



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**PRODUCCIÓN DE ERITROCITOS A PARTIR DE
CÉLULAS CD34⁺ DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL**

Juan Pablo Labbrozzi

Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Biotecnología

Escola d'Enginyeria - Departament d'Enginyeria Química

Directores: Dr. Arnau Pla, Dr. Francesc Gòdia

Bellaterra, diciembre de 2015

PÁGINA RESERVADA PARA CERTIFICADO DE LOS DIRECTORES

Dedicado a mi familia

PRÓLOGO

La transfusión de sangre es una parte esencial en la medicina moderna. Aun con más 92 millones de donaciones de sangre recolectadas al año en todo el mundo, sigue siendo un recurso humano escaso. Problemas asociados con el envejecimiento de la población, junto al aumento del número de transfusiones de sangre para apoyar procedimientos quirúrgicos avanzados y los tratamientos médicos en las personas mayores, podrían generar un escenario a futuro en donde el suministro de sangre sea insuficiente. Se estima que, incluso en los países industrializados el suministro de sangre ya no será adecuada en las próximas décadas. Proporcionar sangre para los pacientes transfundidos crónicamente y pacientes con tipos de sangre raros es un reto adicional debido a los riesgos de aloinmunización.

Consiente de esta problemática, en las últimas décadas se han evaluado varios productos alternativos de transfusión; como soluciones de hemoglobina o emulsiones de perfluorocarbonos, sin embargo, su utilidad se ha visto limitada por diversas complicaciones, efectos adversos y baja eficacia.

En este contexto, y gracias al desarrollo de la terapia celular y la generación de diferentes tipos celulares a partir de células madre, se ha abierto el campo a la producción de diferentes componentes sanguíneos, entre ellos los eritrocitos, como productos alternativos de transfusión a partir de diversas fuentes celulares, entre ellas las células madre hematopoyéticas. Los avances recientes han aumentado el entusiasmo sobre el potencial de estos productos alternativos. Sin embargo, problemas relacionados con cuestiones inherentes al proceso en sí, como la enucleación de eritroblastos, la producción en sistemas escalables, el alto costo financiero y aspectos regulatorios no

logran presentar pruebas concluyentes para su uso práctico en clínica. En comparación con otros productos de terapia celular, la producción de eritrocitos como productos terapéuticos alternativos de transfusión es un reto sin igual para la industria biotecnológica debido, entre otras muchas cuestiones todavía por resolver, al elevado número de células funcionales necesarias para lograr dosis terapéuticas equivalentes a las transfusiones convencionales ($\sim 2 \cdot 10^{12}$ células/unidad). Aunque la producción de esas cantidades de células es teóricamente posible, los estudios realizados hasta el momento no han demostrado ser capaces de producir esas cantidades en sistemas escalables y con calidad suficientes para su uso en clínica.

Es por tanto necesario todavía desarrollar tecnologías de cultivo celular que permitan mejorar los rendimientos y su producción a escala, bajo condiciones controladas y reproducibles de cultivo, a fin de hacer realidad la posibilidad de generar sangre en el laboratorio de forma eficiente.

Es en este contexto, y bajo estas premisas, es donde se enmarca el presente trabajo de tesis doctoral. El trabajo realizado consistió en el desarrollo de un bioproceso definido para la obtención *ex vivo* de eritrocitos mediante expansión y diferenciación de células madre hematopoyéticas obtenidas de sangre de corón umbilical. Concretamente, se ha trabajado en la definición de una estrategia de cultivo que permita la expansión de células madre hematopoyéticas, diferenciación terminal de los progenitores eritropoyéticos y enucleación de los eritroblastos, caracterizando las principales variables de cultivo en sus distintas fases con el objetivo final de transferir e implementar la estrategia de cultivo en bioreactores agitados convencionales como plataforma tecnológica para su producción en sistemas controlados y escalables.

Más allá de cuestiones biológicas y regulatorias todavía por resolver, con esta aproximación, se pretende dar respuesta entorno al principal reto para futuros estudios y

posibles aplicaciones: la obtención de cantidades suficientes de células en sistemas escalables para su correcta evaluación funcional. El conocimiento generado en este trabajo permite un análisis en profundidad del estado del arte y definir con mayor claridad los retos a futuro para la producción a gran escala de eritrocitos como productos alternativos de transfusión.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. HEMATOPOYESIS	5
1.2. MODELOS DE HEMATOPOYESIS	6
1.3. CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS	7
1.4. CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO	9
1.5. ERITROPOYESIS <i>IN VIVO</i>	11
1.5.1. EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LA SERIE ERITROPOYÉTICA <i>IN VIVO</i>	12
1.6. HEMOGLOBINA: FUNCIÓN, ESTRUCTURA Y FENOTIPO.	14
1.7. MEDICINA TRANSFUSIONAL	15
1.7.1. PRODUCTOS ALTERNATIVOS DE TRANSFUSIÓN	17
1.8. PRODUCCIÓN DE ERITROCITOS <i>EX VIVO</i> COMO PRODUCTO ALTERNATIVO DE TRANSFUSIÓN	18
2. OBJETIVOS	27
3. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA LA EXPANSIÓN MASIVA DE CPE	31
3.1. INTRODUCCIÓN	31
3.2. RESULTADOS	33
3.2.1. ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CPE EN CULTIVOS DISCONTINUOS.	33
3.3. DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA DE CULTIVO OPTIMIZADA PARA LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ERITROIDES.	38
3.3.1. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA EXPANSIÓN DE CPE: MEDIO DE CULTIVO BASAL.	41
3.3.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CPE GENERADAS EN CULTIVOS DISCONTINUOS ALIMENTADOS.	44
3.4. DISCUSIÓN	48
4. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA INTEGRADA PARA LA GENERACIÓN DE ERITROCITOS <i>EX VIVO</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.1. INTRODUCCIÓN	55
4.2. RESULTADOS	60
4.2.1. ESTUDIO DE CONDICIONES PARA LA EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE CPE	60
4.2.2. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL POTENCIAL DE EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CPE	70
4.2.3. VALIDACIÓN DE LA ESTRATEGIA INTEGRADA PARA LA GENERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE ERITROCITOS	78
4.2.4. ESTUDIO DEL PROCESO DE ENUCLEACIÓN BAJO CONDICIONES DE NORMOXIA E HIPOXIA EN MEDIOS DE CULTIVO EXPERIMENTALES.	86
4.2.5. CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS ERITROIDES GENERADAS EN CULTIVOS <i>EX VIVO</i>	91
4.3. DISCUSIÓN	99

5. GENERACIÓN <i>EX VIVO</i> DE ERITROCITOS EN BIOREACTORES DE TANQUE	
AGITADO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.1. INTRODUCCIÓN	107
5.2. RESULTADOS	112
5.2.1. TRANSFERENCIA DE LA ESTRATEGIA DE CULTIVO DESARROLLADA A BIOREACTORES DE TANQUE	
AGITADO	112
5.3. DISCUSIÓN	127
6. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	133
6.1. CONCLUSIONES	133
6.2. TRABAJO A FUTURO	135
7. MATERIALES Y MÉTODOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
7.1. OBTENCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS EN SCU FRESCA	139
7.1.1. CONCENTRACIÓN DE CMN POR CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD	139
7.1.2. SEPARACIÓN MAGNÉTICA MEDIANTE SELECCIÓN POSITIVA	140
7.1.3. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN Y PUREZA DE CÉLULAS CD34 ⁺	141
7.2. CULTIVO CELULAR	142
7.2.1. FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	142
7.2.2. CULTIVOS DE EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN ERITROIDE EN SISTEMAS ESTÁTICOS DE CULTIVO	143
7.2.3. CULTIVOS ERITROIDES EN BIOREACTOR DE TANQUE AGITADO MINIBIO	144
7.2.4. CÁLCULO DEL FACTOR DE EXPANSIÓN, FACTOR DE EXPANSIÓN TOTAL Y NÚMERO DE	
DUPLICACIONES	148
7.3. TÉCNICAS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	149
7.3.1. CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS CD34 ⁺ Y CÉLULAS NUCLEADAS TOTALES	149
7.3.2. RECUENTO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	150
7.3.3. VIABILIDAD CELULAR	150
7.3.4. FENOTIPO ERITROIDE	152
7.3.5. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS ENUCLEADAS	156
7.4. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA Y LACTATO	157
7.5. TINCIÓN DE MAY GRÜNWALD-GIEMSA	158
7.6. INMUNOHISTOQUÍMICA	159
7.7. COMPOSICIÓN DE HEMOGLOBINAS	159
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163

GLOSARIO

2,3 DPG	<i>2,3-Disphosphoglycerate</i>
APC	Allophycocyanin
BFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides (progenitor primitivo) - <i>Burst-forming unit erythroid</i>
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides (progenitor más maduro) - <i>Colony-forming unit erythroid</i>
CMH	Células madre hematopoyéticas
CMN	Células mononucleadas
CPE	Células progenitoras eritroides
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
DNA	Deoxyribonucleic acid
Ep	Factor de expansión
EPO	Eritropoyetina
EPO-R	Receptor de la eritropoyetina
EpT	Factor de expansión total
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas (<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias gránulo-monocíticas (<i>Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>)
GMP	Buenas prácticas de manufactura
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina adulta
HbF	Hemoglobina fetal
HC	Hidrocortisona
hESC	Células madre embrionarias humanas
hiPSC	Células madre pluripotenciales inducidas humanas
hSerB	Suero humano B

IL-3	Interleuquina 3
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
MGG	May Grünwald-Giemsa
MO	Medula ósea
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin Chlorophyll Protein</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCU	Sangre de cordón umbilical
SPM	Sangre periférica movilizada
STB	Bioreactor de tanque agitado

CAPÍTULO 1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Las células progenitoras y precursoras eritroides, provienen de células madre hematopoyéticas (CMH) de la medula ósea. El proceso por el cual se generan estas células, y todos los linajes celulares de la sangre, se denomina hematopoyesis. Este es un sistema complejo altamente regulado y jerárquico mediante el cual, CMH con elevada capacidad de proliferación, renovación y potencial de diferenciación son capaces de generar células progenitoras comprometidas con diferente potencial proliferativo y de diferenciación (Beutler et al., 2005).

1.1. Hematopoyesis

En los mamíferos adultos, la hematopoyesis se lleva a cabo principalmente en la medula ósea. Los tipos celulares maduros derivan de células madre ubicadas en lugares específicos de la medula, el nicho hematopoyético. El nicho está compuesto por células hematopoyéticas, células estromales, factores de crecimiento y de la matriz extracelular. Este microambiente brinda las condiciones necesarias para regular el mantenimiento, proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos y la muerte celular ordenada (Beutler et al., 2005).

Durante la embriogénesis, la hematopoyesis se da en lugares especiales y temporalmente distintos. El desarrollo de eritroblastos primitivos en el saco vitelino es crítica para la supervivencia del embrión. Mas adelante, se da la hematopoyesis hepática, el hígado actúa como fuente básica de hematíes durante gran parte de la gestación para finalmente migrar a la medula ósea. La médula se convierte en el lugar principal de la hematopoyesis al final de la gestación y durante la vida del adulto.

1.2. Modelos de hematopoyesis

Los modelos de hematopoyesis son motivo de estudio desde hace ya más de 50 años. Muchos de estos modelos coincidían en afirmar que las células madre toman una decisión temprana e irrevocable que deriva en linaje linfóide o mielóide. Sin embargo estas afirmaciones deterministas están siendo revisadas hoy día debido a estudios recientes que confirman la habilidad de progenitores intermedios para diferenciar a linaje linfóide o mielóide dependiendo de las circunstancias (Ceredig et al., 2009; Dorshkind, 2010), lo que supondría revisar e incluir más de una ruta posible en algunos tipos de células adultas. Como ejemplo, células dendríticas aparentemente idénticas, generadas tanto a partir de progenitores mieloides como de progenitores linfoides (Brown and Ceredig, 2009). No obstante, el modelo jerárquico dicotómico linfóide – mielóide, nos permite comprender de forma clara las bases de este complejo procesos, el cual aporta valiosa información para el desarrollo de cultivos *ex vivo*.

Tal como podemos observar en la **Figura 1–1**, el modelo jerárquico propone que células madre pluripotenciales con capacidad de renovación a largo plazo y células madre pluripotenciales con capacidad de renovación a corto plazo (ambas con capacidad de autorrenovación) mediante un desarrollo secuencial generan células progenitoras multipotenciales (sin capacidad de autorrenovación) con capacidad para diferenciar en los distintos linajes. Estos progenitores a su vez, generan progenitores comunes linfoides y progenitores comunes mieloides. En este punto, a partir de los progenitores linfóide se obtienen células B y T (de distintos tipos), células *natural killer*, células dendríticas y tal vez otras. El progenitor común mielóide da lugar a los progenitores granulomonocítico y megacariocítico-eritrocítico, de los cuales derivan las plaquetas, eritrocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas (Beutler et al., 2005; Dorshkind, 2010). Este compromiso se manifiesta

mediante cambios en el ciclo celular de una célula. A medida que esta va adquiriendo características determinadas, su potencial de autorrenovación y versatilidad disminuyen drásticamente.

