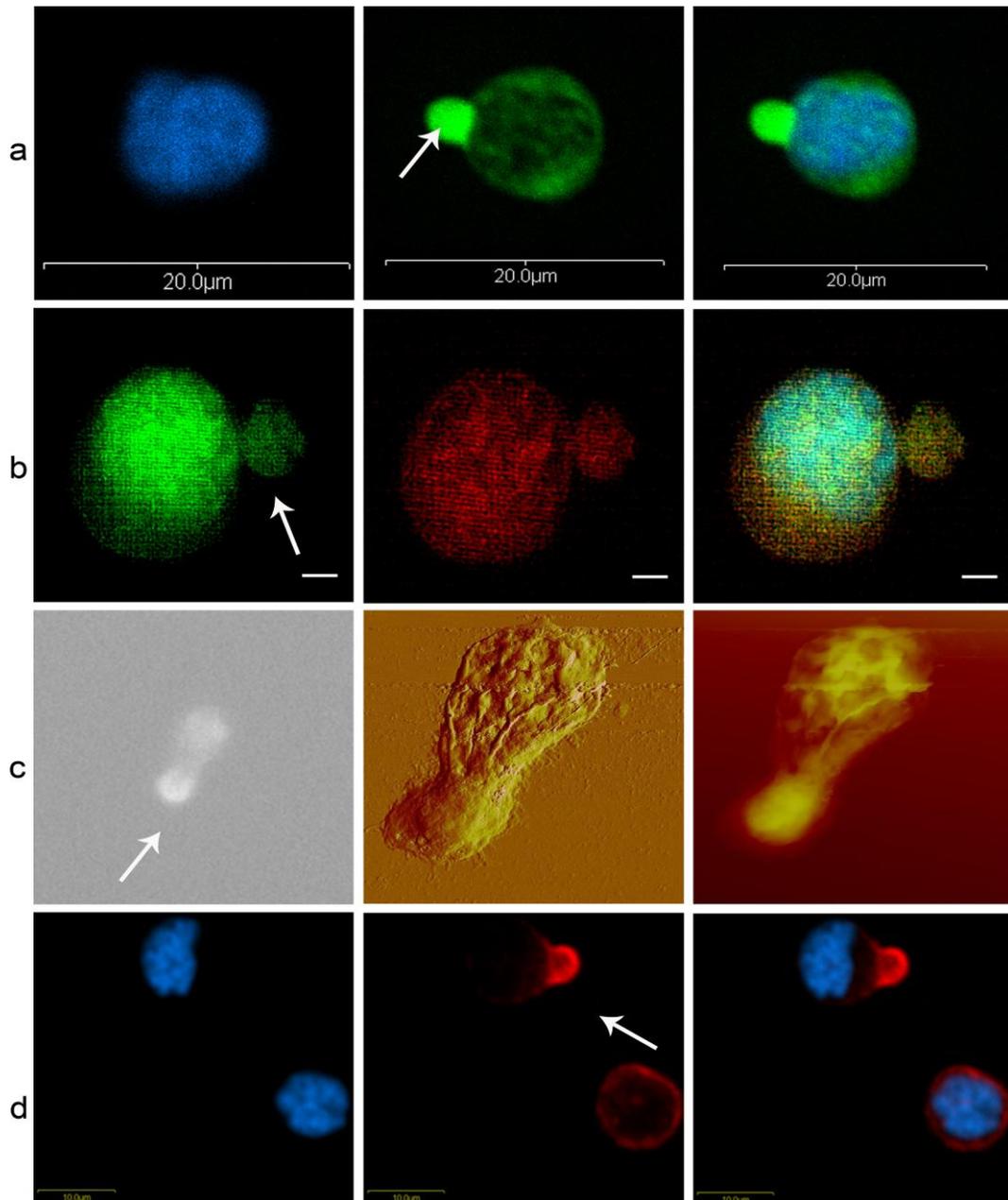


Figura 21.- Morfología de los cultivos al día 3. (a) Imagen de MLC (160x) donde la señal correspondiente a CD34 (verde) se encuentra concentrada en una protusión celular (flecha). (b) Imagen de SIM que muestra la colocalización de las señales de CD34FITC (verde) y CD34PE (rojo) tanto en el cuerpo celular como en la protusión (flecha) (barra = 2 μ m). (c) Imagen de epifluorescencia (izquierda) evidenciando mayor intensidad de señal en la protusión (flecha) que en el resto del cuerpo celular. Las imágenes de MFA (20 μ m x 20 μ m) error (medio) y altura (derecha) reflejan que la protusión comienza a desprenderse del cuerpo celular. (d) Imagen de MLC (200x) mostrando un reordenamiento en la actina del citoesqueleto en la protusión celular (flecha). La célula vecina muestra un citoesqueleto normal. Los núcleos y filamentos de actina fueron evidenciados con DAPI (azul) y Faloidina-Rodamina, respectivamente.

VI.4.6.- ANÁLISIS DE CD34 EN EL DÍA 5

En el día 5 la señal de CD34 se halla localizada casi exclusivamente en una región de la membrana celular tal cual lo confirman las imágenes tomadas por MLC (Figura 22 a) que ponen de manifiesto la co-localización de las señales de dos clones del mismo anticuerpo al igual que las imágenes adquiridas con SIM de la Figura 21 b.

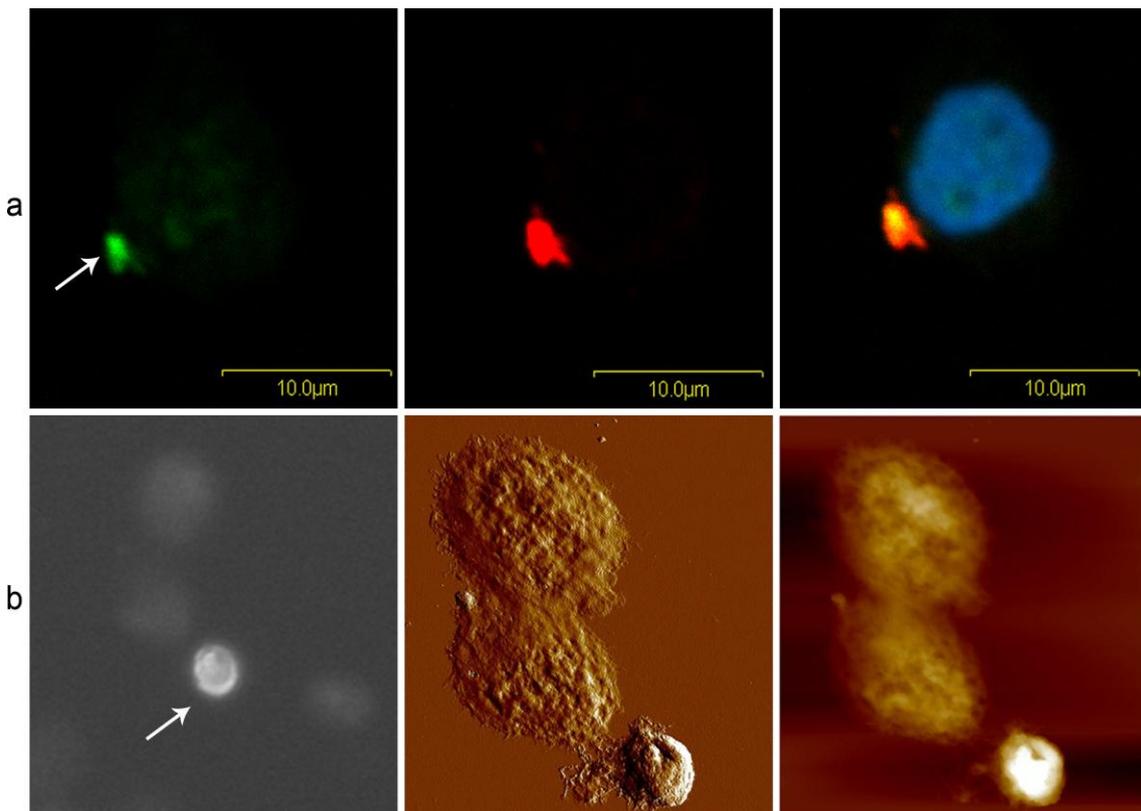


Figura 22.- Morfología de los cultivos celulares al día 5. (a) Imágenes de MLC (200x) que muestra la inmunomarcación con CD34FITC (verde, izquierda) y CD34PE (rojo, centro). Las señales se visualizan concentradas y colocalizadas en una estructura particular (flecha), la cual se presenta separada del resto del cuerpo celular como sugiere la imagen compuesta de DAPI (azul) y los dos marcadores para CD34 (derecha). (b) Imagen de epifluorescencia (izquierda) evidenciando que la señal de CD34 se concentra en la protrusión (flecha) pero es mínima en el cuerpo celular. Las imágenes de MFA (30 μm x 30 μm) error (medio) y altura (derecha), muestran y confirman que esta peculiar estructura ya se encuentra separada de la célula.