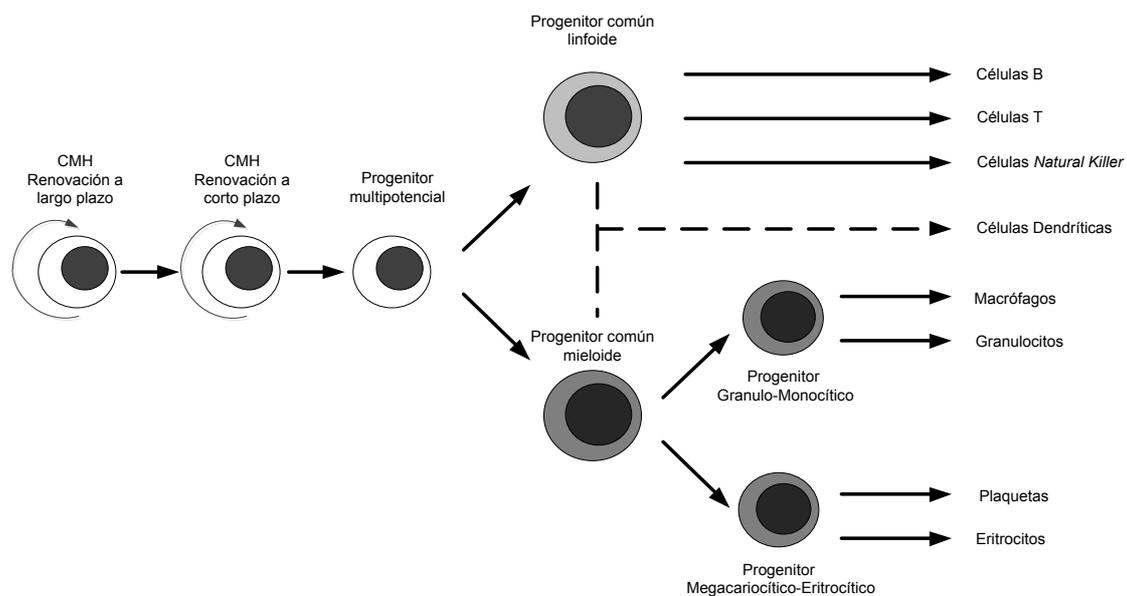


Figura 1–1 Modelo jerárquico de la hematopoyesis. Las CMH, con capacidad de autorrenovación y diferenciación, se dividen en células con capacidad de repoblación a largo plazo y células con capacidad de repoblación a corto plazo. Seguido, las CMH dan lugar a células progenitoras multipotenciales, las cuales dan lugar a las células progenitoras comprometidas y células precursoras de los diferentes linajes (Wickrema and Kee, 2009) .

1.3. Células madre hematopoyéticas

Las CMH se definen por su capacidad de repoblación *in vivo*, autorrenovación y multipotencialidad. Bajo circunstancias concretas, una única CMH tendría capacidad para restituir la hematopoyesis en un animal (Marshak et al., 2001). Esto nos da una idea del extraordinario potencial de proliferación y diferenciación de estas células. La regulación del sistema hematopoyético implica que las CMH puedan, según las circunstancias, permanecer quiescentes (G_0), programar su muerte ordenada (apoptosis) o dividirse de forma simétrica o asimétrica (**Figura 1–2**). La división asimétrica hace

posible la conservación de la población de CMH y simultáneamente responder a las demandas de células de la sangre a reponer, produciendo los progenitores destinados a proliferar y diferenciarse en células adultas sin comprometer el reservorio de CMH.

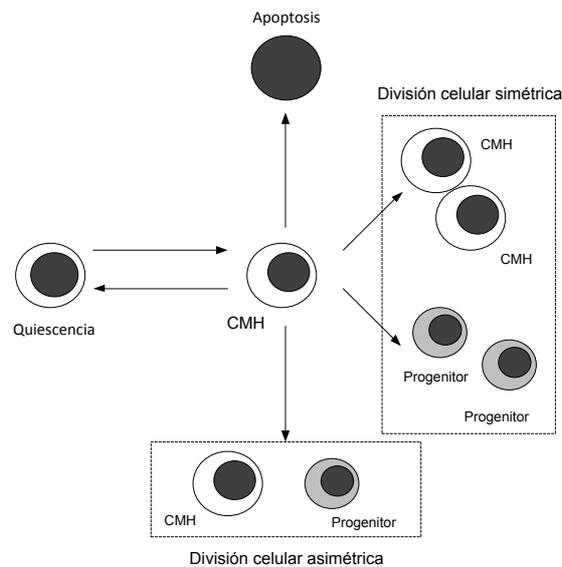


Figura 1–2 Posibles destinos de las células madre hematopoyéticas. Las CMH pueden dividirse de forma simétrica o asimétrica según se requiera, permanecer quiescentes o programar su muerte. Esto permite un balance de la homeostasis celular. Los destinos son inducidos por eventos estocásticos o eventos deterministas.

La división asimétrica puede darse durante el proceso mismo de división celular (intrínseca), o justo después del proceso (extrínseca). En la asimetría intrínseca, factores determinantes presentes en el citoplasma (mRNA y/o proteínas) se redistribuyen de forma desigual en las células hijas antes del inicio de la división (Wickrema and Kee, 2009). En la división extrínseca, la asimetría se da gracias a la exposición de una de las copias a señales extrínsecas (solubles o celulares) presentes en el microambiente hematopoyético. Así, luego de una división simétrica, o autorenovación, una de las dos copias celulares permanece en el nicho mientras que la otra copia, en función de su interacción con el microambiente puede desencadenar su diferenciación. Por último,

también es posible que ambos factores, intrínsecos y extrínsecos actúen de forma simultánea. Estos mecanismos permiten la expansión masiva de células progenitoras necesarios para mantener la homeostasis. Un progenitor multipotente es capaz de dar lugar a todos los tipos de células de la sangre mediante procesos de diferenciación en donde el potencial de expansión se va perdiendo en detrimento de una mayor especificidad propia de las células adultas. Por este motivo, los progenitores son intermediarios cruciales en el desarrollo de las células de la sangre, gracias a su potencial de expansión y capacidad de diferenciación.

Históricamente, se han caracterizado estas células mediante ensayos funcionales y marcadores de superficie. El fenotipo de estas células varía según los estímulos presentes. Las citoquinas y factores de crecimiento influyen de forma significativa en este sentido. Una característica muy útil es que no expresan marcadores de linaje específicos, esto nos permite implementar estrategias de marcaje para dilucidar estados madurativos. Las CMH y CPH expresan el antígeno de superficie CD34 (ligando de la I-selectina) y morfológicamente parecen ser similares a linfocitos normales, esto permitió desarrollar técnicas simples, sensibles y de alta especificidad para su cuantificación y selección mediante técnicas de citometría de flujo e inmunomagnéticas.

1.4. Citoquinas y factores de crecimiento

Los factores de crecimiento y citoquinas son reguladores extrínsecos necesarios para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las CMH en sus distintos estadios madurativos.

La existencia de estos factores de acción específica en células del sistema hematopoyético fue sugerido ya a principios del siglo XX. Carnot y Deflandre

postularon en 1906 que una sustancia, la cual llamaron hemopoyetina, era responsable de la producción de eritrocitos (Thomson and Lotze, 2003). Si bien, esto no fue confirmado hasta mediados del siglo, el hecho marca el comienzo del estudio de estos factores. El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos en la década del 60 permitió a la comunidad científica detectar la presencia de factores en los sobrenadantes de cultivos permitiéndoles desarrollar estudios *in vitro* de movilidad, proliferación, diferenciación de distintos tipos celulares. En los años siguientes, gracias al avance de técnicas cromatográficas y de microsecuenciación, muchos de estos factores pudieron ser identificados, purificados y posteriormente secuenciados. Ya en los años 80, con el advenimiento de la tecnología de DNA recombinante, muchas de estas citoquinas han podido obtenerse de forma recombinante, lo que ha permitido mejorar considerablemente los ensayos de caracterización, la identificación e interacción con sus respectivos ligandos y sus mecanismos de acción en las células.

Las citoquinas ejercen un efecto regulador pleiotrópico, generalmente iniciando distintas respuestas mediante interacciones específicas con sus receptores en el dominio citoplasmático de las células. Su polifuncionalidad no solo les permite actuar como estímulo para la proliferación, sino que también pueden actuar en aspectos muy diversos como la supervivencia (suprimiendo en algunos casos la apoptosis), inducción de la diferenciación, modulación y actividad funcional de las células adultas.

Un aspecto importante a tener en cuenta de las citoquinas es su sinergia, la combinación en ciertas situaciones es esencial para estimular la proliferación celular. Para la formación de ciertas colonias en cultivos semisólidos, es necesaria la acción en combinación de varias citoquinas. Otra característica, es su elevada actividad específica, obteniéndose respuesta incluso a concentraciones muy bajas (picogramos a nanogramos por mililitro).

Numerosos estudios validan a las citoquinas como el mayor regulador de la hematopoyesis (Metcalf, 2008; Thomson and Lotze, 2003). El mayor aporte en este sentido se deriva de los ensayos clínicos de citoquinas recombinantes. La eritropoyetina (EPO) es altamente efectiva para corregir anemias producidas por enfermedades renales. Otro ejemplo, de especial importancia, es la capacidad para elevar el número de CMH y CPH en sangre periférica mediante la aplicación en pacientes de factores estimulantes de colonias granulocíticas (G-CSF) y factores estimulantes de colonias gránulo-monocíticas (GM-CSF) (Metcalf, 2008).

1.5. Eritropoyesis *in vivo*

La eritropoyesis humana es un proceso multiestadio, dinámico y complejo altamente regulado, mediante el cual se generan eritrocitos necesarios principalmente para el transporte de oxígeno a los tejidos. En adultos, este proceso tiene lugar mayormente en la médula ósea (MO), precisamente en una unidad anatómica llamada isla eritroblástica (Al-Rubeai, 2011; Beutler et al., 2005). Es en este nicho especializado donde los precursores eritroides proliferan, se diferencian y enuclean. Básicamente, esta unidad está compuesta por uno, o dos macrófagos ubicados en el centro, rodeados de eritroblastos en distintos estadios madurativos (Beutler et al., 2005). En este microambiente, la eritropoyesis es regulada mediante interacciones célula-célula, estímulos extrínsecos de factores solubles como SCF, EPO, entre otras; y también componentes de la matriz extracelular como fibronectinas y lamininas, que afectan la eritropoyesis en estadios terminales de diferenciación y fenómenos de migración. Los macrófagos, entre otras funciones, son responsables de la fagocitosis y degradación del núcleo una vez liberado por los eritroblastos ortocromáticos, también satisfacen las

necesidades de hierro durante la eritropoyesis y ejercen un rol en la regulación de la eritropoyesis. Conforme maduran los eritroblastos, estos se van alejando del cuerpo principal. En su etapa final, luego de liberar el núcleo, los reticulocitos inmaduros entran en circulación mediante la migración a través de poros citoplasmáticos de células endoteliales (Chasis and Mohandas, 2008).

Estas vías de retroalimentación y regulación que se dan dentro del nicho, son fundamentales para la regulación de la producción de eritrocitos. Se ha demostrado la habilidad por parte de progenitores eritropoyéticos de completar la diferenciación terminal *in vitro* (Migliaccio et al., 2012a; Miharada et al., 2006), en presencia de EPO y en ausencia de cualquier contacto con macrófagos o matriz extracelular, lo que demuestra la existencia de un programa de diferenciación autónoma en progenitores comprometidos. Sin embargo, bajo estas condiciones, el grado de diferenciación y proliferación, así como la eficiencia de enucleación, de ninguna manera se asemeja a los rendimientos observados *in vivo*. Por lo tanto, las funciones que se ejercen en el nicho eritropoyético son necesarias para sostener la generación de $2 \cdot 10^6$ reticulocitos por segundo en estado estacionario, con una capacidad de aumentar la producción 15 a 20 veces bajo condiciones de estrés (Chasis and Mohandas, 2008).

1.5.1. Expansión y diferenciación de la serie eritropoyética *in vivo*

Las células progenitoras más precoces comprometidas con el linaje eritroide, las primeras células EPO-sensibles, son llamadas unidades formadoras de colonias “en estallido” (BFU-E) por su capacidad para formar colonias formadas por un gran número de eritroblastos hemoglobinizados en cultivos semisólidos. Estas células expresan antígenos de superficie característicos de las CMH como el CD34 y también

baja cantidad de receptores de la EPO (EPO-R) lo que determina su compromiso con el linaje eritroide. La proliferación y diferenciación de estas células dan lugar a células formadoras de colonias eritroides (CFU-E). Estas células precursoras se caracterizan por su capacidad para generar pequeñas colonias de eritroblastos hemoglobinizados (entre 16-34 células) y expresan niveles muy elevados de EPO-R. A partir de este estadio madurativo, la EPO es crítica para la conservación, proliferación y diferenciación de eritroblastos a lo largo del proceso eritropoyético.

La producción de eritrocitos, es el resultado final de una transformación ordenada de un proeritroblasto con un gran núcleo a un eritrocito sin núcleo. Estas células se dividen y diferencian sometándose a numerosos cambios substanciales, como la reducción en tamaño, condensación de la cromatina y hemoglobinización previo a su enucleación dando como resultado reticulocitos. Si bien la maduración citoplasmática es continua durante este proceso, las divisiones mitóticas intermedias producen una reducción del volumen citoplasmático y del núcleo, permitiendo reconocer morfológicamente a los proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos, eritroblastos ortocromáticos y reticulocitos. El esquema representado en la **Figura 1-3** resume el modelo teórico de eritropoyesis descrito. Conforme estas células proliferan y diferencian, la capacidad de síntesis aumenta rápidamente y es dirigida a la producción de las proteínas características de los eritrocitos, particularmente la hemoglobina, llegando a ser un 95 % de total (34 g/dl) en los eritrocitos.

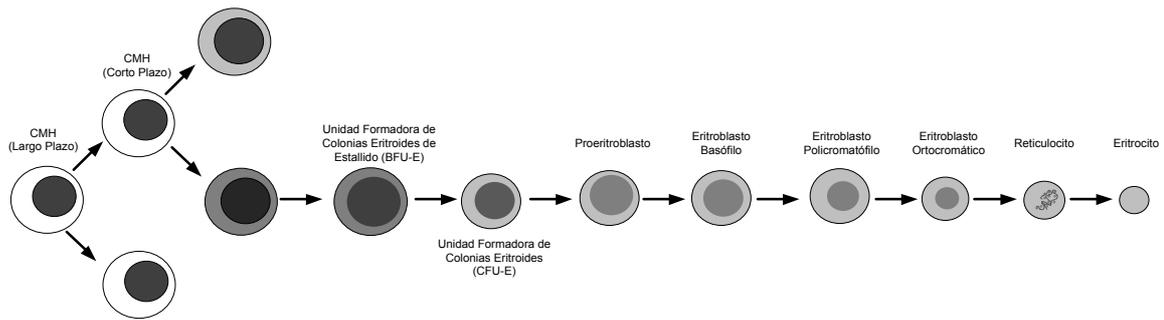


Figura 1–3 Diferenciación eritroide. Modelo teórico del proceso de diferenciación y maduración de células eritroides. Las CMH responden a una serie de citoquinas (SCF, IL-3, entre otras) diferenciándose a células progenitoras comprometidas BFU-E y CFU-E, estas células proliferan principalmente bajo el control de la EPO y finalmente diferencian hacia células precursoras: Proeritroblastos, Eritroblastos basófilos, Eritroblastos policromatófilos, Eritroblastos ortocromáticos. En presencia de los nutrientes necesarios (vitaminas, hierro, etc.) estas células precursoras proliferarán y madurarán en Reticulocitos y Eritrocitos.