La adquisición de imágenes por epifluorescencia (Figura 22 b izquierda) y AFM (Figura 22 b centro y derecha) evidencian ya la total separación de la estructura CD34 positiva del resto del cuerpo celular.

VI.5.- ANÁLISIS DE LA PUREZA DE LOS CULTIVOS CELULARES DE MEGACARIOCITOS

Los cultivos fueron detenidos en el día 14 y fue analizada la pureza de los MK obtenidos por citometría de flujo para la posterior extracción de ARN.

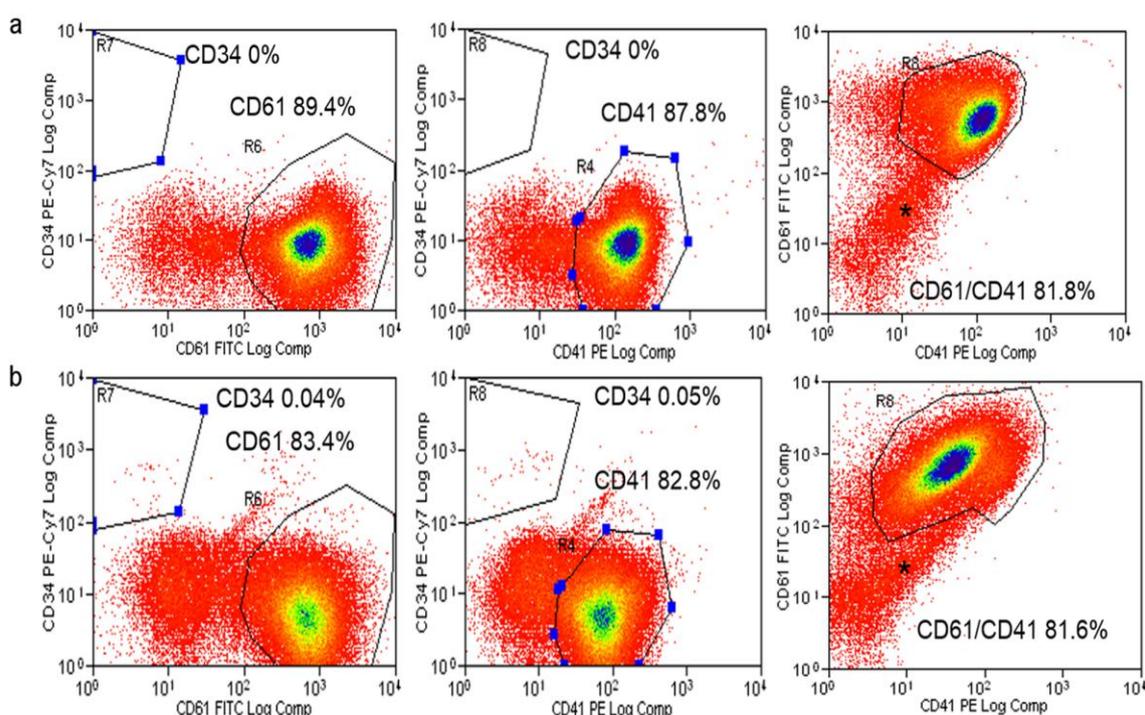


Figura 23.- Expresión de CD34, CD41 y CD61 al final del experimento. Los diagramas de puntos (*dot plots*) de citometría de flujo muestran la casi completa ausencia de células CD34+ (paneles de la izquierda y el medio) en el día 14. Al contrario, CD41 y CD61 reflejan altos valores los cuales sobrepasan el 80% (izquierda y medio). Los paneles de la derecha permiten observar el porcentaje relativo de CD41 y CD61. Los datos presentados provienen de dos (a y b) de los cinco donantes. Los tres donantes restantes mostraron un comportamiento similar. El asterisco negro representa la población de plaquetas la cual fue discriminada utilizando la dispersión frontal y lateral del citómetro de flujo.

Las células CD41+/CD61+/CD34- fueron definidas como MKs y constituyeron el 81 al 87% del total de las células obtenidas, mientras que el porcentaje de

células CD34+ al final del cultivo osciló entre el 0 y 0.05% en todos los cultivos (Figura 23).

VI.6.- EVALUACIÓN DEL ARN EXTRAÍDO

Se realizó la extracción del ARN de los MKs obtenidos en el día 14 de cultivos celulares de los cinco donantes de precursores de MO. Se evaluó la integridad y la concentración del ARN obtenido mediante la utilización de NanoDrop® (Tabla 1) y electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 24).

La Tabla 1 muestra que las concentraciones y volúmenes de ARN extraído fueron óptimos para su posterior uso en la secuenciación masiva.

Tabla 1.- Valores obtenidos por citometría de flujo y NanoDrop® de tres de los cinco donantes. Se puede apreciar el sexo de cada donante. El porcentaje de MK y de células CD34+ al final del experimento obtenido por citometría de flujo. La relación 260/280 de cada extracción de ARN y las concentraciones fueron obtenidas mediante la utilización de NanoDrop®.

DONANTE	SEXO	MKs	CD34+	260/280	ng/μL	μg
1	M	89,44%	0,00%	1,8	383	34,1
2	M	87,35%	0,03%	1,9	581,4	15,2
3	F	83,49%	0,05%	2,1	145,6	12,76

En la Figura 24 se puede observar la integridad del ARN extraído de dos de los cinco donantes, así como las bandas en los que se encuentran los ARN ribosomales y pequeños ARN.

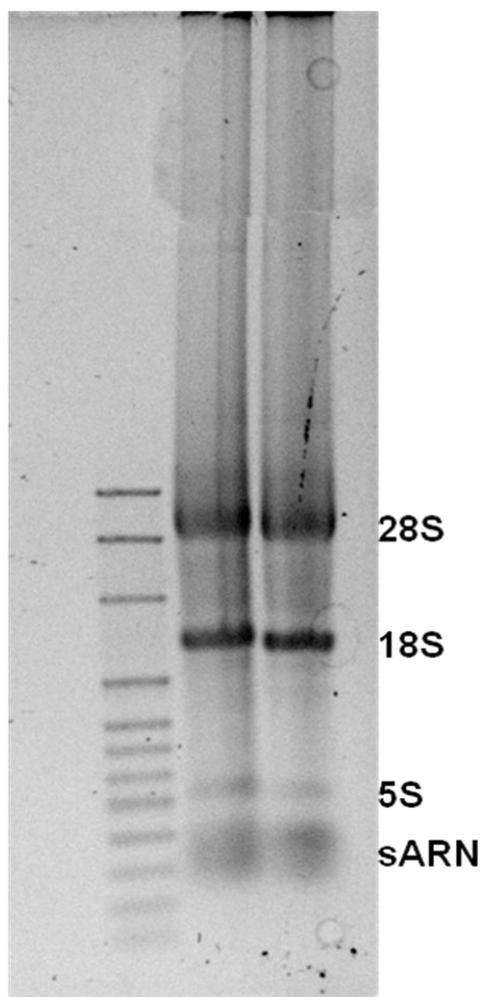


Figura 24.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Fotografía tomada por una cámara Carestream en donde se pueden observar la corrida electroforética de dos de las cinco muestras (carril del medio y de la derecha). Se aprecia una muy buena integridad del ARN extraído, observándose las bandas de ARN ribosomales 28S, 18S y 5S, como una banda que contiene a las especies de ARN pequeños (sARN). En el carril de la izquierda se colocó un marcador de peso molecular.