1.6. Hemoglobina: función, estructura y fenotipo.

La hemoglobina (Hb) encapsulada en los eritrocitos es la proteína responsable del transporte de oxígeno (O_2) desde los pulmones a los tejidos del cuerpo, y también interacciona de forma específica con otros gases como el dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (NO).

Esta proteína globular de estructura cuaternaria, está constituida por dos pares de cadenas polipeptídicas distintas, una cadena de cada par es α - (o similar a la α -) y la otra β -, γ -, δ - o ϵ . Cada uno de estos cuatro polipéptidos que conforman el tetrámero tiene un espacio central (intersubunidad hidrófoba) que contiene un grupo prostético hemo (ferroprotoporfirina IX), el cual les confiere el color rojo a los eritrocitos. La unión reversible de los gases al átomo de hierro del grupo hemo en el tetrámero es lo que permite a la Hb el transporte efectivo de gases (Schechter, 2008). La afinidad del oxígeno por la Hb permite una saturación casi completa con el oxígeno en los pulmones, así como una descarga eficiente en los tejidos.

Durante el desarrollo humano, se suceden cambios en los tetrámeros de la Hb y en las subunidades de globina. Son tres los tipos de Hb normales que se sintetizan en el desarrollo humano: Hb embrionarias, Hb fetal y Hb adultas. Conforme se desarrolla el embrión, las Hb Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) y la Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) son la mayor parte de hemoglobina sintetizada. Cuando la eritropoyesis se transfiere al hígado, la hemoglobina sintetizada pasa a ser Hb fetal ($\alpha_2\gamma_2$) y se mantiene hasta el nacimiento. Desde un punto de vista funcional, la Hb fetal tiene una mayor afinidad por el oxígeno en comparación con la Hb adulta, en parte debido a una baja afinidad por el 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) de la Hb fetal (Bhanu, 2004; Wojda et al., 2002). En eritrocitos de humanos adultos normales las hemoglobinas presentes son la Hb A ($\alpha_2\beta_2$) 95-98%, seguida de la Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) 1-3% y Hb fetal ($\alpha_2\gamma_2$) menor a 1% (Beutler et al., 2005; Nagel, 2003; Schechter, 2008; Wojda et al., 2002).

1.7. Medicina transfusional

La transfusión de eritrocitos es una terapia estándar e indispensable en la clínica moderna. Desde los inicios de la terapia transfusional, se ha trabajado y desarrollado conocimiento con el objetivo final de asegurar la transfusión de productos compatibles, seguros y ampliamente disponibles. Actualmente, unas 92 millones de donaciones son recolectadas en todo el mundo con el fin de garantizar el correcto suministro. No obstante, existen diferencias significativas en cuanto a cantidad y calidad de estos productos entre países desarrollados y países en desarrollo. La mitad de estas donaciones son recolectadas en países desarrollados, los cuales representan tan sólo un 15% de la población mundial (World Health Organization, 2012). Si bien el suministro es adecuado en general en estos países, bajo ciertas circunstancias, como condiciones

climáticas extremas o desastres naturales, podrían generarse escases temporal. Incluso en condiciones normales se reportan anualmente dificultades para cubrir el total de la demanda. También se cree que el envejecimiento de la población en estos países acrecentará la escases, debido en parte, al incremento de la brecha entre donantes jóvenes y receptores mayores de 65 años (grupo con mayor frecuencia de transfusiones requeridas).

Además de cuestiones relacionadas con el suministro, existen todavía un gran número de problemas asociados a la práctica transfusional, como reacciones transfusionales inmediatas tales como: reacciones hemolíticas transfusionales, sensibilización frente a leucocitos y plaquetas, reacciones de hipersensibilidad pulmonar, reacciones alérgicas debido a sensibilización por proteínas plasmáticas, sobrecarga de volumen, contaminación bacteriana, reacciones asociadas con transfusiones masivas, síndromes hemorrágicos, entre otras. Y también reacciones tardías tales como: reacciones hemolíticas tardías, púrpura postransfusional y transmisión de enfermedades por contaminaciones virales o de protozoos, siendo estas el mayor riesgo al que se expone un enfermo transfundido. Otras complicaciones tardías como la aloinmunización contra antígenos eritrocitarios y de histocompatibilidad pueden darse en pacientes que requieren múltiples transfusiones (Alter and Klein, 2008; Beutler et al., 2005; Whitsett et al., 2012).

Estas complicaciones son asociadas de forma intrínseca a las fuentes celulares que se basan, en su mayoría, en donaciones altruistas de personas saludables. La heterogeneidad en cuanto a antígenos y anticuerpos eritrocitarios, antígenos plaquetarios y leucocitarios, la edad de los donantes, condición médica y riesgo de infecciones que podrían transmitir son una constante preocupación de los servicios públicos de salud en todo el mundo. En vista de estas consideraciones, la comunidad

científica ha realizado esfuerzos significativos durante estas últimas décadas para desarrollar productos alternativos substitutos para transfusión.

1.7.1. Productos alternativos de transfusión

Los motivos previamente expuestos, han impulsado la investigación y desarrollo de productos alternativos para su aplicación clínica como substitutos a la transfusión convencional. En los últimos años la comunidad científica ha evaluado distintas alternativas, tales como soluciones de hemoglobina libre modificada, hemoglobina encapsuladas en liposomas, emulsiones de perfluorcarbonos y más recientemente, gracias a los avances en el campo de las terapias celulares avanzadas, eritrocitos producidos *ex vivo* a partir de distintas fuentes celulares como productos alternativos para transfusión.

1.7.1.1 Soluciones de hemoglobina transportadoras de oxígeno

La hemoglobina libre causa problemas de toxicidad y vasoconstricción que invalidan su aplicación directa, por tanto es necesaria su modificación química. Estos productos consisten generalmente en una solución acuosa homogénea de hemoglobina químicamente modificada, esencialmente libre de residuos de los eritrocitos. El material de partida para estas soluciones puede ser hemoglobina purificada obtenida de distintas fuentes, incluyendo sangre caducada humano o sangre bovina, o incluso hemoglobina de origen recombinante. La modificación química consiste en entrecruzamiento intramolecular, oligomerización y/o conjugación de polímeros, para modificar la hemoglobina de modo que su persistencia en la circulación se prolongue, y sus afinidad con el oxígeno sean similares a la hemoglobina nativa (Beutler et al., 2005). Durante los estudios preclínicos y clínicos realizados de estos productos en el pasado, surgieron

problemas relacionados con la seguridad, toxicidad (sobre todo, nefrotoxicidad) y otras complicaciones asociadas, como infarto de miocardio, lo cual determinó que los riesgos superaban ampliamente los beneficios de su utilización (FDA, 2004; Natanson et al., 2008; van Veen and Hunt, 2014).

1.7.1.2 Emulsiones de perfluorocarbonos

Los perfluorocarbonos son compuestos orgánicos en los que todos los átomos de hidrógeno son sustituidos por flúor. Estos compuestos tienen una mayor capacidad para transportar oxígeno, son químicamente inertes y no se metabolizan. Estos compuestos deben ser emulsionados con surfactantes para poder mezclarse con la sangre. Muchos de estos compuestos han sido ensayados en humanos, pero hasta el momento carecen de valor terapéutico y su uso conlleva serias complicaciones como toxicidad pulmonar, citotoxicidad, activación del complemento, retención de perfluorocarbono en el hígado y bazo y potenciación de la toxicidad por el oxígeno (Beutler et al., 2005; FDA, 2004).

1.8. Producción de eritrocitos *ex vivo* como producto alternativo de transfusión

En la última década se ha centrado la atención en la producción *ex vivo* de eritrocitos como posible producto alternativo para transfusión. Gracias a los avances logrados en tecnologías del cultivo celular, y al conocimiento desarrollado entorno a los procesos que rigen la eritropoyesis, se han desarrollado procedimientos experimentales para la obtención de reticulocitos funcionales *ex vivo*, mediante la expansión y diferenciación de CMH de fuentes diversas (DOUAY and ANDREU, 2007; Giarratana et al., 2004; Miharada et al., 2006; Neildez-Nguyen et al., 2002).

Un estudio realizado en 2002 reportó que precursores eritropoyéticos humanos producidas *in vitro* eran capaces de madurar y enuclear *in vivo* en ratones inmunocomprometidos (Neildez-Nguyen et al., 2002). Este estudio seminal demostró que las células eritroides producidas *ex vivo* a partir de CMH podrían representar una alternativa a futuro como producto de transfusión. Luego, en 2005 el grupo de investigación del Prof. Douay reportó un protocolo experimental mediante el cual se obtuvieron reticulocitos funcionales enucleados partiendo de células CD34⁺ purificadas de SCU (Giarratana et al., 2004). El procedimiento descrito definía una estrategia de cultivo basada en la adición secuencial al cultivo de SCF, IL-3 y EPO y el empleo de células estromales con el objetivo de asimilar las condiciones fisiológicas del nicho, generando condiciones idóneas para la maduración terminal y enucleación de los eritroblastos. A pesar de los excelentes resultados obtenidos, el empleo de células estromales representaba un serio obstáculo por cuestiones regulatorias y limitaba la escalabilidad del proceso. Un avance sustancial en este sentido fue publicado en 2006 (Miharada et al., 2006). En dicho trabajo se demostró que mediante la utilización de suero humano en los medios de cultivo, eritroblastos producidos *ex vivo* alcanzaban su diferenciación terminal y enucleaban de forma autónoma demostrando así que la interacción de los eritroblastos con otras células no es necesaria y que las señales mediadas por factores humorales parecen ser suficientes para inducir la enucleación.

Desde la publicación de estos primeros trabajos, numerosos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de métodos mejorados de cultivo para la obtención de eritrocitos *ex vivo* de distintas fuentes, mejorar los procesos de enucleación, profundizar en la caracterización de las propiedades físicas y funcionales de las células generadas, entre otras cuestiones. Como resultado, al día de la fecha se han descrito una gran variedad de estrategias de cultivo desarrolladas, en su mayoría,

empleando sistemas estáticos de cultivo (frascos de cultivo) a pequeña escala (Migliaccio et al., 2012b; Timmins and Nielsen, 2011; 2009). Los resultados obtenidos hasta el momento difieren según la fuente celular y las condiciones de cultivo establecidas. Los factores de expansión logrados, el grado de enucleación alcanzado y el fenotipo de hemoglobina expresado son los parámetros más destacados a evaluar. En general estos protocolos son definidos por fases de cultivo (expansión, diferenciación, enucleación, etc.) en medios de cultivo basales suplementados con transferrina, albúmina de origen animal o humana, insulina y distintas combinaciones de citoquinas dependiendo de la fase del cultivo. La combinación de citoquinas y factores estimulantes empleados también varían, no obstante, en los trabajos más recientes existe un consenso generalizado entorno a la utilización de SCF, IL-3 y EPO como factores extrínsecos críticos del proceso.

A partir de estos avances realizados, en 2011, el grupo del Prof. Douay llevó adelante la primera prueba de concepto en humanos. Células CD34⁺ obtenidas por aféresis del voluntario, fueron expandidas y diferenciadas *ex vivo* bajo buenas prácticas de fabricación (cGMP). En total, unos 10 millones de reticulocitos (el equivalente a 2 mL de sangre) fueron transfundidos al voluntario. El estudio reportó que la supervivencia *in vivo* de las células autólogas producidas *ex vivo* fue comparable a las células nativas (Giarratana et al., 2011).

Un tema de recurrente discusión y particular interés se centra en el estudio y desarrollo de nuevas fuentes alternativas como material de partida para la producción *ex vivo* de eritrocitos. La elección de la fuente de CMH es una decisión de compromiso entre la accesibilidad a estas, el potencial de expansión *in vitro* de las CMH y funcionalidad de las células derivadas, además de cuestiones regulatorios y éticas entre otras.

Si bien las CMH primarias obtenidas de SMP, MO y SCU han demostrado una elevada capacidad de proliferación *in vitro*, dichas fuentes son limitadas. La fuente celular deseable para la producción a escala debería contar con, en teoría, un potencial de proliferación “ilimitado” que permita una correcta caracterización de la línea celular según criterios cGMP, y garantice una homogeneidad del producto final en cantidades suficientes para su aplicación clínica.

Con este objetivo en mente, muchos equipos han centrado su investigación en fuentes alternativas con (en teoría) potencial ilimitado de proliferación empleando entre otras alternativas, células madre embrionarias humanas (hESC) y células madre pluripotenciales inducidas humanas (hiPSC) motivados por el potencial de estas células. En estos últimos años, se han establecidos y caracterizado algunas líneas celulares eritroides derivadas de células pluripotenciales embrionarias (Carotta, 2004; Chang, 2006; Lu et al., 2008; OLIVIER et al., 2006; Olsen, 2006). En 2008, un estudio reportó que células progenitoras eritroides obtenidas a partir de células embrionarias de ratón, tras ser trasplantadas en ratones con anemia aguda, estas eran capaces de proliferar de forma transitoria y diferenciarse en eritrocitos funcionales, mejorando significativamente la anemia aguda (Hiroyama et al., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, otra fuente alternativa son las células hiPSC. Estas líneas celulares pueden obtenerse a partir de células somáticas adultas. Existe un interés particular en la obtención de líneas celulares a partir de dicha fuente, ya que estas, allanarían el camino para el desarrollo a futuro de los productos de transfusión alogénica; permitiendo seleccionar las células necesarias para resolver situaciones de compatibilidad sanguínea particularmente desafiantes. Estudios recientes reportaron la obtención de eritrocitos funcionales enucleados que expresan hemoglobina fetal

mediante diferenciación de células madre pluripotenciales humanas derivadas de fibroblastos fetales y adultos (Lapillonne et al., 2010).