VI.7.- OBTENCIÓN DE LOS TRANSCRIPTOMAS UTILIZANDO NGS Y ANÁLISIS DE LOS DATOS BRUTOS

La secuenciación masiva fue realizada por un servicio externo (Macrogen Inc.) tal cual fue solicitada y detallada anteriormente en materiales y métodos. Las figuras y tablas siguientes muestran los resultados para uno de los donantes.

Tabla 2.- Informe sobre la solicitud de secuenciación. Se realizaron lecturas pareadas de 101 pb utilizando un secuenciador HiSeq 2000.

Type of Read	Paired-end
Read Length	101
Number of Samples	1
Library Kit	TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Gold)
Library Protocol	TruSeq Stranded Total RNA Sample Prep Guide, Part # 15031048 Rev. E
Reagent	TruSeq SBS Kit v3
Sequencing Protocol	HiSeq 2000 System User Guide Part # 15011190 Rev. V HCS 2.2.38
Type of Sequencer	HiSeq 2000
Sequencing Control Software	HCS v2.2

La Tabla 2 exhibe los detalles sobre la solicitud de secuenciado para una de las muestras y la Tabla 3 presenta los resultados de la biblioteca generada.

Tabla 3.- Resultado de la biblioteca generada por NGS para una de las muestras. Para la muestra de leucoaféresis 3 (L3MK) se obtuvieron los siguientes tamaños y concentraciones de ARN.

#	Library Name	Library Type	Conc. (ng/ul)	Conc. (nM)	Size (bp)	Result*	
1	L3MK	TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold	57.13	326.75	269	Pass	

Para la visualización de los datos obtenidos por secuenciación del ARN de los MK obtenidos se utilizó el programa FastQC. El reporte obtenido por dicho programa se puede observar en las siguientes figuras y tabla. En la Figura 25

se puede apreciar la calidad de la secuenciación, la cual según se puede constatar es de excelente calidad.

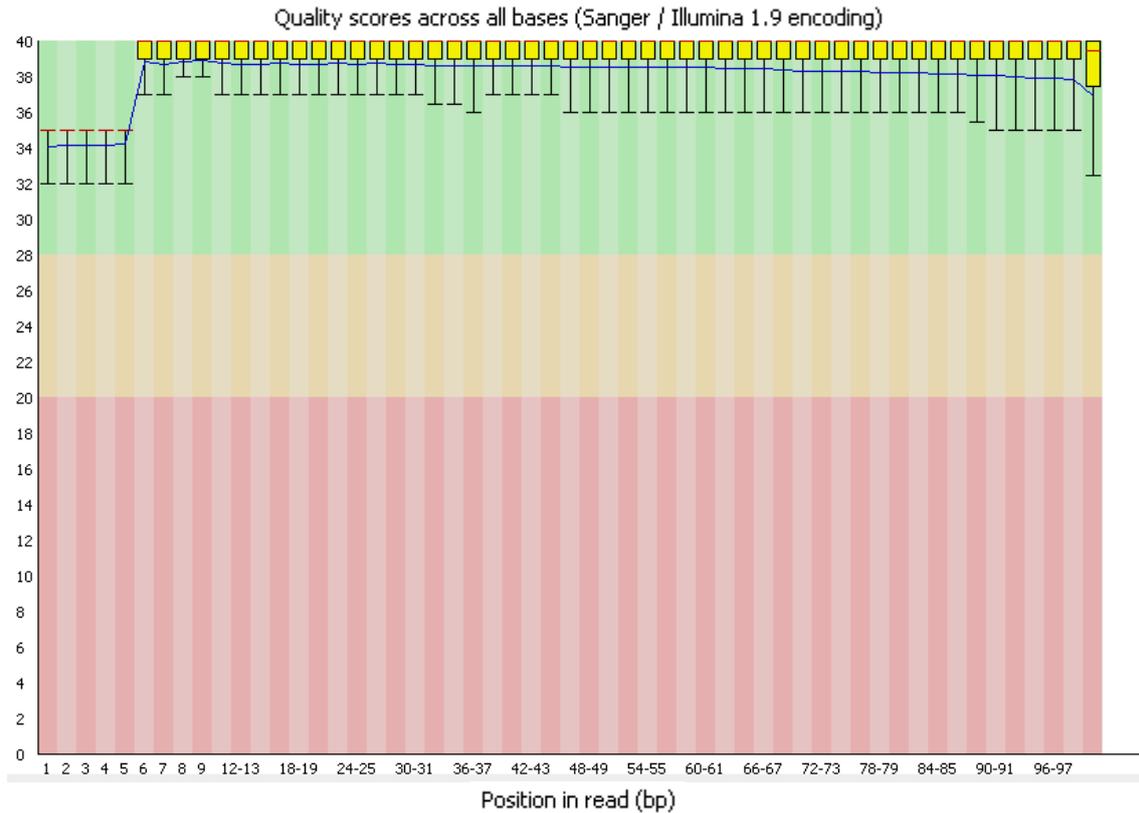


Figura 25 .- Calidad de la secuencia por base. Se puede observar una muy buena calidad de la secuenciación obtenida.

La Figura 26 pone en evidencia el contenido de GC por secuencia y la Figura 27 el contenido de bases raras, el cual muestra que no fue secuenciada ninguna base extraña. Todas las bases secuenciadas fueron reconocidas por la técnica de secuenciación empleada.

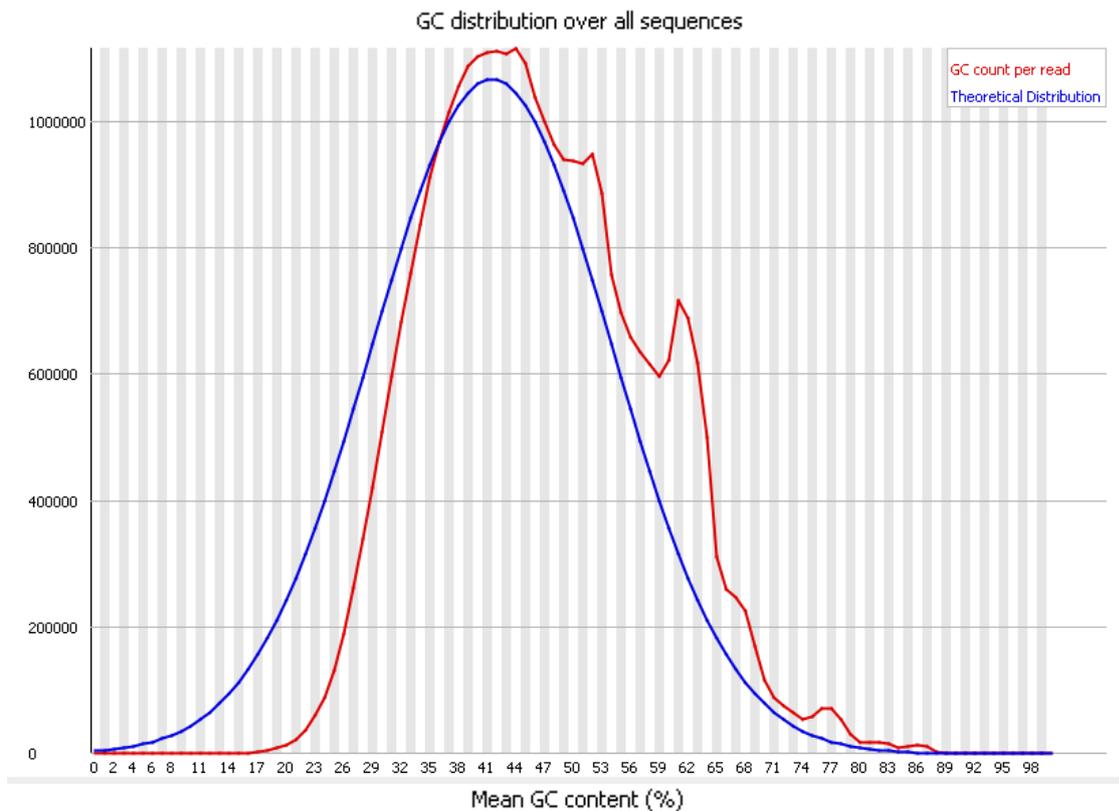


Figura 26 .- Contenido de GC por secuencia. Se observa un contenido de GC por lectura que difiere de la distribución teórica.