Por último, una estrategia prometedora a futuro es la obtención de líneas celulares progenitoras eritroides inmortalizadas, con capacidad de proliferación y diferenciación terminal. En este campo de estudio, publicaciones recientes han demostrado mediante un sistema de expresión inducible, que la sobreexpresión de ciertos protooncogenes en células progenitoras hematopoyéticas derivadas de células madre pluripotenciales (hESC y/o hiPSC), son capaces de sostener su proliferación de forma sostenida y exponencial; y en ausencia del inductor diferenciar de forma terminal en células eritroides funcionales (Hirose et al., 2013; Kurita et al., 2013).

Pese a estos prometedores resultados y extraordinarios avances realizados entorno a dichas fuentes alternativas, ninguno de los métodos descritos hasta la fecha es adecuado para su desarrollo bajo cGMP. A su vez, los protocolos de cultivo son por demás complicados, de muy difícil transferencia tecnológica para procesos a gran escala y en general los rendimientos son bajos en comparación a CMH primarias. Además de otras cuestiones todavía por ser resueltas entorno a la estabilidad genética de las células derivadas, expresión residual de transgenes, inestabilidad fenotípica y riesgos inmunogénicos, entre otros.

Por tanto, independientemente de las fuentes a ser empleadas en el futuro y cuestiones biológicas y regulatorias todavía por resolver, hoy día resulta razonable el empleo de CMH obtenidas de SCU como fuente celular para el desarrollo y mejora de los métodos y procesos.

La producción de eritrocitos como producto terapéutico alternativo de transfusión es un reto sin igual para la industria biotecnológica. Para convertirse en una alternativa real a

futuro, se deben definir las bases de un bioproceso robusto, económicamente viable, escalable y transferible bajo buenas prácticas de manufactura (cGMP); capaz de generar cantidades equivalentes de células funcionales a las transfusiones convencionales ($2 \cdot 10^{12}$ células/unidad aprox.).

Pese a los grandes avances realizados hasta el momento, la producción *ex vivo* de eritrocitos en cantidades suficientes necesarias para su evaluación en clínica empleando los métodos actuales es simplemente inviable. La mayoría de los métodos descritos hasta la fecha emplean sistemas estáticos de cultivo a escala de laboratorio, no apropiados para el escalado del proceso y con rendimientos volumétricos bajos en general (Timmins and Nielsen, 2011; 2009).

En este contexto, y en base a los resultados obtenidos hasta el momento, se hace evidente la necesidad de desarrollar una estrategia de cultivo optimizada y escalable empleando bioreactores convencionales como plataforma tecnológica para la producción *ex vivo* de eritrocitos. De esta manera, se formula como hipótesis de trabajo que el diseño de una estrategia optimizada de cultivo en bioreactores convencionales para la producción de eritrocitos *in vitro* a partir de CMH obtenidas de SCU, es una condición esencial y necesaria para el desarrollo del conocimiento, y a futuro, la vía más razonable para la fabricación a escala clínica de eritrocitos como producto alternativo para transfusión.

Por tanto, en este trabajo experimental no sólo se pretende desarrollar un método optimizado para la obtención de eritrocitos *ex vivo*, sino que se pretende desarrollar tecnologías del cultivo celular que permitan la utilización de bioreactores como sistemas de referencia para la expansión y diferenciación de progenitores, permitiendo así definir las bases de un bioproceso robusto y escalable, capaz de producir cantidades suficientes

de eritrocitos para su evaluación en clínica como producto terapéutico alternativo de transfusión.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo se centra en el desarrollo de un bioproceso para la producción *ex vivo* de eritrocitos a partir de la expansión y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical.

A fin de conseguir este objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos secundarios:

- Definir una estrategia de cultivo integrada que permita de forma robusta y reproducible, en una primera etapa, la expansión masiva de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical comprometidas con el linaje eritroide, seguida por una segunda etapa, que permita la diferenciación terminal y enucleación de las células precursoras eritroides.
- Caracterizar las distintas poblaciones celulares en cultivo mediante estudios funcionales, y evaluar los principales atributos del producto celular generado en base a ensayos *in vitro*.
- Transferir la metodología de cultivo, desarrollada en sistemas de cultivo estáticos, a sistemas agitados de cultivo (bioreactor) como plataforma para la generación a escala de eritrocitos bajo condiciones monitorizadas y controladas de cultivo.

CAPÍTULO 3

Desarrollo de una estrategia para la
expansión masiva de CPE

3. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA PARA LA EXPANSIÓN MASIVA DE CPE

3.1. INTRODUCCIÓN

La SCU es hoy día una fuente viable y accesible de CMH inmaduras con un extraordinario potencial para el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas, de gran interés en el desarrollo de nuevas terapias celulares y producción de distintos componentes sanguíneos mediante el empleo de tecnologías de cultivo celular.

Como ya se ha mencionado, la aplicación de estas células como fuente alternativa para la generación *in vitro* de eritrocitos ha generado gran expectativa en los últimos años (DOUAY and ANDREU, 2007; Migliaccio et al., 2012b; Whitsett et al., 2012). Con el fin de estudiar esta alternativa, y en base al conocimiento previo desarrollado por el grupo de investigación entorno a estrategias de expansión *in vitro* de CMH CD34⁺ (Pla, 2011) y desarrollo de nuevos productos de terapia celular, mediante la expansión y especialización de CPH (Casamayor, 2014), se plantea como objetivo en este trabajo el desarrollo de una estrategia optimizada de cultivo escalable, definida para la generación *in vitro* de eritrocitos mediante la expansión y diferenciación de CMH de SCU.

En general, las estrategias desarrolladas hasta la fecha se estructuran en dos o más fases de cultivo, las cuales tienen como objetivo definido el compromiso de las CMH con el linaje eritroide, la expansión de CPE y maduración terminal de eritroblastos. Las CMH CD34⁺ son probablemente las células madre adultas mejor caracterizadas. La obtención de estas células presentes en la sangre de cordón umbilical, en general se realiza mediante, primero una concentración de CMN, seguido de una selección por immunoafinidad de la población CD34⁺. En cultivo, las células son capaces de comprometerse, proliferar y diferenciar hacia un linaje en concreto gracias a estímulos

epigénéticos, entre otros factores. En concreto, *stem cell factor* (SCF) en combinación con interleuquina 3 (IL-3) y eritropoyetina (EPO), de forma extrínseca y sinérgica son capaces de estimular la proliferación y compromiso de CMH CD34⁺ con el linaje eritroide en cultivos *in vitro* (Metcalf, 2008; Ogawa, 1993; Zhang and Lodish, 2008). A su vez, el empleo de glucocorticoides (hidrocortisona), coopera con las citoquinas prolongando la expansión en detrimento de la diferenciación terminal de los progenitores eritroides en cultivo, ejerciendo un rol pleiotrópico en las CMH y CPE (Kolbus, 2003; Leberbauer, 2005; Lindern et al., 1999; Migliaccio et al., 2010).

El grado de expansión y diferenciación de las CMH en cultivos *in vitro* depende, además de estímulos extrínsecos, de variables fisicoquímicas del proceso, del sistema de cultivo empleado y la composición del medio (nutrientes y metabolitos) entre otras variables. Por tanto, este primer capítulo del trabajo experimental se plantea con el objetivo de definir condiciones de cultivo que favorezcan la expansión de células progenitoras comprometidas con el linaje eritroide a fin de definir en esta primera fase del proceso, una estrategia optimizada y robusta de cultivo para la expansión masiva de progenitores eritroides a partir de células CD34⁺ de SCU.

Con este objetivo en claro, inicialmente se lleva a cabo una caracterización de las cinéticas de crecimiento en cultivos discontinuos como estrategia de referencia. El análisis de la evolución de estos cultivos nos permite comprender las interacciones de las células con su entorno, determinar la naturaleza de posibles limitaciones del cultivo y plantear futuras estrategias alternativas a fin de optimizar el rendimiento de expansión. De forma paralela, y dada la naturaleza transitoria de las distintas subpoblaciones en cultivo, se realiza una caracterización fenotípica a fin de establecer el compromiso con el linaje eritroide, el grado de diferenciación y maduración de las células generadas en cultivo. A partir del estudio y caracterización de estas variables, se

define una primera fase de expansión del proceso, caracterizada y definida por el compromiso, expansión y diferenciación parcial de CPE y eritroblastos.

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Estudio de la cinética de crecimiento de CPE en cultivos discontinuos.

La generación de un elevado número de células necesarias para lograr dosis terapéuticas exige un proceso de expansión primario de CMH y CPE significativo. El estudio de las cinéticas de crecimiento en cultivos *in vitro* nos permite comprender la dinámica de estos sistemas, identificar variables críticas del proceso y definir parámetros de operación necesarios para establecer una estrategia de expansión robusta y escalable, capaz de generar el mayor número posible de CPE y eritroblastos a partir de CMH CD34⁺ de SCU como fuente para la generación *in vitro* de eritrocitos.

Un parámetro clave, dentro de estas variables de estudio, es la densidad celular de siembra (Köhler et al., 1999; Ozturk and Hu, 2005; Xu et al., 2000). El estudio se realiza sobre un conjunto de cultivos iniciados a diferentes concentraciones celulares ($1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ Cél. CD34⁺/mL) iniciados a partir de células CD34⁺ purificadas de SCU. Como sistemas de cultivo se emplean frascos de cultivo (*T-flask*) siguiendo una estrategia discontinua, es decir, sin recambio o modificación significativa del volumen de medio de cultivo por un período de 16 días aproximadamente. El medio de cultivo empleado HP01[®] (Macopharma, Mouvauz, Francia), es un medio químicamente definido, libre de suero y libre de componentes de origen animal; formulado con albúmina humana de grado clínico y suplementado con transferrina humana, hidrocortisona, EPO, SCF y IL-3 (7.2.1). El seguimiento se realiza de forma diaria,

tomando una muestra a cada uno de los cultivos para la cuantificación de células CD34⁺ y células nucleadas totales mediante citometría de flujo.

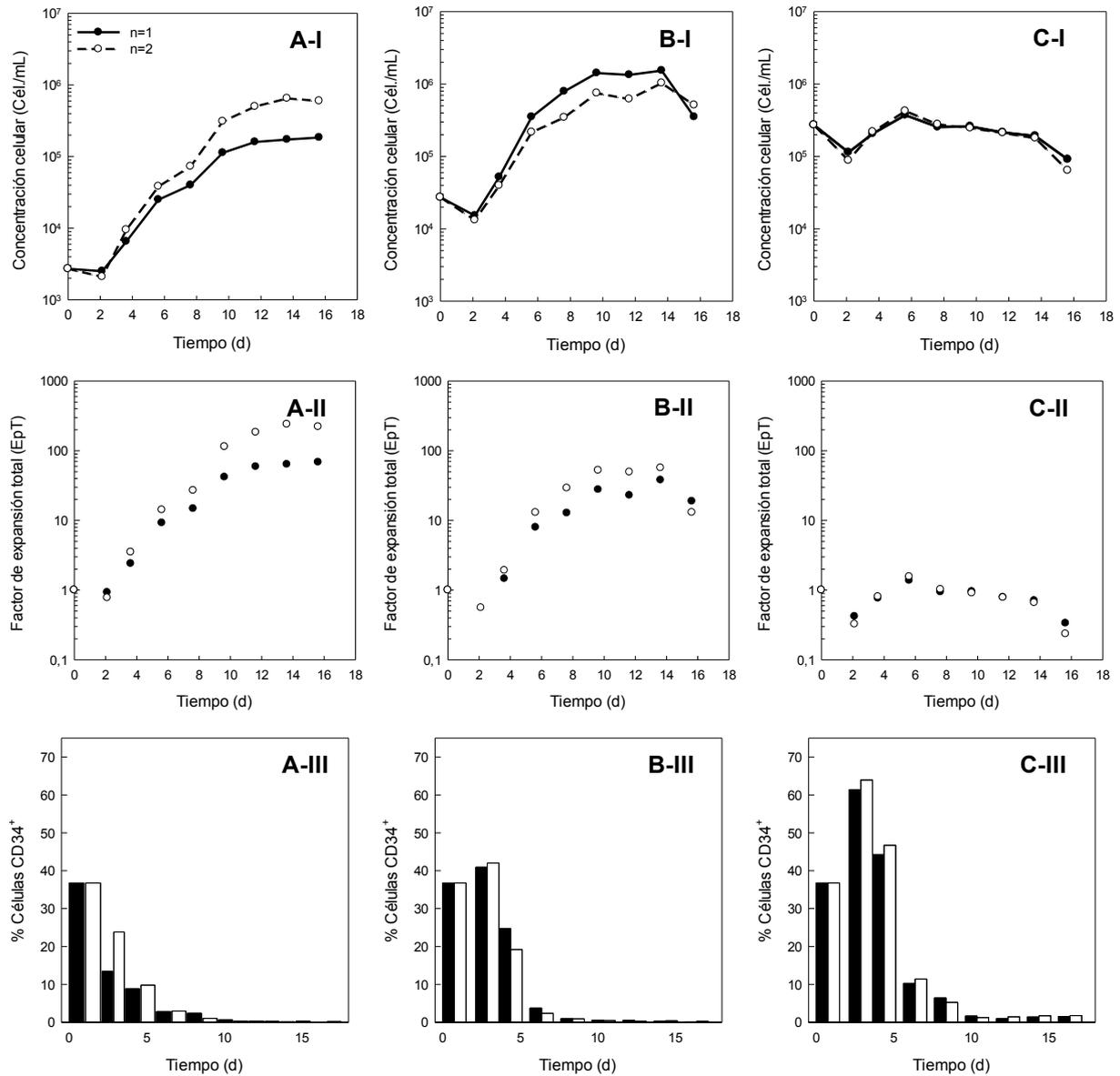


Figura 3-1 Estudio del efecto de densidad de siembra. Evolución temporal de los cultivos iniciados a distintas concentraciones de células CD34⁺. Evolución de la concentración de células viables (A-I: 1·10³, B-I: 1·10⁴ y C-I: 1·10⁵ CD34⁺/mL); factor de expansión total alcanzado en los cultivos (A-II: 1·10³, B-II: 1·10⁴ y C-II: 1·10⁵ CD34⁺/mL) y porcentaje de células CD34⁺ respecto al total de células viables (A-III: 1·10³, B-III: 1·10⁴ y C-III: 1·10⁵ CD34⁺/mL) en cultivos discontinuos por duplicado (●: n1, ○: n2) de células CD34⁺ purificadas de SCU. Los cultivos se mantienen durante 16 días sin adición de medio fresco. Las condiciones de cultivo son 37°C, 95% de humedad y en atmosfera enriquecida al 5% de CO₂.