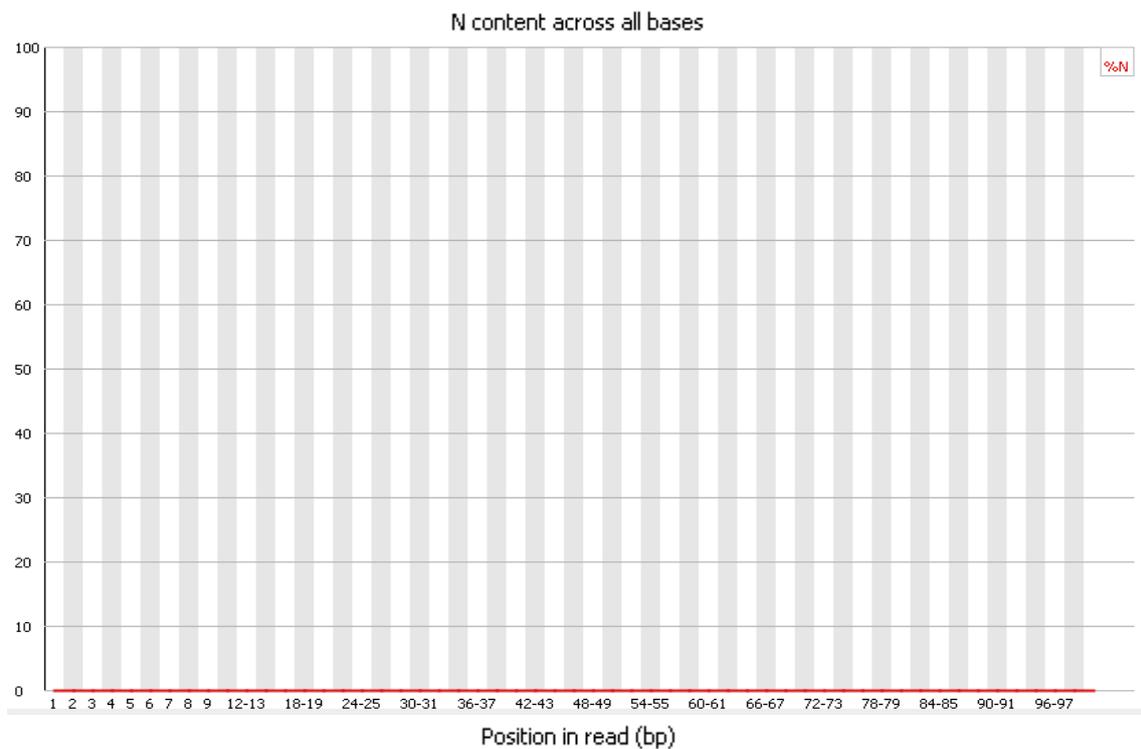


Figura 27.- Contenido de bases raras. El gráfico muestra ausencia de bases extrañas en la secuenciación obtenida.



Figura 28 .- Distribución de longitud de secuencia. Los fragmentos secuenciados muestran el tamaño solicitado previamente para su secuenciación.

En la Figura 28 se puede apreciar que la mayoría de los fragmentos obtenidos en la biblioteca son de 101 pares de bases tal cual fue solicitado a la empresa externa a la cual se le solicitó la secuenciación. En la Tabla 4 se muestran las secuencias que aparecen sobre-expresadas.

Tabla 4.- Secuencias sobre expresadas. Se pueden observar las secuencias sobre-expresadas de la secuenciación, así como el porcentaje relativo de ellas.

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
CTGGCTGCGACATCTGTCACCCCATTTGATCGCCAGGGTTGATTCGGCTGA	45419	0.13587397940449747	No Hit
CTGGGCTGTAGTGCGCTATGCCGATCGGGTGTCCGCACTAAGTTCGGCAT	36089	0.10796265973995266	No Hit

VII.- DISCUSIÓN

La capacidad de las CMH de auto-renovarse al tiempo que pueden diferenciarse para dar lugar al resto de las células del sistema hematopoyético es un fenómeno celular de gran relevancia (Mera Reina et al., 2007; Giebel y Brung, 2008; Seita y Weissman, 2010; Domínguez Pantoja et al., 2015). Un caso particular de este proceso se produce en la megacariopoyesis, en la cual a partir de CMH se obtienen MKs. Estos últimos presentan una estructura funcional normal bien característica y única lo cual los convierte en un modelo excepcional para su estudio. Un importante obstáculo para alcanzar este objetivo es su escasez en la MO por lo cual se requieren estrategias alternativas para realizar su análisis. Una de estas estrategias es la amplificación *in vitro* mediante el uso de cultivos celulares (Schulze y Shivdasani, 2005; Szalai et al., 2006; Yasui et al., 2005). En la presente Tesis se analizó la megacariopoyesis humana *in vitro* utilizando precursores movilizados de MO cultivados en medio de cultivo libre de suero.

Para la realización de los cultivos celulares fueron seleccionados productos de precursores purificados por la tecnología MACS cuya viabilidad fuese mayor o igual al 90%. Estos precursores fueron cultivados y evaluados durante los 13 días de incubación. Se constató la viabilidad, crecimiento y pureza de los cultivos celulares en el día 14 mediante la utilización de citometría de flujo. Los resultados obtenidos para los cinco donantes analizados evidenciaron un alto porcentaje de MKs (81 a 87%), un porcentaje menor de plaquetas (12 a 16%) (asteriscos en la Figura 23), y un casi nulo porcentaje de precursores CD34+ (0 a 0.05%), demostrando el éxito obtenido al final de los cultivos.

Los progenitores megacariocíticos expresan CD34 en su superficie y la diferenciación de los MKs puede ser evidenciada por la aparición y posterior aumento en la expresión de CD41 y CD61 (Schulze y Shivdasani, 2005). Nuestros resultados son congruentes con aquellos alcanzados por Pozner et al. (2010), Flechas et al. (2008), Guerriero et al. (1995), y Mattia et al. (2002) con algunas diferencias en el curso temporal debido al uso o no de distintos factores estimulantes de la megacariopoyesis y/o a las diferentes fuentes de obtención de precursores como es el caso de los del cordón umbilical. Es bien conocido que la pérdida de CD34 y la aparición de CD41 y CD61 indican la maduración de los MKs (González-Villalba et al., 2010; Ru et al., 2015), aunque la correlación entre la expresión de estos marcadores aún no ha sido dilucidada. Se sabe, además, que la desaparición de CD34 en los progenitores de MKs está asociada a la transición de una fase proliferativa a una no proliferativa (Debili et al., 1992), pero el hecho que la retención de la expresión de CD34 derive en consecuencias patológicas puede implicar que este antígeno también juegue un rol importante en la diferenciación de las CMH (Kling, 2011; Insuasti-Beltran et al., 2012). El seguimiento de la diferenciación megacariocítica utilizando CD34, CD41 y CD61 ha mostrado un notable decremento de CD34 en el día 6 y un considerable aumento de CD41 y CD61 que comenzó en el día 6 y se hizo mucho más abrupto en el día 7.

La caracterización de la diferenciación megacariocítica bajo las condiciones descritas en materiales y métodos ha proporcionado una nueva e importante contribución, dejando de manifiesto que aproximadamente a partir del día 3 de iniciado el cultivo un gran porcentaje de células ($\bar{x}=55\%$) presentan una

estructura peculiar en una región de la célula la cual denominamos como protrusión. Esta estructura fue detectada en un porcentaje de células mayor ($\bar{x}=85\%$) en el día 5, donde fue registrado el pico máximo. Dichas protrusiones dejaron de ser tan evidentes a partir del día 7 y hasta el final de los cultivos (día 14). Estos resultados fueron constatados en los 5 donantes empleando diversas técnicas de tinción y distintos abordajes microscópicos. Ya se ha descrito que las CMH cultivadas en medios suplementados con citoquinas presentan diferentes tipos de prolongaciones citoplasmáticas (Francis et al., 1998; Buggenthin et al., 2017) que podrían estar relacionados con movimientos fisiológicos entre diferentes nichos o con contactos celulares, aunque no se las ha relacionado con algún marcador de membrana (Giebel y Brung, 2008; Ross et al., 2006).

Al realizar el análisis del curso de expresión de la molécula de CD34 se observó que la marcación de CD34 se hacía evidente desde el comienzo del experimento hasta aproximadamente el día 7 de cultivo cuando prácticamente se deja de visualizar. La cuantificación de este proceso por conteo directo y por citometría de flujo confirma lo observado.

Es de destacar un novedoso hallazgo: la colocalización de las estructuras que denominamos protrusiones con la inmunomarcación de CD34, hecho que no había sido reportado aún. La utilización de SIM y MFA permitió el análisis de este proceso a una mayor resolución. Al día 3 de cultivo se observó que CD34 se localizaba tanto en la protrusión como en el resto de la célula, la cual es confirmada mediante la utilización de dos clones diferentes de anticuerpos monoclonales antiCD34 conjugados con distintos fluoróforos (FITC y PE) y la

tecnología SIM. También fue evaluado utilizando AFM acoplado a un microscopio de epifluorescencia, mediante el cual pudo observarse que la estructura mencionada comenzaba a separarse del resto del cuerpo celular. Este proceso fue analizado también mediante tinción con faloidina, lo cual puso en evidencia un rearrreglo en la actina F del citoesqueleto la cual aparentemente soportaba esta estructura. Al día 5 de cultivo CD34 se mapea exclusivamente a nivel de la protrusión en casi todas las células, tal cual lo evidencia la MLC utilizando dos clones diferentes de antiCD34 conjugados con distintos fluoróforos. El abordaje por MFA proporciona evidencia del desprendimiento de la protrusión del cuerpo celular.

Los distintos abordajes utilizados indican que dichas protrusiones no corresponden a artefactos técnicos sino que reflejan un proceso biológico real. Además el hecho de encontrar una sola protrusión por célula y que su desprendimiento posterior no afectó la supervivencia celular fue evidenciado por la viabilidad y la preservación de la población de células hasta el último día de cultivo. De esta forma se descartó que dichas protrusiones estuviesen relacionadas con cualquier tipo de daño celular, incluyendo cuerpos apoptóticos que usualmente no aparecen aislados y micronúcleos que son DAPI positivos (Elmore, 2007; Jodo et al., 2001). Por lo tanto, las protrusiones parecen ser un componente importante en el transcurso de la diferenciación megacariocítica y serían independientes de las condiciones de cultivo y de la fuente de origen de los precursores.

Esta forma peculiar de eliminar CD34 descrita por primera vez en el presente trabajo, en la cual primero las moléculas migran hacia un único polo en la

membrana celular para después ser expulsadas de la célula amerita futuras investigaciones. Sería muy relevante investigar sobre la interacción entre el citoesqueleto y sobre el desplazamiento de CD34 a lo largo de la membrana celular. Estudios recientes han mostrado que la inhibición de la actina dio lugar a un aumento en la ploidía e incremento en la formación de proplaquetas en cultivos de MKs derivados del cordón umbilical (Avanzi et al., 2015), aunque aún ninguno ha investigado la relación con CD34.

En los últimos años una modalidad específica de comunicación celular ha ganado la atención de diversos investigadores. Estas vías de comunicación comparten el proceso de liberación de vesículas extracelulares (VEs), las cuales son vehículos ligados a la bicapa lipídica, y son mediadores intrínsecos de la comunicación intercelular, permitiendo la transferencia funcional de biomoléculas (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). Se ha demostrado que las VEs influyen en una multitud de procesos que ayudan en la progresión del tumor, incluyendo proliferación celular, angiogénesis, migración, invasión, metástasis, immunoedición y resistencia a fármacos (Sullivan et al., 2017; Stranford y Leonard, 2017; Lu et al., 2017; Choi et al., 2017; György y Maguire, 2017). Como se describió anteriormente, se constató la presencia de un número importante de protrusiones que se asemejan a vesículas las cuales desaparecen en el correr de los días en cultivo celular. Esto podría estar reflejando una nueva vía de comunicación celular de las CMH como de los precursores hematopoyéticos.

Por último, la obtención de un número considerable de MKs humanos *in vitro* permitió la obtención de ARN suficiente para realizar la secuenciación masiva

por NGS. Esto permitirá realizar un futuro análisis bioinformático de estas peculiares poblaciones celulares el cual no se encuentra realizado aún.

VIII.- CONCLUSIONES

Es la primera vez en nuestro país que: a) se realizaron cultivos celulares de MKs humanos obtenidos de precursores de MO, b) se analizó la diferenciación megacariocítica utilizando citometría de flujo.

Se demostró mediante el abordaje con diferentes técnicas microscópicas y citometría de flujo que durante la megacariopoyesis CD34 es eliminado de la membrana celular mediante un proceso muy peculiar el cual requiere profundizar en su conocimiento para determinar su relevancia biológica. Se propone un esquema explicativo en el cual se muestra cómo CD34 es eliminado durante la megacariopoyesis humana (Figura 29).

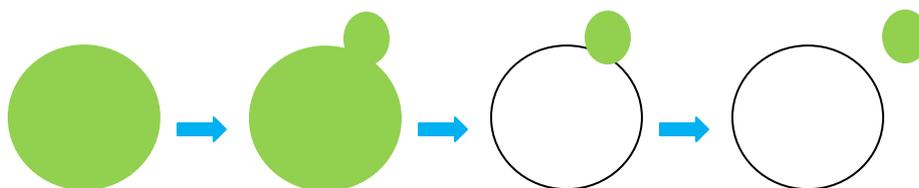


Figura 29.- Esquema de eliminación de CD34 durante la megacariopoyesis humana. Se muestra cómo CD34 (verde) es eliminado de las células en el correr de los días durante la megacariopoyesis *in vitro*.

Es de destacar que es el primer trabajo en reportar la asociación entre una prolongación de las CMH y precursores con un antígeno de membrana; y que es la primera vez que se analizan algunos estadios de la megacariopoyesis utilizando MFA y que se obtuvieron datos de secuenciación masiva de MKs humanos.

Por último, como la mayoría de las células madre en general comparten las principales características en los procesos de diferenciación y proliferación, la

relevancia de los hallazgos presentados en esta Tesis podrían ser extrapolados a otros linajes celulares.