Los resultados de estos estudios se resumen en la **Figura 3–1**. Los cultivos iniciados a $1 \cdot 10^3$ Cél. CD34⁺/mL muestran un perfil de expansión de células totales sostenido por un período de entre 8 y 10 días, llegando a concentraciones de entre $2 \cdot 10^5$ y $6 \cdot 10^5$ Cél./mL.

De similar comportamiento, los cultivos iniciados a $1 \cdot 10^4$ Cél. CD34⁺/mL muestran un período de crecimiento sostenido durante 8 días aproximadamente, obteniéndose concentraciones celulares entorno a $1,0 - 1,5 \cdot 10^6$ Cél./mL. En ambos casos se observa un perfil de crecimiento típico de células animales en cultivos *in vitro* siguiendo una estrategia discontinua. Es decir, una zona en la cual las células crecen exponencialmente, pues disponen de todos los nutrientes y factores necesarios; seguido de una zona en donde no se observa crecimiento, probablemente por alguna limitación fisiológica, depleción de algún factor extrínseco o acumulación de factores solubles inhibidores generados por células maduras en cultivo. Cabe destacar que el factor de expansión de células totales es mayor en los cultivos iniciados a $1 \cdot 10^3$ Cél. CD34⁺/mL, probablemente debido a una menor exposición por parte de las células CD34⁺ a factores inhibidores. La evolución en cultivo de las células CD34⁺ se representa como porcentaje respecto al total de células nucleadas. Tanto en el cultivo iniciado a $1 \cdot 10^3$ Cél. CD34⁺/mL, como en el cultivo iniciado a $1 \cdot 10^4$ Cél. CD34⁺/mL, el porcentaje de células CD34⁺ decrece respecto al total conforme evoluciona el cultivo. Esto evidencia una relativa baja tasa de expansión de la población de CMH CD34⁺ respecto al total de células nucleadas generadas, probablemente por compromiso (división asimétrica) y diferenciación celular debido a la combinación de citoquinas empleadas. En los cultivos iniciados a $1 \cdot 10^5$ Cél. CD34⁺/mL, no se observa crecimiento neto de células totales nucleadas, producto quizás, de algún tipo de inhibición; ya sea por concentración de

factores endógenos inhibidores, o interacciones celulares negativas que afectan la capacidad replicativa de las células CD34⁺.

	Período de crecimiento (días)	Concentración celular máxima (Cél./mL)	Factor de expansión total (EpT)
1·10 ³ Cél. CD34 ⁺ /mL	8-10	2,0-6,0·10 ⁵	70-240
1·10 ⁴ Cél. CD34 ⁺ /mL	8	1,0-1,5·10 ⁶	38-56
1·10 ⁵ Cél. CD34 ⁺ /mL	2-4	4,0·10 ⁵	1

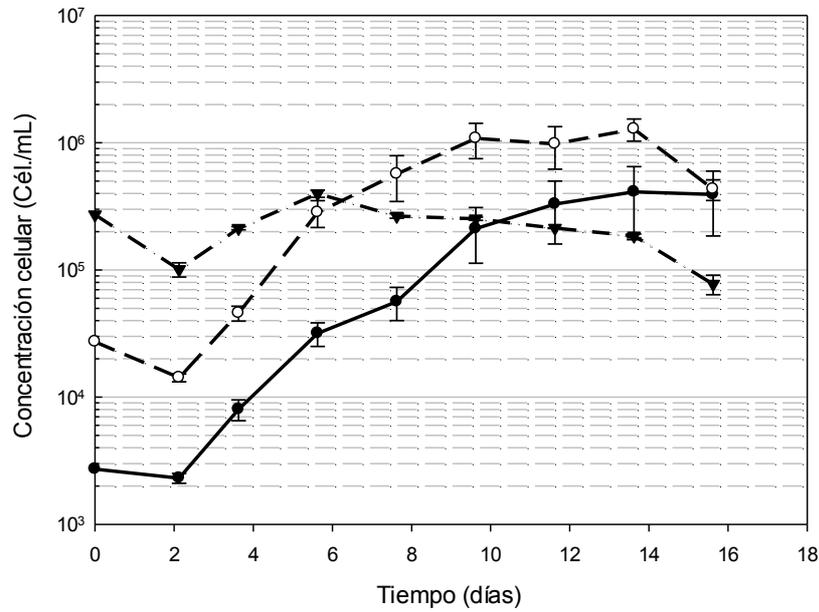
Figura 3-2 Parámetros de cultivo utilizados como criterios de comparación. Duración de la etapa de crecimiento exponencial (días), concentración máxima de células (Cél./mL) y factor de expansión total (EpT) logrado durante la etapa de crecimiento exponencial de cada una de las concentraciones iniciales estudiadas.

Esta limitación en la capacidad de expansión a concentraciones elevadas de célula iniciales, demuestra la criticidad de la variable en estudio y nos permite definir el rango óptimo de células iniciales a emplear en sistemas estáticos de cultivo. Así, la capacidad de expansión de células totales máxima lograda en los cultivos iniciados a 1·10³ Cél. CD34⁺/mL es de 70 a 240 veces, mientras que los cultivos iniciados a 1·10⁴ Cél. CD34⁺/mL es de 38 a 56 veces.

Si bien, se observa una mayor capacidad de expansión en los cultivos iniciados a 1·10³ Cél. CD34⁺/mL, las concentraciones celulares máximas logradas en estos cultivos son entre 2,5 y 5 veces inferiores respecto a las concentraciones logradas a 1·10⁴ Cél. CD34⁺/mL iniciales. Disponer condiciones de cultivo a tan bajas concentraciones celulares requeriría de una capacidad volumétrica de cultivo muy elevada. Por otro lado, se ha observado que en los cultivos estudiados es posible obtener concentraciones celulares muy superiores. Esto nos permite suponer que probablemente, mejorando la estrategia de cultivo empleada se logre optimizar la capacidad de expansión a concentraciones mayores que 1·10³ Cél. CD34⁺/mL, aumentando así la cantidad de

células totales generadas y mejorando la productividad volumétrica de los sistemas de cultivo estudiados.

A



B

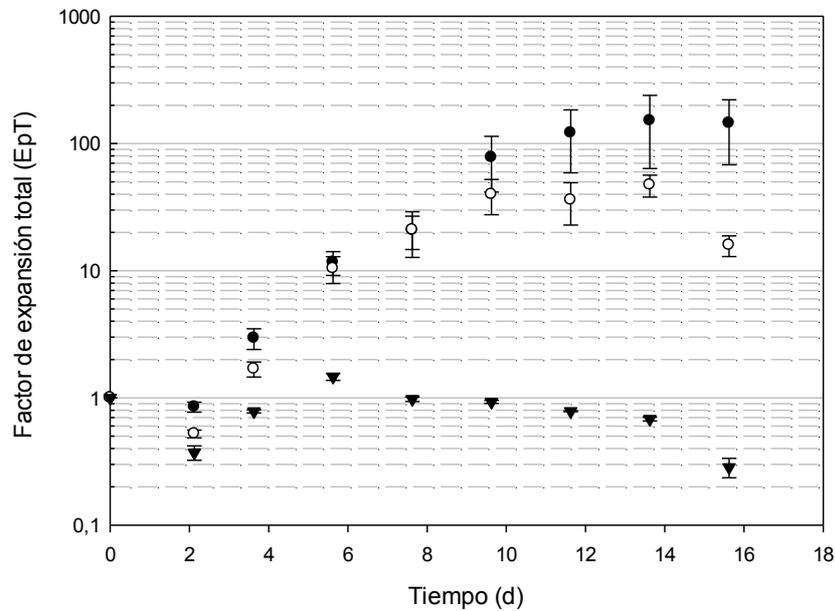


Figura 3-3 A) Evolución de la concentración celular de los cultivos iniciados a distintas concentraciones: (●) 1 · 10³ CD34⁺/mL; (○) 1 · 10⁴ CD34⁺/mL y (▼) 1 · 10⁵ CD34⁺/mL. **B)** Factor de expansión total logrado en los distintos cultivos. Los cultivos se llevaron a cabo en sistema *T-flask* de 25 cm² con sistema de venteo para intercambio de gases y en medio libre de suero HP01 suplementado con citoquinas. Los cultivos se mantienen durante 16 días y no se realiza ninguna adición o recambio de medio de cultivo. Los cultivos se mantienen a 37°C, 95% de humedad y en atmósfera enriquecida al 5% de CO₂.

3.3. Diseño de una estrategia de cultivo optimizada para la expansión de células progenitoras eritroides.

Del análisis de los estudios realizados en los cultivos en discontinuo, podemos suponer la existencia de un efecto inhibitor del cultivo a concentraciones iniciales elevadas ($1 \cdot 10^5$ Cél. CD34⁺/mL). En el otro extremo, a concentraciones bajas de inoculo ($1 \cdot 10^3$ Cél. CD34⁺/mL), la capacidad de expansión del cultivo es superior; no obstante las concentraciones celulares obtenidas son bajas.

Una de las principales limitaciones en los cultivos de CMH es la rápida generación de células maduras (diferenciadas) y la consecuente acumulación de factores inhibidores producidos por estas (Csaszar et al., 2012; Kirouac et al., 2009; Majka et al., 2001) (*Inhibitory Feedback Signaling*). Estudios previos realizados por el grupo de investigación (Pla, 2011) han permitido determinar las causas del bloqueo de la actividad duplicativa de las CMH CD34⁺ en cultivos de expansión, debido a la acumulación de estos factores inhibidores generados por células maduras.

Un enfoque factible para evitar la acumulación temprana de señales autocrinas/paracrinas inhibitorias, y por consiguiente, mejorar la capacidad de expansión global de los cultivos; es la dilución de estos factores mediante la adición de medio fresco a los cultivos (Csaszar et al., 2012). Con dicho fin, se estudia una serie de cultivos a los cuales se les realiza un recambio parcial del medio de forma periódica, implementando por tanto, una estrategia de cultivo discontinua alimentada.

Los cultivos estudiados se iniciaron a una concentración de $1 \cdot 10^4$ Cél. CD34⁺/mL, purificadas de SCU. Los mismos se mantuvieron durante 12 días aproximadamente. Al igual que en los estudios en discontinuo, el medio de cultivo empleado es HP01[®] suplementado con transferrina humana, hidrocortisona, EPO, SCF y IL-3 (7.2.1.) La

estrategia ensayada consistió en realizar una primera dilución 1:1 (volumen de cultivo : volumen de medio fresco) entre los días 4 y 6 de cultivo. Posteriormente, se mantuvo un régimen de diluciones 1:1 cada 2-3 días. Previo a cada actuación, se tomaron muestras a cada uno de los cultivos para la cuantificación de células CD34⁺ y de células nucleadas totales mediante citometría de flujo.

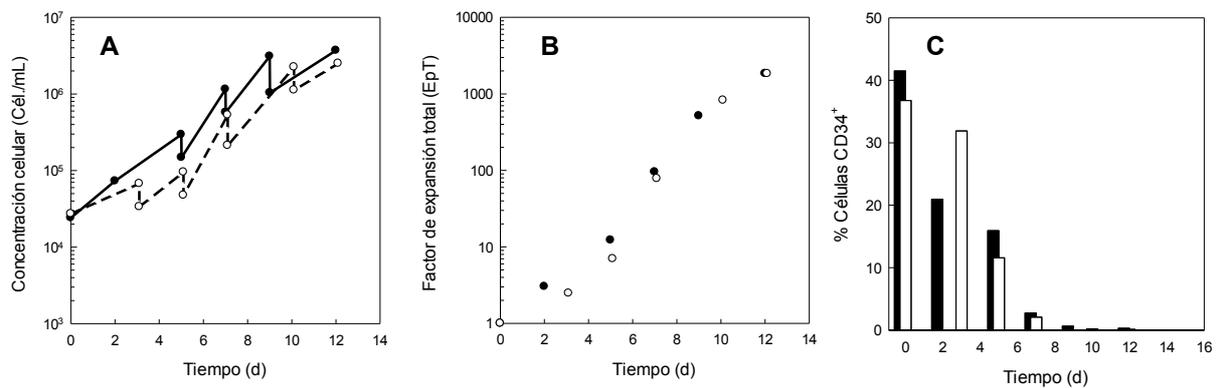


Figura 3-4 Definición de estrategia optimizada de expansión de progenitores eritroides en sistemas estáticos. Evolución temporal de los cultivos empleando estrategia avanzada: discontinua alimentada en sistemas estáticos. Evolución de la concentración de células viables en el tiempo (A), factor de expansión total (B) y porcentaje de células CD34⁺ respecto al total de células viables (C) por duplicado (●: n1, ○: n2) de células CD34⁺ obtenidas de SCU.

En la **Figura 3-4** se representan gráficamente los resultados obtenidos. La estrategia de expansión implementada permite una proliferación de células totales sostenida en el tiempo, logrando factores de expansión acumulados de 1840,0 veces para la población de células totales a día 12 de cultivo. En cuanto al perfil del cultivo, la estrategia implementada sostiene el crecimiento de la población de células CD34⁺ hasta el día 7 de cultivo aproximadamente. No obstante, la tasa de crecimiento de estas células es menor al crecimiento de CNT, generándose una dilución en el tiempo de la población de células progenitoras, sometidas interacciones cada vez mayores con células adultas acumuladas en cultivo. En cuanto a la concentración de células totales, observamos un crecimiento sostenido en el tiempo por mas de 12 días en cultivo, arribando a

concentraciones de entre $2,5$ y $3,7 \cdot 10^6$ Cél./mL. Las CPE remanentes en cultivo junto a los proeritroblastos más inmaduros, sostienen el crecimiento de los cultivos a partir de este momento.