IX.- PERSPECTIVAS

Debido a los hallazgos expuestos en la presente Tesis se proponen los siguientes trabajos a realizar para intentar responder algunas de las preguntas que se desprenden de los resultados obtenidos.

a) Aislamiento de vesículas para:

- i. Analizar mediante CF multiparamétrica y/o microdissección láser el contenido de las vesículas
- ii. Realizar un estudio estructural de su membrana utilizando microscopía de fuerza atómica y microscopía electrónica de barrido, dado que las imágenes de fuerza atómica en este trabajo presentan un mapa topográfico y de deflexión diferente al resto de la membrana celular

b) Analizar la acción del citoesqueleto de actina durante la formación de la vesícula mediante la utilización de inhibidores de la polimerización de la actina como latrunculina

c) Análisis bioinformático de los transcriptomas obtenidos

d) Realización de nuevos cultivos para obtener nuevos transcriptomas que permitan estudiar la actividad génica durante el proceso de eliminación de CD34

e) Realización de cultivos celulares de otros linajes hematopoyéticos, así como también de células madre de tejido adiposo con la finalidad de

verificar si el proceso hallado puede ser generalizado a otras células madre

BIBLIOGRAFÍA

Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2017) "Flow cytometry: basic principles and applications" *Critical Reviews in Biotechnology* 37(2): 163-176.

Alessandrino EP, Amadori S, Barosi G, Cazzola M, Grossi A, et al. (2002) "Evidence and consensus based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndromes. A statement from the Italian Society of Hematology". *Haematologica* 87:1286-1306.

Arnold DM, Nazi I, Toltl LJ, Ross C, Ivetic, Smith JW, Liu Y, Kelton JG (2015) "Antibody binding to megakaryocytes in vivo in patients with immune thrombocytopenia". *European Journal of Haematology* 95(6): 532-537.

Asada N, Takeishi S, Frenette PS (2017) "Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche". *International Journal of Hematology* 106: 45-54.

Avanzi MP, Izak M, OE Oluwadara, Beau Mitchell W (2015) "Actin inhibition increases megakaryocyte proplatelet formation through an apoptosis-dependent mechanism". *PLoS One* 10: e0125057.

Ayala IA, Tomer A, Kellarc KL (1996) "Flow Cytometric Analysis of Megakaryocyte-Associated Antigens on CD34 Cells and Their Progeny in Liquid Culture. *Stem Cells*".14: 320-329.

Baigger A, Blasczyk R, Figueiredo C (2017) "Towards the manufacture of megakaryocytes and platelets for clinical application". *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 44: 165-173.

Balduini A, Badalucco S, Pugliano MT, Baev D, De Silvestri A, et al. (2011) "In Vitro Megakaryocyte Differentiation and Proplatelet Formation in Ph-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Distinct Patterns in the Different Clinical Phenotypes". *PLoS ONE* 6(6): e21015.

Barlow AL, Guerin CJ (2007) "Quantization of widefield fluorescence images using structured illumination and image analysis software". *Microscopy Research and Technique*70: 76-84.

Bellucci S, Caen J (2002) "Molecular basis of Glanzmann's Thrombasthenia and current strategies in treatment". *Blood Reviews* 16(3):193-202.

Bizzozzero G (1881) "Ueber einer neuen formbestandtheil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und der blutgerinnung". *Archives of Pathology, Anatomy and Physiology* 90: 261-269.

Brown J, Greaves MF, Molgaard HV (1991) "The gene encoding the stem cell antigen CD34 is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts". *International Immunology* 3: 175-184.

Boulwood J, Lewis S, Wainscoat S (1994) "The 5q- syndrome". *The Journal of the American Society of Hematology* 84(10): 3253-3260.

Boulwood J, Pellagatti A, Wainscoat JS (2012) "5q- syndrome". *Current Pharmaceutical Design* 18: 3180-3183.

- Buggenthin F, Buettner F, Hoppe PS, Ende M, Kroiss M, Strasser M, Schwarzfischer M, Loeffler D, et al. (2017) "Prospective identification of hematopoietic lineage choice by deep learning". *Nature Methods* 14: 403-406.
- Burt RK (1999) "Clinical utility of maximizing the CD34 cell counts in stem cell grafts". *Stem Cells* 17: 373-378.
- Caunedo P (2004) "La citometría de flujo en el estudio de las plaquetas". *Revista Cubana Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 20: 1.
- Cazzola M (2008) "Myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion (5q- syndrome). A clonal stem cell disorder characterized by defective ribosome biogenesis". *Haematologica* 93(7): 967-972.
- Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W (2007) "From hematopoietic stem cells to platelets". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(1): 318-27.
- Chatterjee M, Geisler T (2016) "Inflammatory Contribution of Platelets Revisited: New Players in the Arena of Inflammation". *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 42(03): 205-214.
- Choi JW, Um JH, Cho JH, Lee HJ et al. (2017) "Tiny RNAs and their voyage via extracellular vesicles: Secretion of bacterial small RNA and eukaryotic microRNA". *Experimental Biology and Medicine* 242(15): 1475-1481.
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984) "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells". *Journal of Immunology* 133: 157-165.
- Coller BS, Shattil SJ (2008) "The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend". *Blood* 112: 3011-3025.
- Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ (2017) "Adult haematopoietic stem cell niches". *Nature Reviews Immunology* DOI:10.1038/nri.2017.53.
- Debili N, Issaad C, Massé JM, Guichar J, Katz A, et al. (1992) "Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocyte differentiation". *Blood* 80: 3022-3035.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL (1994) "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand" *Nature* 369: 533-538.
- Deutsch VR, Tomer A (2006) "Megakaryocyte development and platelet production". *British Journal of Haematology* 134: 453-466.
- Dhule S, Gawali S (2014) "Platelet aggregation and clotting time in type 2 diabetic males". *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology* 4(2): 121-123.
- Di Buduo CA, Kaplan DL, Balduini A (2017) "In vitro generation of platelets: Where do we stand?". *Transfusion Clinique et Biologique* DOI: 10.1016/j.tracli.2017.06.013.
- Domínguez Pantoja M, Romero-Ramírez H, Rodríguez Alba JC (2015) "Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función" *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 15(1): 29-37.

- Eghiaian F1, Schaap IA (2011) "Structural and dynamic characterization of biochemical processes by atomic force microscopy". En: Mashanov G., Batters C. (eds) Single Molecule Enzymology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), 778: 71-95.
- Elbert BL (2009) "Deletion 5q in myelodysplastic syndrome: a paradigm for the study of hemizygous deletion in cancer". *Leukemia* 23: 1252-1256.
- Elbert BL (2011) "Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome". *Seminars in Oncology* 38(5): 621-626.
- Elmore S (2007) "Apoptosis: A review of programmed cell death". *Toxicologic Pathology* 35: 495-516.
- Ema M, Yokomizo T, Wakamatsu A, Terunuma T, Yamamoto M, Takahashi S (2006) "Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo". *Blood* 108: 4018-4024.
- Felschow DM, McVeigh ML, Hoehn GT et al. (2001) "The adapter protein Crkl associates with CD34". *Blood* 97: 3768-3775.
- Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G (2004) "Platelet activation in type 2 diabetes mellitus". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2: 1282-1291.
- Fina I, Molgaard HV, Robertson D, Bradley N, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF (1990) "Expression of CD34 gene vascular endothelial cells". *Blood* 75: 2417-2426.
- Flechas I, Mera C, Vargas L, Rodríguez-Pardo VM (2008) "Evaluation of proteins related to the differentiation of CD34+ hematopoietic stem cells from the umbilical cord". *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2: 1-17.
- Fletcher CH, DomBourian MG, Millward PA (2015) "Platelet transfusion for patients with cancer". *Cancer Control* 22(1): 47-51.
- Florensa L, Coll M, Woessner S (2001) "Hematopoyesis. Morfología de los elementos formes de la sangre y órganos hematopoyéticos" En "Hematología clínica" Sans-Sabrafen J, Vives Corrons J (eds.) Editorial Harcourt 4^{ta} edición España 1: 1-35.
- Francis K, Ramakrishna R, Holloway W, Palsson BQ (1998) "Two new pseudopod morphologies displayed by the human hematopoietic KG1a progenitor cell line and by primary human CD34+ cells". *Blood* 92: 3616-23.
- Furness SG, McNagny K (2006) "Beyond the mere markers: Functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis". *Immunology Research* 34: 13-32.
- Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A (1999) "Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease Consequences for diagnosis and therapy". *Circulation*: 99:e1.
- Gerdes N, Seijkens T, Lievens D, Kuijpers MJE, Winkels H, et al. (2016) "Platelet CD40 Exacerbates atherosclerosis by transcellular activation of endothelial cells and leukocytes". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* American Heart Association 36: 482-490.

Gertz JM, Meuser M, Bouchard BA (2017) "Simultaneous flow cytometric analysis of megakaryocyte polyploidy and a labile intracellular protein using zinc-based fixation". *Cytometry* 91(7): 713-720.

Giagounidis A, Fenaux P, Mufti GJ, Muus P, Platzbecker U, Sanz G, Cripe L, Von Lilienfeld-Toal M, Wells RA (2008) "Practical recommendations on the use of lenalidomide in the management of myelodysplastic syndromes". *Annals of Hematology* 87: 345-352.

Giebel B, Brung I (2008) "Self-Renewal Versus Differentiation in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: A Focus on Asymmetric Cell Divisions". *Current Stem Cell Research & Therapy* 3: 9-16.

González-Villalba AE, Falcón-Rodríguez CI, Fortoul-van der Goes TI (2010) "Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis". *Gaceta Médica de México* 146(2): 136-143.

Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, De Castro CM, et al. (2011) "Myelodysplastic Syndromes". *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 9: 30-56.

Guan X, Qin M, Zhang Y, Wang Y, Shen B, Ren Z, Ding X et al. (2017) "Safety and efficacy of megakaryocytes induced from hematopoietic stem cells in murine and nonhuman primate models". *Cells Translational Medicine* 6: 897-909.

Guerriero R, Testa U, Gabbianelli M, Mattia G, Montesoro E, et al. (1995) "Unilineage megakaryocytic proliferation and differentiation of purified hematopoietic progenitors in serum-free liquid culture" *Blood* 86: 3725-3736.

György B, Maguire CA (2017) "Extracellular vesicles: nature's nanoparticles for improving gene transfer with adeno-associated virus vectors". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* doi: 10.1002/wnan.1488.

Han Y, Gu Y, Zhang AC, Lo YH (2016) "Review: imaging technologies for flow cytometry". *Lab on a Chip* 16: 4639-4647.

Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT et al. (1995) "A functional comparison of CD34+CD38- cells in cord blood and bone marrow". *Blood* 86: 3745-3753.

Hasserjian RP, Le Beau MM, List AF, Bennett JM, Thiele J (2008) "Myelodysplastic síndrome with isolated del (5q)". En "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues". Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds.). International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon. 4^{ta} edición, pág. 102.

Hatami J, Andrade PZ, Bacalhau D, Cirurgiãõ F, Castelo Ferreira F, Cabral JMS, da Silva CL (2014) "Proliferation extent of CD34 cells as a key parameter to maximize megakaryocytic differentiation of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells in a two-stage culture protocol". *Biotechnology Reports* 4: 50-55.

Howell WH (1890) "Observations upon the occurrence, structure, and function of the giant cells of the marrow". *Journal of Morphology* 4: 117-130.

Huang N, Lou M, Liu H, Avila C, Ma Y (2016) "Identification of a potent small molecule capable of regulating polyploidization, megakaryocyte maturation, and platelet production". *Journal of Hematology & Oncology* 9: 136.

- Insuasti-Beltran G, Steidler NL, Kang H, Reichard KK (2012) "CD34+ megakaryocytes ($\geq 30\%$) are associated with megaloblastic anaemia and non-acute myeloid neoplasia". *Histopathology* 61: 694-701.
- Jackson CW, Brown LK, Somerville BC, Lyles SA, Look AT (1984) "Two-color flow cytometric measurement of DNA distributions of rat megakaryocytes in unfixed, unfractionated marrow cell suspensions". *Blood* 63(4): 768-778.
- Jennings L, Ashmun R, Wang W, Dockter M (1986) "Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry". *Blood* 68(1): 173-179.
- Jodo S, Xiao S, Hohlbaum A, Strehlow D, Ann Marshak-Rothstein A, Ju ST (2001) "Apoptosis-inducing Membrane Vesicles". *The Journal of Biological Chemistry* 276: 39938-39944.
- Kanamaru S, Kawano Y, Watanabe T, Nakagawa R, Suzuya H, Onishi T, Yamazaki J, Kakayama T, et al. (2000) "Low numbers of megakaryocyte progenitors in grafts of cord blood cells may result in delayed platelet recovery after cord blood cell transplant". *Stem Cells* 18: 190-195.
- Karadaglic D, Wilson T (2008) "Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy". *Micron* 39: 808-818.
- Katz F, Tindle RW, Sutherland DR, Greaves MD (1985) "Identification of a membrane glycoprotein associated with hemopoietic progenitor cells. *Leukemia Research* 9: 191-198.
- Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, et al. (2015) "Platelet Transfusion: A Clinical Practice Guideline From the AABB". *Annals of Internal Medicine* 162: 205-213.
- Kaushansky K (2008) "Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis". *Blood* 111: 981-986.
- Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR (1998) "Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines". *Cytometry* 34: 61-70.
- Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T et al. (1999) "Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells". *Stem Cells* 17: 286-294.
- Kling J. (2011) "CD34 Staining Useful in Bone Marrow Analyses". *American Society for Clinical Pathology (ASCP) Annual Meeting Abstract* 412.
- Labellea M, Beguma S, Hynesa RO (2014) "Platelets guide the formation of early metastatic niches". *PNAS* 111(30): E3053-E3061.
- Langhorst MF, Schaffer J, Goetze B (2009) "Structure brings clarity: Structured illumination microscopy in cell biology". *Biotechnology Journal* 4: 858-865.
- Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ (2009) "Endoreplication: polyploidy with purpose". *Genes & Development* 23: 2461-2477.

- Lee JI, Wright JH, Johnson MM, Bauer RL, Sorg K, et al. (2016) "Role of Smad3 in platelet-derived growth factor-C-induced liver fibrosis". *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 310(6): 436-445.
- Liu Y, Wang Y, Gao Y, Forbes JA, Qayyum R, Becker L, Cheng L, Wang ZZ (2015) "Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using food and drug administration-approved pharmacological reagents" *Stem Cells Translational Medicine* 4: 309-319.
- Lu M, Xing H, Yang Z, Sun Y, Yang T, Zhao X, Cai C, Wang D, Ding P (2017) "Recent advances on extracellular vesicles in therapeutic delivery: Challenges, solutions, and opportunities". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 119: 381-395.
- Machlus KR, Italiano JE Jr. (2013) "The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation". *Journal Cell Biology* 201(6): 785-796.
- Machlus KR, Thon JN, Italiano JE Jr. (2014) "Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation". *British Journal of Haematology* 165: 227-236.
- Mallo M, Cervera J, Schanz J, Such E, García-Manero G, et al. (2001) "Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q". *Leukemia* 25: 110-120.
- Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G, Giampaolo A, Hassan HJ (2002) "Different levels of megakaryocytes generates from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release". *Blood* 99: 888-897.
- McNagny K, Nielsen JS (2009) "CD34 is a Key Regulator of Hematopoietic Stem Cell Trafficking to Bone Marrow and Mast Cell Progenitor Trafficking in the Periphery". *Microcirculation* 16: 487-496.
- Mera Reina C, Roa Lara A, Ramírez Clavijo S (2007) "Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación". *Revista. Ciencias de la Salud* 5(1): 67-89.
- Monteiro M-do-C, Martínez M, O'Connor J (2002) "La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas. Aplicaciones clínicas". *Revista Diagnóstico Biológico* 51: 3.
- Moreno J, Campos MG, Lara C, Torner C (2005) "La plaqueta como marcador biológico periférico de la función serotoninérgica neuronal". *Salud Mental* 28(3): 79-87.
- Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjesk KL (2014) "Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells". *Blood* 123(18): 2759-2767.
- Mosna F, Sensebé L, Krampera M (2010) "Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide". *Stem Cells and Development* 19: 1449-1470.
- Nielsen JS, McNagny KM (2008) "Novel functions of the CD34 family". *Journal of Cell Science* 121: 3683-3692.
- Nishinkii H, Kurita N, Chiba S (2017) "The Road Map for Megakaryopoietic Lineage from Hematopoietic Stem/Progenitor Cells". *Stem Cells Translational Medicine* 6: 1661-1665.