En la **Figura 3–5** se representa gráficamente, y a modo comparativo, los factores de expansión obtenidos en los cultivos discontinuos y los factores de expansión obtenidos en cultivos discontinuos alimentados. La implementación de una estrategia discontinua alimentada permite superar en parte fenómenos inhibitorios observados en los cultivos discontinuos, evidenciándose una mayor capacidad de expansión de células totales, respecto de una estrategia discontinua.

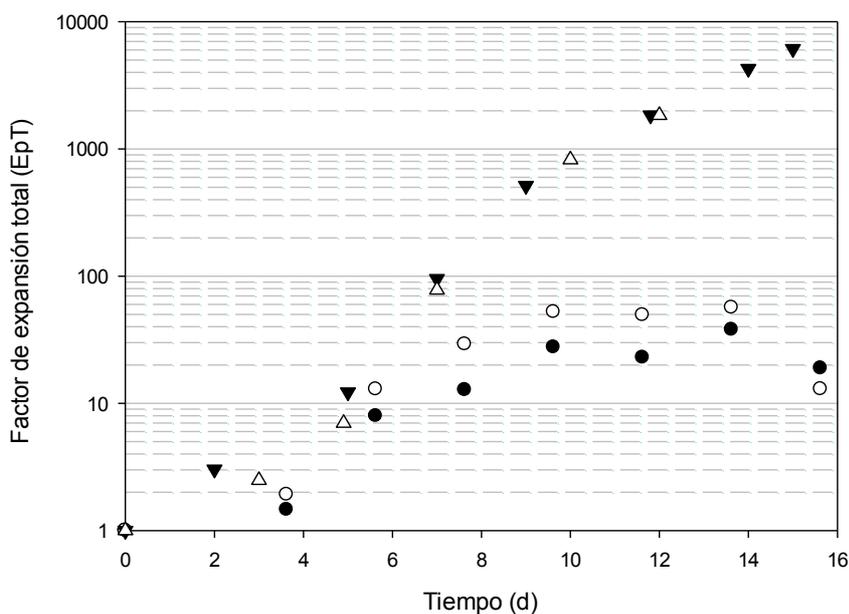


Figura 3–5 Eficiencia mejorada del crecimiento (factor de expansión) celular bajo estrategia optimizada de cultivo: discontinuo alimentado. Factor de expansión total de cultivos en discontinuo (●: n1; ○: n2) y cultivos bajo estrategia discontinua alimentada (▲ : n1; ▼ : n2).

3.3.1. Estudio y optimización de condiciones de cultivo para la expansión de CPE: medio de cultivo basal.

Para proliferar *in vitro*, las células requieren además de factores extrínsecos, una compleja combinación de nutrientes presentes en los medios de cultivo. La formulación de estos medios proporciona a las células fuentes de carbono y energía (principalmente glucosa y glutamina), aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas y otros compuestos que permiten mantener el pH y la presión osmótica en condiciones fisiológicas.

El medio de cultivo HP01[®] (MacoPharma, Tourcoing Francia), empleado en anteriores desarrollos por el grupo de investigación en cultivos de expansión de CMH, es un medio comercial concebido para expansión de CMH y CPH en cultivos *in vitro* (Ivanovic et al., 2006). Su formulación es libre de componentes de origen animal y es elaborado, según buenas prácticas de manufactura (cGMP), en lotes reducidos. Debido a estas características, su coste es elevado y su disponibilidad es limitada. Otro aspecto importante, dado que es un desarrollo comercial, es que no disponemos de la composición precisa del mismo, ya que ésta se encuentra protegida bajo secreto industrial.

Uno requerimiento fundamental para el desarrollo de un bioproceso de estas características es disponer de un medio basal, económicamente viable, que se ajuste a las necesidades y requerimientos de las distintas poblaciones celulares en las sucesivas etapas del cultivo. En consecuencia, se plantea la necesidad de evaluar un medio basal alternativo, de composición definida, que permita el desarrollo de su formulación y la optimización de sus componentes según los requerimientos de cultivo.

Por tal motivo, se realizan una serie de estudios comparativos entre el medio comercial HP01[®] y un medio basal IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*) de

composición definida, suplementado con suero adulto humano (hSerB, Banc de Sang i Teixits), que soporte el crecimiento de CMH y CPE en la fase proliferativa y que se ajuste a las necesidades en la fase madurativa, permitiendo la correcta diferenciación de las células adultas en cultivo. El detalle de los suplementos y concentración empleados para la formulación de los distintos medios estudiados se detalla en la **Figura 3–6**.

Los cultivos se realizan a partir de células CD34⁺ purificadas de SCU. La concentración inicial en todos los cultivos es de $1 \cdot 10^4$ Cél. CD34⁺/mL y se implementó una estrategia discontinua alimentada idéntica a la desarrollada en los experimentos anteriores. Los cultivos se mantuvieron entre 8 y 10 aproximadamente, a 37°C y en atmosfera enriquecida al 5% en CO₂. Periódicamente y previo a las actuaciones, se toma muestra de los cultivos para el seguimiento de la densidad celular, tanto de la población CD34⁺ como de células totales. A partir de los datos obtenidos se calculan los factores de expansión total y el porcentaje de células CD34⁺ respecto del total.

	Medios de cultivo	
	HP01 + Citoquinas	IMDM + Suero + Citoquinas
Medio basal	HP01	IMDM
Suero humano	--	5% (v/v)
Albúmina	0,4%	--
L-Glutamina	*N/D	2 mM
Transferrina	330 µg/mL	330 µg/mL
Insulina	N/D	10 µg/mL
Hidrocortisona	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁶ M
EPO	3 IU/mL	3 IU/mL
SCF	100 ng/mL	100 ng/mL
IL-3	5 ng/mL	5 ng/mL

*N/D: Concentración no determinada.

Figura 3–6 Composición y concentración de los suplementos en los medios de cultivo experimentales empleados para la expansión y diferenciación de CMH y CPE.

En la **Figura 3–7**, se observan los resultados obtenidos para un estudio expansión comparativo entre el medio comercial HP01[®] y el medio IMDM formulado *in house*. Bajo las condiciones de estudio, el factor de expansión total fue superior con el medio IMDM suplementado con suero adulto humano y citoquinas. La concentración celular lograda es entorno a 1,5 – 2,0 veces superior y el factor de expansión total duplica al obtenido con el medio comercial. En cuanto a la población de células CD34⁺ podemos observar un crecimiento superior en medio IMDM hasta el día 4 de cultivo y luego una caída en la concentración arribando a niveles mínimos entorno el día 7 de cultivo.

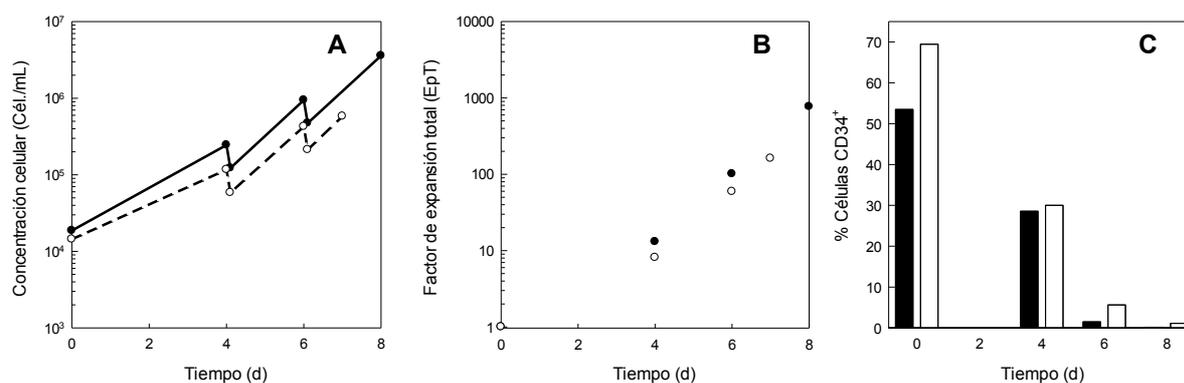


Figura 3–7 Sustitución de medio químicamente definido HP01 + citoquinas (○), por medio IMDM suplementado con suero humano + citoquinas (●). A Evolución de la concentración de células viables en el tiempo; B factor de expansión total; C porcentaje de células CD34⁺ respecto al total de células viables en los cultivos. Se grafica de forma representativa dos lotes de expansión. La duración de los cultivos es de 7 a 9 días. Al día 4 se realiza la primera actuación (dilución a ½ con medio de cultivo fresco), y posteriormente se actúa cada 2 días aplicando el mismo procedimiento. Los cultivos se mantienen a 37°C, 95% de humedad y en atmosfera enriquecida al 5% de CO₂.

A fin de evaluar la estrategia parcial desarrollada en los medios de cultivo estudiados, y debido a la variabilidad que presentan las CMH lote a lote en términos de potencial de expansión (Csaszar et al., 2013), se realizaron una serie de ensayos con el fin de lograr significación estadística en los resultados. En la **Figura 3-8** resume los factores de expansión totales logrados en los distintos lotes ensayados, confirmando las observaciones antes detalladas. Como se puede observar, al día 7 de cultivo (punto a

partir del cual la concentración de células $CD34^+$ es residual) el factor de expansión total medio logrado con el medio comercial HP01[®] es de $135 \pm 70,5$ ($n=6$), mientras que con el medio formulado *in house* IMDM suplementado con suero y citoquinas, el factor de expansión de células totales medio es de $353,3 \pm 118,8$ ($n=5$).

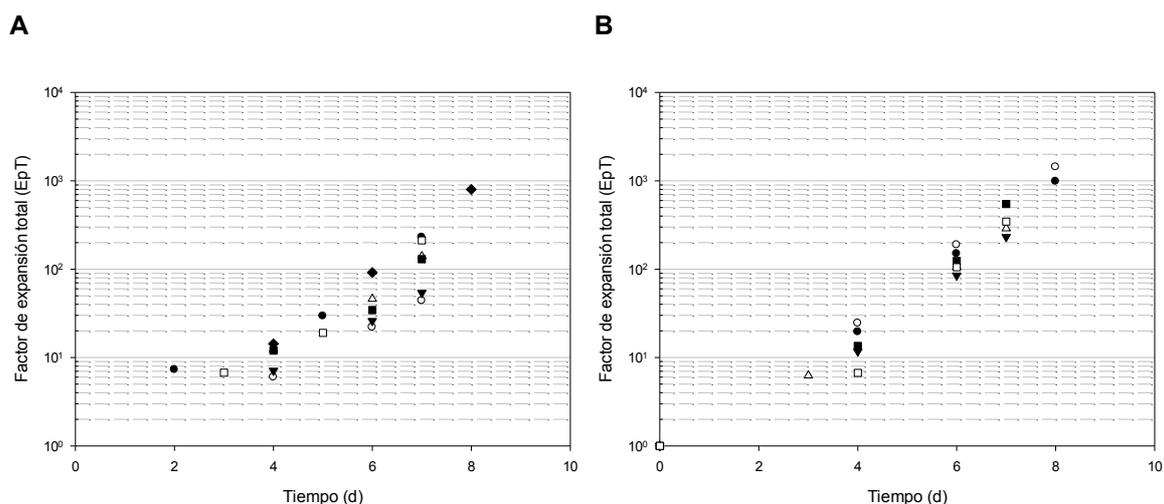


Figura 3–8 Resumen todas las expansiones realizadas. Se gráfica el factor de expansión total alcanzados en los distintos cultivos **A**: con medio de cultivo químicamente definido HP01 + citoquinas y **B**: con medio IMDM suplementado con suero humano + citoquinas respectivamente. La duración de los cultivos es de 7 a 9 días. Al día 4 se realiza la primera actuación (dilución a $\frac{1}{2}$ con medio de cultivo fresco), y posteriormente se actúa cada 2 días aplicando el mismo procedimiento. Los cultivos se mantienen a 37°C , 95% de humedad y en atmosfera enriquecida al 5% de CO_2 .

3.3.2. Caracterización fenotípica de CPE generadas en cultivos discontinuos alimentados.

Tal como se ha descrito anteriormente, las CMH $CD34^+$ son capaces de proliferar, comprometerse con el linaje eritroide y diferenciar gracias a la combinación de citoquinas y hormonas empleadas en los cultivos *in vitro*. En respuesta a estos factores y a interacciones celulares, las células activan progresivamente factores de transcripción específicos a fines de expresar genes implicados en el fenotipo eritroide. En consecuencia, hay una continua remodelación de la membrana celular de las células que

se diferencian. Así, mientras algunos componentes expresados disminuyen, otros se adquieren progresivamente. Estos cambios secuenciales en la expresión de proteínas y antígenos de superficie permite examinar el grado de diferenciación y maduración de los cultivos.

Con el objetivo de determinar la capacidad para generar CPE y eritroblastos como producto de la expansión de CMH CD34⁺ en cultivo, y a su vez caracterizar el proceso de maduración, se realiza una determinación fenotípica mediante citometría de flujo al día 7 de cultivo. Tal como se indica en la **Figura 3–9**, el fenotipo de las distintas etapas de diferenciación del linaje eritroide se analiza en base a los marcadores CD45, CD36, CD71 y CD235a, definidos como característicos de las células de linaje eritroide (Bony et al., 1999; Chen et al., 2007; di Giacomo et al., 2004; Lansdorp et al., 1990; Loken et al., 1987; Machherndl-Spandl et al., 2013; Migliaccio et al., 2012b; Nguyen et al., 2007; Tirelli et al., 2011).

Blasto	Proeritroblasto / Eritroblasto basófilo	Eritroblasto policromatófilo	Reticulocitos / Eritrocitos
CD45 ⁺ CD36 ^{-/low} (CD71 ^{low/+} CD235a ⁻)	CD45 ⁺ CD36 ⁺ (CD71 ⁺ CD235a ^{low/+})	CD45 ⁻ CD36 ⁺ (CD71 ⁺ CD235 ^{+/+})	CD45 ⁻ CD36 ⁻ (CD71 ^{+/-} CD235a ^{+/+++})

Figura 3–9 Perfil de marcadores característicos expresados en las sucesivas etapas de diferenciación eritroide.

Tal como se observa en la **Figura 3–10**, los resultados obtenidos muestran que, al día 7 de cultivo empleando la estrategia de cultivo discontinua alimentada establecida anteriormente, los cultivos están compuestos por una subpoblación de células progenitoras eritroides (CD45⁺ CD36^{-/low}) 24,5% ± 5,66% con capacidad proliferativa, una fracción mayoritaria de proeritroblastos que expresan niveles elevados de CD36

(CD45⁺ CD36⁺) 69,2% ± 6,14% y una fracción minoritaria (6,4% ± 3,86%) de eritroblastos más maduros.

Por tanto, se puede afirmar que las condiciones de cultivo en la fase de expansión y diferenciación de CMH CD34⁺ favorece el compromiso de las célula progenitoras con el linaje eritroide y permite la maduración temprana de células diferenciadas, obteniéndose como resultado a día 7 de cultivo una distribución homogénea de células progenitoras eritroides y células precursoras eritroides en distintos grados madurativos.

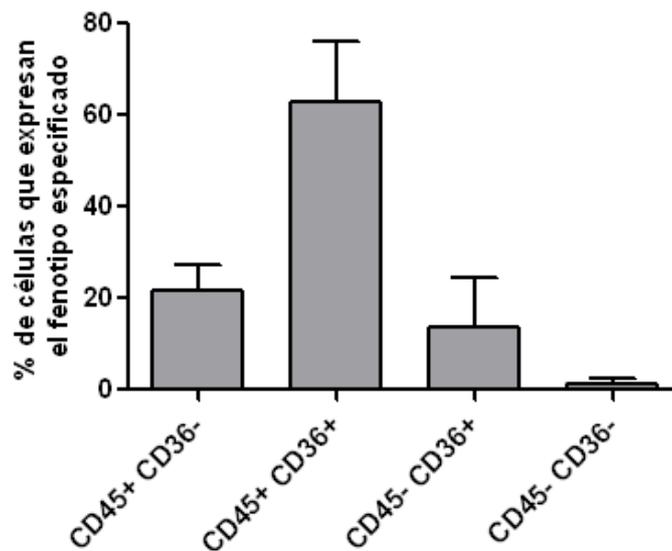


Figura 3–10 Representación de los porcentajes de células según marcadores CD45 y CD36 a día 7 de cultivo, empleando estrategia discontinua alimentada. Los valores se representan como media con su respectiva desviación estándar (n=5).

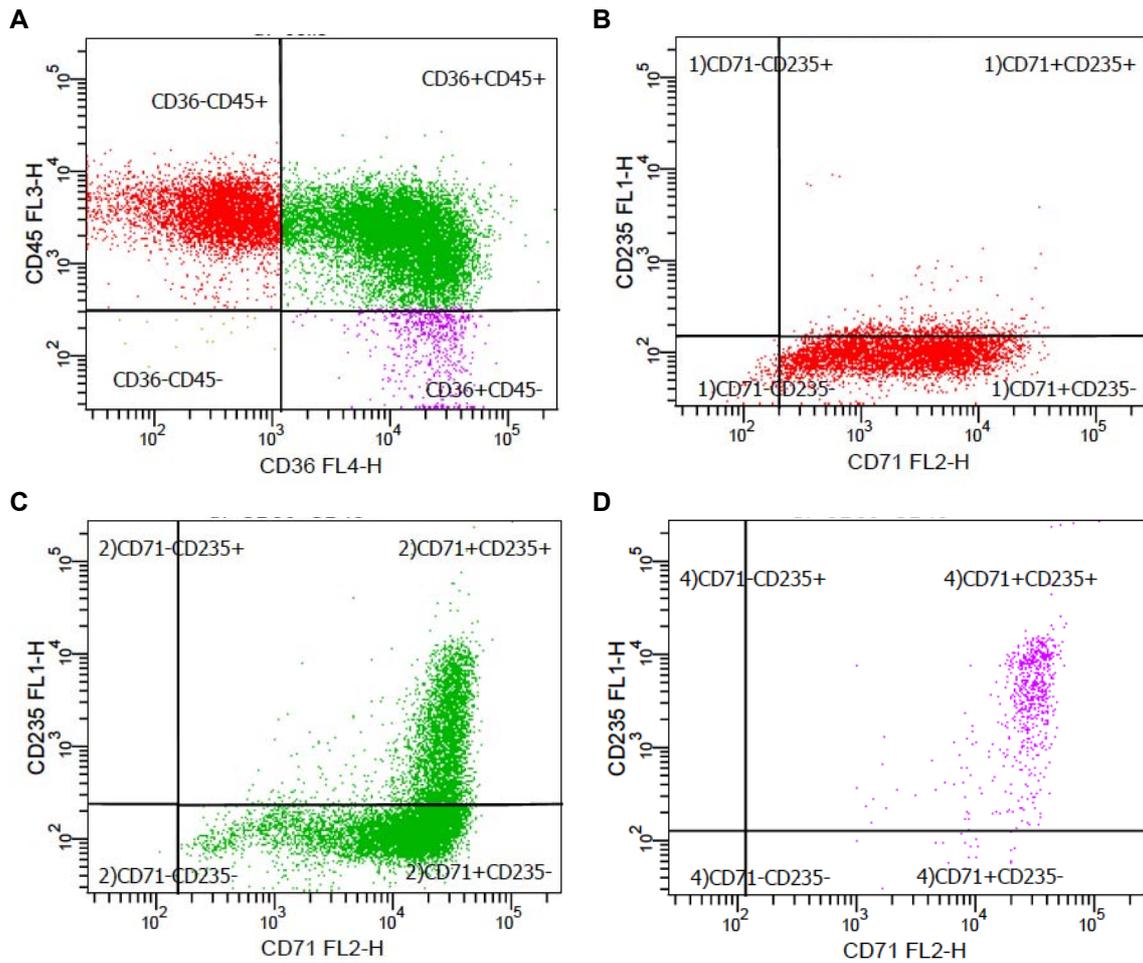


Figura 3–11 Ejemplo de citometrías realizadas con el fin de caracterizar los distintos estadios madurativos mediante el análisis de fenotipo. A: Determinación de la distribución y porcentaje de poblaciones eritroides según la expresión de los marcadores CD45 y CD36 (fenotipo “simple”). B, C y D: Las distintas regiones establecidas en A son analizadas según la expresión de los marcadores CD71 y CD235a. Los datos son adquiridos en un citómetro de flujo FACSCalibur y para el análisis de los resultados se emplea el software CellQuest Pro (BD).

3.4. DISCUSIÓN

El trabajo realizado en este capítulo se ha centrado en el desarrollo de una estrategia de expansión, compromiso y diferenciación parcial hacia linaje eritroide de CMH CD34⁺ de SCU.

Con este objetivo en claro, en primer lugar se han realizado una serie de cultivos iniciados a distintas concentraciones celulares empleando una estrategia de cultivo discontinua, a fin de evaluar la cinética de crecimiento de células totales y de la población CD34⁺. A bajas densidades de siembra, se observó una mayor capacidad de expansión de CMH CD34⁺ y CNT en cultivo. En contrapartida, a densidades más elevadas de siembra ($1 \cdot 10^5$ Cél. CD34⁺/mL) bajo las condiciones de estudio fijadas, se observó un bloqueo *cuasi* total de la capacidad replicativa de la población CD34⁺, y por consiguiente, una limitación de la capacidad expansión del cultivo. En base a estas observaciones, y a estudios publicados que hacen referencia a estos fenómenos (Kirouac et al., 2009; Majka et al., 2001), suponemos que la acumulación de factores inhibidores producidos por células adultas en cultivo limita la capacidad de expansión de la población CD34⁺. Así, a densidades de siembra bajas en donde las células se encuentra inicialmente expuesta a niveles moderados de estos factores inhibidores, se obtuvo un mayores capacidad de expansión de CMH CD34⁺ y CNT generadas a partir del compromiso y diferenciación del cultivo.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se ha diseñado una estrategia basada en la adición secuencial de medio de cultivo, con el objetivo de disminuir la tasa de acumulación de estos factores inhibidores, a través de la dilución periódica del cultivo. Mediante la implementación de una estrategia discontinua alimentada se ha logrado aumentar considerablemente la capacidad proliferativa en cultivo. De esta manera, se ha

logrado atenuar en parte, el efecto negativo generado por factores endógenos inhibidores producidos por células adultas acumuladas en los cultivos *in vitro*.

A continuación, se analizó la sustitución del medio comercial de referencia HP01[®], de elevado coste y composición no conocida, por el medio basal IMDM suplementado con suero humano y citoquinas. Los resultados de estos estudios comparativos confirmaron una mejora del factor de expansión empleando el medio IMDM (EpT $353,3 \pm 118,8$), respecto al medio comercial HP01[®] (EpT $135 \pm 70,5$). Este cambio, además de mejorar la estrategia de expansión, permite contar un medio basal de composición definida y económicamente viable para su desarrollo en las distintas etapas del proceso, permitiendo ajustar su composición según los requerimientos del cultivo.

El diseño de la estrategia concebida para esta primera etapa del proceso (ver **Figura 3-12**), tiene como objetivo fundamental la obtención de CPE y eritroblastos mediante la expansión y compromiso con el linaje eritroide de células CD34⁺ en cultivo. Este proceso se encuentra estrictamente controlado por la combinación de citoquinas empleadas: SCF, IL-3 y EPO. A fin de evaluar el compromiso y el grado de diferenciación de las células generadas en cultivo se efectuó un análisis fenotípico de las diferentes poblaciones. Los resultados del análisis efectivamente confirmaron el compromiso con el linaje eritroide, observándose a día 7 de cultivo una distribución compuesta por un $24,5\% \pm 5,66\%$ de células precursoras eritroides, un $69,2\% \pm 6,14\%$ de eritroblastos inmaduros (proeritroblastos y eritroblastos basófilos) y un $6,4\% \pm 3,86\%$ de eritroblastos más maduros (eritroblastos policromatófilos).

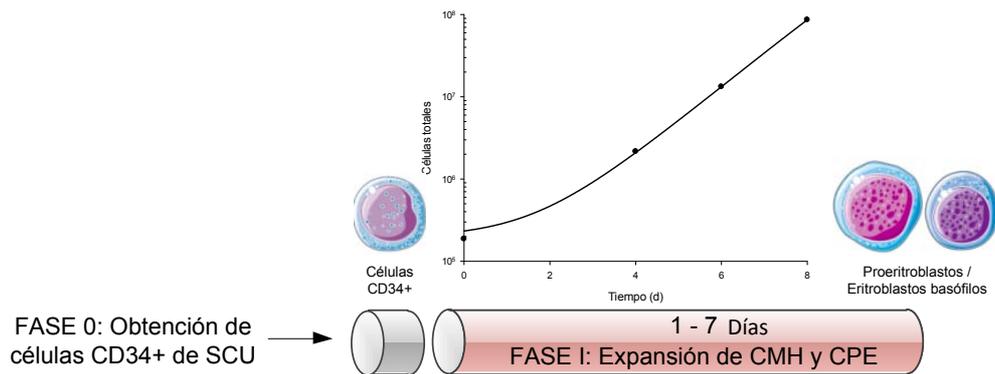


Figura 3–12 Esquema de la estrategia de cultivo definida para la expansión de progenitores eritroides empelando como fuente celular (sustrato) células CD34⁺ purificadas de SCU y obteniendo como producto principal eritroblastos. Esta estrategia se basa en la definición de un medio de cultivo suplementado con suero + citoquinas y una serie de actuaciones temporales de alimentación con medio fresco en sistemas de cultivo estáticos.

El conjunto de los resultados obtenidos muestran que la estrategia de expansión desarrollada permite una proliferación extensiva y reproducible de células progenitoras comprometidas con el linaje eritroide.

En los últimos años se han publicado un número considerable de métodos para la generación de eritrocitos a partir de diversas fuentes celulares (Migliaccio et al., 2012b). Cabe destacar, entre el gran número de protocolos publicados, al método desarrollado por el grupo del Prof. Douay (Giarratana et al., 2004), considerado por amplio consenso, como el método de referencia hasta la fecha. Comparando los resultados en términos de expansión de células totales obtenidos a partir de la estrategia desarrollada, estos son similares a los reportados por el grupo del Prof. Douay. Incluso, comparando estos resultados con el protocolo que reportó hasta la fecha el mayor índice de expansión empleando células CD34⁺ de SCU (Timmins et al., 2011), los resultados son superiores en términos de expansión a día 7 de cultivo. Estos resultados invitan a continuar trabajando, y abordar en una segunda instancia, el estudio de condiciones que

favorezcan la diferenciación y maduración terminal de las células generadas en cultivo. Por consiguiente, habiendo definido en esta primera etapa del proceso una estrategia optimizada y robusta de expansión y diferenciación de CPE, en el siguiente capítulo se abordará el estudio y optimización de condiciones para la diferenciación en cultivo de las CPE y eritroblastos, a el fin de establecer una estrategia integrada definida para la generación *in vitro* de eritrocitos.

CAPÍTULO 4

Desarrollo de una estrategia integrada para
la generación de eritrocitos *ex vivo*

4. DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA INTEGRADA PARA LA GENERACIÓN DE ERITROCITOS *EX VIVO*

4.1. INTRODUCCIÓN

Como resultado del trabajo realizado en el capítulo anterior, se ha definido una estrategia de cultivo optimizada para la expansión y diferenciación parcial de CMH/CPH inducidas hacia el linaje eritroide. Definida esta primera fase del proceso el siguiente reto a abordar, objeto del presente capítulo, será la definición de condiciones óptimas, reproducibles y escalables de cultivo para la expansión y diferenciación terminal de células progenitoras y precursoras eritroides, a fin de establecer una estrategia integrada para la obtención de eritrocitos *ex vivo* a partir de células CD34⁺ de SCU.