- Niswander LM, McGrath KE, Kennedy JC, Palis J (2014) "Improved quantitative analysis of primary bone marrow megakaryocytes utilizing imaging flow cytometry". *Cytometry* 85(4): 302-312.
- Nurden AT, Caen JP (1974) "An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia". *British Journal of Haematology* 28: 253-260.
- Olney H, Le Beau M (2009) "Myelodysplastic Syndromes". En "Cancer cytogenetics", Heim S, Mitelman F (eds.), Editorial Wiley-Blackwell, 3^{ra} edición 141-178.
- Orkin SH, Zon LI (2002) "Hematopoiesis and stem cells plasticity versus developmental heterogeneity". *Nature Immunology* 3: 323-328.
- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. Jr. (2010) "The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets". *Journal of Clinical Investigation* 115(12): 3348-3354.
- Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ (2004) "Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential". *Blood* 103: 1662-1668.
- Phillips DR, Agin PP (1977) "Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins". *Journal of Clinical Investigation* 60: 535-545.
- Piletz J, Hoppensteadt D, Jeske W, Fareed J, Sinacore J, et al. (2016) "Effects of Quetiapine on Platelets in Major Depression". *Journal of Depression & Anxiety* 5(1): 1-7.
- Pintos EN, Cabrejo MR (2010) "Clasificación de los síndromes mielodisplásicos". *Hematología* 14(3): 86-90.
- Plodinec M, Loparic M, Aebi U. (2010) "Atomic force microscopy for biological imaging and mechanical testing across length scales". *Cold Spring Harbor Protocols* doi:10.1101/pdb.top86.
- Pozner RG, Ure AE, Jaquenod de Giusti C, D'Atri LP, Italiano JE, Torres O, Romanowski V, Schattner M, Gómez RM (2010) "Junín virus infection of human hematopoietic progenitors impairs in vitro proplatelet formation and platelet release via a Bystander effect involving type I IFN signaling". *PLoS Pathogens* 6: e1000847.
- Quinn MJ, Byzova TV, Qin J, Topol EJ, Plow EF (2003) "Integrin α IIb β 3 and Its Antagonism". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23: 388-396.
- Reems JA, Pineault N, Sun S (2010) "In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art". *Transfusion Medicine Review* 24(1): 33-43.
- Rieger MA, Schroeder T (2012) "Hematopoiesis". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(a008250): 1-17.
- Ross J, Linheng L (2006) "Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate". *Current Opinion in Hematology* 13: 237-242.
- Roy L, Coullin P, Vitrat N, Hellio R, Debili N, Weinstein J, Bernheim A, Vainchenker W (2001) "Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal metaphase/anaphase checkpoint in polyploidy megakaryocytes". *Blood* 97: 2238-2247.

Ru YX , Zhao SX, Dong SX, Yang YQ, Eyden B (2015) "On the Maturation of Megakaryocytes: A Review with Original Observations on Human In Vivo Cells Emphasizing Morphology and Ultrastructure". *Ultrastructural Pathology* 39(2): 79-87.

Saeyns Y, Van Gassen S, Lambrecht BN (2016) "Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data". *Nature Reviews Immunology* 16: 449-462.

Saft L, Karimi M, Ghaderi M, Matolcsy A, Mufti GJ, et al. (2014) "p53 protein expression independently predict outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q)".

Sans-Sabrafen J, Woessner S, Buxó J, Besses C (2001) "Síndromes mielodisplásicos. Anemias refractarias adquiridas. Leucemia mielomonocítica crónica. Anemias diseritropoyéticas congénitas". En "Hematología clínica", Sans-Sabrafen J, Besses C, Vives J (eds.) Editorial Harcourt. 4^{ta} edición, 254-274. *Haematologica* 99(6): 1041-1049.

Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, et al. (2012) "New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MSD) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge". *Journal of Clinical Oncology* 30(8): 830-829.

Scherberich A, Di Maggio ND, McNagny KM (2013) "A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue". *World Journal of Stem Cells* 5: 1-8.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, et al. (2012) "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis". *Nature Methods*. 9: 676-682.

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

Schulze H, Shivdasani RA (2005) "Mechanisms of thrombopoiesis". *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3: 1714-1724.

Seita J, Weissman IL (2010) "Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation" *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2(6): 640-653.

Serebruany V, Malinin A, Ong S, Atar D (2008) "Patients with metabolic syndrome exhibit higher platelet activity than those with conventional risk factors for vascular disease". *Journal Thrombosis Thrombolysis* 25: 207-213.

Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A (2014) "Concise Review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors" *Stem Cells* 32: 1380-1389.

Singh VK, Tsuji K, Sharma PB, Chandra R (2012) "Multidimensional role of CD34 protein in hematopoietic stem cell biology". *International Journal of Science Technology & Management* 3(2): 42-71.

- Sol N, Wurdinger T (2017) "Platelet RNA signatures for the detection of cancer". *Cancer and Metastasis Reviews* DOI: 10.1007/s10555-017-9674-0.
- Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, Hirst M, Hogge D, et al. (2010) "Identification of miR145 and miR146a as mediator of the 5q-syndrome phenotype". *Nature Medicine* 16(1): 49-58.
- Steensma DP, List AF (2005) "Genetic testing in the Myelodysplastic Syndromes: molecular insights into hematologic diversity". *Genetics in Clinical Practice* 80(5): 681-698.
- Stranford DM, Leonard JN (2017) "Delivery of Biomolecules via Extracellular Vesicles: A Budding Therapeutic Strategy". *Advances in Genetics* 98: 155-175.
- Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Yoshimura K (2009) "Functional implications of cd34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells". *Stem Cells and Development* 18: 1201-1210.
- Sugimoto N, Eto KJ (2017) "Platelet production from induced pluripotent stem cells". *Journal Thrombosis and Haemostasis* DOI: 10.1111/jth.13736.
- Sullivan R, Maresh G, Zhang X, Salomon C, Hooper J, Margolin D, Li L (2017) "The emerging Roles of extracellular vesicles As Communication vehicles within the Tumor Microenvironment and Beyond" *Frontiers in Endocrinology* 8(194): 1-11.
- Szalai G, LaRue AC, Watson DK (2006) "Molecular mechanisms of megakaryopoiesis". *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 2460-2476.
- Tomer A, Harker LA, Burstein SA (1988) "Flow Cytometric Analysis of Normal Human Megakaryocytes". *Blood* 71(5): 1244-1252.
- van den Oudenrijn S, von dem Borne AE, de Haas M (2000) "Differences in megakaryocyte expansion potential between CD34(+) stem cells derived from cord blood, peripheral blood, and bone marrow from adults and children". *Experimental Hematology* 28: 1054-1061.
- Wright J (1906) "The origin and nature of blood platelets". *Boston Medical and Surgical Journal* 154: 643-645.
- Wu L, Li X, Xu F, Zhang Z, Chang C, He Q (2013) "Low RPS14 expression in MDS without 5q- aberration confers higher apoptosis rate of nucleated erythrocytes and predicts prolonged survival and possible response to lenalidomide in lower risk non-5q-patients". *European Journal of Haematology* 90: 486-493.
- Xie Y, Yin T, Wiegraeb W, He XC, Miller D, Stark D, Perko K, Alexander R, et al. (2009) "Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging". *Nature* 457: 97-101.
- Yasui K, Matsumoto K, Hirayama F, Tani Y, Nakano T (2003) "Differences Between Peripheral Blood and Cord Blood in the Kinetics of Lineage-Restricted Hematopoietic Cells: Implications for Delayed Platelet Recovery Following Cord Blood Transplantation". *Stem Cells* 21: 143-151.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003) "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 425: 836-841.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/>