La estrategia desarrollada en el capítulo anterior, estrictamente controlada por la combinación de citoquinas empleadas (SCF, IL-3 y EPO) y glucocorticoides, permite la expansión y compromiso con el linaje eritroide, tal como se evidencia en los estudios realizados del perfil fenotípico. Como producto del proceso de expansión, a día 7 de cultivo, se obtienen dos fracciones mayoritarias compuestas por un 25% de CPE con capacidad proliferativa y un 70% de células precursoras en distintos estados madurativos. Es precisamente sobre estas poblaciones celulares heterogéneas, y tal como se resume en la **Figura 4-1**, donde centraremos el trabajo del presente capítulo: Determinación de condiciones óptimas de cultivo, que permitan la expansión y diferenciación terminal *in vitro*, caracterización funcional de las distintas poblaciones celulares generadas y estudio de los principales atributos de calidad del producto celular resultante.

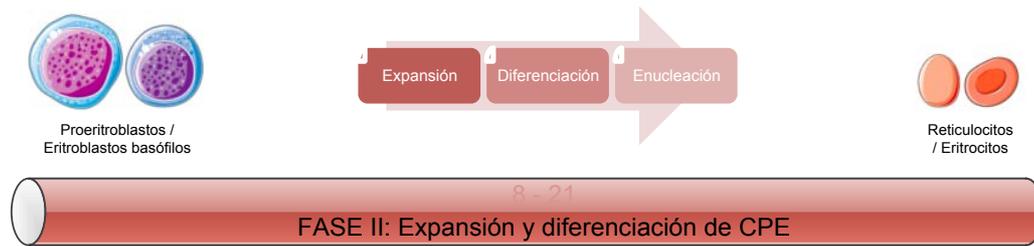


Figura 4–1 Esquema de la estrategia a desarrollar para la expansión y diferenciación terminal de CPE y eritroblastos inmaduros, producto celular obtenido como resultado de la expansión masiva de CMH/CPH. En el proceso de diferenciación terminal, las células progresan a través de una serie de estados definidos morfológicamente: Proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos y eritroblastos ortocromáticos. A lo largo del proceso se observa acumulación de la hemoglobina sintetizada, condensación de la cromatina, reducción del tamaño celular y en la fase final de maduración, los eritroblastos ortocromáticos expelen sus núcleos conformando el reticulocito.

En la etapa de diferenciación terminal, si bien la maduración citoplasmática es continua, fruto de las sucesivas divisiones mitóticas, las células progresan a través de una serie de estados definidos en base a cambios en la morfología celular. Las CPE, maduran en proeritroblas, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos y eritroblastos ortocromáticos. Estos cambios producen una reducción, paso a paso, en el volumen citoplasmático y nuclear de las células, así como un aumento progresivo en contenido de hemoglobina sintetizada, la cual también cumple un rol en los cambios citoplasmáticos. Fruto de estos procesos, la capacidad de expansión de los eritroblastos se ve reducida conforme avanza el programa de diferenciación terminal y en su etapa final se da la salida irreversible del ciclo celular (Hattangadi et al., 2011; Tsiftoglou et al., 2009). La diferenciación terminal de los eritroblastos ortocromáticos en eritrocitos funcionales requiere de un proceso complejo de remodelación el cual finaliza con la extrusión del núcleo y la conformación estructural del eritrocito. Luego de salir del ciclo celular, los núcleos de los eritroblastos ortocromáticos son polarizados a un lado de la

célula, y eventualmente, estas células enuclean conformando así el reticulocito (Chasis and Mohandas, 2008; McGrath et al., 2008).

El proceso final de maduración se encuentra intrínsecamente controlada por factores epigenéticos y expresiones genéticas programadas de los propios eritroblastos (Lodish et al., 2010; Tsiftoglou et al., 2009). La eritropoyetina (EPO) es el factor de mayor relevancia en la eritropoyesis, ejerciendo su acción mediante unión con su receptor específico (EPO-R) expresado tanto en células progenitoras como eritroblastos. En las CPE, dicha interacción activa la proliferación y previene la apoptosis celular, mientras que en las células más maduras promueve la diferenciación (Chasis and Mohandas, 2008; Hattangadi et al., 2011). No obstante, otros factores también desempeñan un papel clave en la regulación de la expansión y diferenciación celular. En este sentido, se ha demostrado recientemente que SCF cumple un rol en la expansión masiva *in vitro* de eritroblastos mediante activación de la vía Notch (Zeuner et al., 2010). Es específicamente esencial para el desarrollo de células eritroide, promoviendo la expansión de eritroblastos, retardando procesos de diferenciación y protegiendo a CPE de procesos apoptóticos (Panzenböck et al., 1998). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales SCF modula estas acciones continúan siendo desconocidos. Es por tanto, la concentración de estos factores y otros en cultivo, así como el tiempo y momento de su utilización durante el proceso, objetivo de estudio a fin de establecer un balance óptimo, entre expansión y diferenciación terminal, que permita el mayor número de células enucleadas por CMH/CPH iniciales. Por consiguiente, el primer punto a abordar en el presente capítulo será el estudio y definición de un medio de cultivo para la expansión y diferenciación terminal de células eritroides.

En la etapa final de diferenciación tiene lugar la enucleación del eritroblastos ortocromático y la subsecuente formación del reticulocito, seguido de una extensiva

remodelación de su membrana celular, pérdida de volumen y superficie, y eliminación de una serie de organelos y restos de material génico para conformar finalmente el eritrocito funcional. Esta etapa es sin dudas un punto crítico del proceso, siendo la etapa limitante en los protocolos de producción *ex vivo* publicados hasta la fecha (Migliaccio et al., 2012b; Timmins and Nielsen, 2009), con independencia de la fuente celular empleada.

In vivo, como se ha mencionado anteriormente, dicho proceso se lleva a cabo en un microambiente especializado, las islas eritroblásticas (Chasis and Mohandas, 2008). En este microambiente, la eritropoyesis es regulada mediante interacciones célula-célula, estímulos extrínsecos y componentes de la matriz extracelular. A fin de emular dichas interacciones y condiciones fisiológicas, algunos grupos de investigación han implementado en sus protocolos co-cultivos con células estromales, y otras de diversas fuentes, a fin de incrementar la tasa de enucleación en la etapa terminal de diferenciación (Fujimi et al., 2008; Giarratana et al., 2004; Vlaski et al., 2009; Xi et al., 2013). No obstante, el escalado de dichos procesos es limitado y suponen un serio compromiso para la producción bajo buenas prácticas de manufactura (cGMP). Estas cuestiones, así como serias consideraciones regulatorias, plantean la necesidad de definir procesos libres de componentes de origen animal, que permitan altas tasas de enucleación evitando el uso de estos métodos. En este sentido, en los últimos años se han reportado protocolos que sustituyen los métodos de co-cultivo por agentes bioquímicos y/o químicos con buenos resultados (Baek et al., 2009; Maggakis-Kelemen et al., 2003; Miharada et al., 2006; Timmins et al., 2011). El trabajo realizado por Miharada y colaboradores, demostró que mediante la utilización de suero humano y/o derivados plasmáticos en los medios de cultivo, los eritroblastos producidos *ex vivo* alcanzaban su diferenciación terminal y enucleaban de forma autónoma demostrando

así que la interacción de los eritroblastos con otras células no es necesaria y que las señales mediadas por factores humorales parecen ser suficientes para inducir la enucleación. En base a lo discutido, y con el objetivo de caracterizar la influencia de los distintos factores que intervienen en el proceso de enucleación celular, en el presente capítulo se estudiará el rol de estos factores en la etapa final de diferenciación a fin de definir condiciones óptimas de cultivo que favorezcan dicho proceso.

Otro aspecto relativo al desarrollo del proceso es el estudio y definición de parámetros de cultivo. Los cultivos celulares en laboratorio, generalmente se realizan a una concentración de oxígeno atmosférico (20-21%), condición la cual acuñó el término “normoxia”. No obstante, *in vivo* las células se encuentran bajo condiciones fisiológicas en donde la concentración de oxígeno es significativamente inferior (2-8%). Estas concentraciones bajas de oxígeno tradicionalmente llamadas “hipoxia” han sido objeto de estudio en cultivos *ex vivo*, no obstante los resultados presentados son contradictorios (Ivanovic et al., 2006; Rogers et al., 2008; Vlaski et al., 2009). Siendo sin dudas un parámetro crítico de cultivo y considerado un factor que influye de forma directa en el proceso eritropoyético, abordaremos en el presente capítulo el estudio del efecto directo de la pO_2 en la etapa de diferenciación terminal.

Finalmente, a fin de caracterizar las células generadas en cultivo, en el presente capítulo se realizarán una serie de ensayos funcionales *in vitro*. Estos ensayos comprenden la caracterización fenotípica de las distintas poblaciones generadas en cultivo y análisis morfológicos, determinación del grado de enucleación celular, caracterización y evaluación funcional de hemoglobina del producto celular generado.

En resumen, el objetivo principal del presente capítulo consiste en definir una estrategia integrada para la generación de eritrocitos a partir de CMH/CPH de SCU. En primer lugar se definirá un medio de cultivo que permita la expansión y diferenciación terminal

del producto celular obtenido como resultado de la estrategia desarrollada en el capítulo anterior. Luego, se caracterizarán funcionalmente las distintas poblaciones celulares generadas en cultivo y se validará la estrategia integrada de cultivo. En la etapa final de diferenciación, estudiaremos el efecto de parámetros y componentes críticos de cultivo a fin de optimizar el proceso de enucleación celular. Finalmente, se analizarán las células generadas en cultivo mediante una serie de ensayos funcionales a fin de caracterizar propiedades del producto resultante.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Estudio de condiciones para la expansión y diferenciación terminal de CPE

4.2.1.1 Estudio de expansión celular en medios de cultivo experimentales

El trabajo realizado en el capítulo anterior nos ha permitido definir un medio de cultivo que permite la expansión masiva de CMH/CPH comprometidas con el linaje eritroide. Dicho proceso se encuentra estrictamente controlado por estímulos epigénéticos. En concreto, la combinación empleada de citoquinas y glucocorticoides (SCF, IL-3, EPO e HC) de forma extrínseca y sinérgica son capaces de estimular la proliferación y compromiso de CMH/CPH con el linaje eritroide, obteniéndose como resultado una población celular compuesta mayoritariamente por CPE y eritroblastos en distintos estadios madurativos. En la fase final de diferenciación, el programa de eritropoyesis es definido por aquellos genes que aun se encuentran expresados. Su nivel de expresión depende de modificaciones epigenéticas específicas, reclutamiento de factores de transcripción y efectos postraduccionales. Como se ha mencionado anteriormente, numerosos estudios han demostrado la influencia de varias citoquinas y factores de

crecimiento en dicho proceso (Beutler et al., 2005; Chasis and Mohandas, 2008; Hattangadi et al., 2011; Singh, 2014; Tsiftoglou et al., 2009). Particularmente la EPO y otros factores exógenos cumplen funciones relevantes. A fin de estudiar el efecto de dichos factores en cultivos *in vitro* y establecer aquella combinación óptima que permita la expansión y diferenciación terminal de células eritroides, se realiza un estudio comparativo de medios de cultivo experimentales suplementados con distintas combinaciones de citoquinas, según se detalla en la **Tabla 4-1**.

El estudio se realiza a partir del producto celular generado en base a la estrategia desarrollada y definida en el capítulo anterior (fase I). En resumen, se inician una serie de cultivos a partir de células CD34⁺ purificadas de SCU, a una concentración inicial de $1 \cdot 10^4$ Cél CD34⁺/mL, en medio de cultivo IMDM suplementado con hSerB y citoquinas (7.2.1). Empleando la estrategia discontinua alimentada, se expanden durante 8 días, y la fracción celular resultante es expuesta a las distintas condiciones del estudio. Para tal fin, las células son centrifugadas (340 g, 10 min.) con el objetivo de eliminar el medio de cultivo condicionado y luego son resuspendidas, en los distintos medios formulados, a una concentración de $1 \cdot 10^6$ Cél/mL. Los cultivos se mantienen a 37°C, en atmosfera enriquecida al 5% de CO₂, empleando sistemas de cultivos estáticos (*T-flask*) y en un volumen de cultivo entorno a 10 mL.

Componentes	Medios de cultivo experimentales				
	A) Citquinas	B) Suero	C) EPO	D) SCF	E) SCF/EPO
Medio basal	IMDM	IMDM	IMDM	IMDM	IMDM
Suero humano	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)	5% (v/v)
L-Glutamina	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Transferrina	330 µg/mL	330 µg/mL	330 µg/mL	330 µg/mL	330 µg/mL
Insulina	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL
Hidrocloruro de cortisona	10 ⁻⁶ M	--	--	--	--
EPO	3 IU/mL	--	3 IU/mL	--	3 IU/mL
SCF	100 ng/mL	--	--	100 ng/mL	100 ng/mL
IL-3	5 ng/mL	--	--	--	--

Tabla 4-1 Detalle de los componentes y concentraciones empleadas en los distintos medios experimentales estudiados.

A partir de dicho momento, a fin de evitar posibles limitaciones fisiológicas, acumulación de factores inhibidores o depleción del algún factor extrínseco, la estrategia desarrollada consistió en mantener un régimen de diluciones periódicas, ajustando la concentración celular entre $0,5 - 1 \cdot 10^6$ Cél./mL, o en caso de no observarse crecimiento neto, dilución 1:1 cada 2-3 días. Periódicamente se realiza el seguimiento de la densidad celular y viabilidad de los distintos cultivos mediante citometría de flujo. A partir de los valores obtenidos, se calculan los factores de expansión y el número de duplicaciones.

Tal como se puede observar en la **Figura 4-2**, los resultados obtenidos muestran que en dos de las condiciones estudiadas no se observa expansión celular significativa. Las células cultivadas en medio IMDM suplementado sólo con hSerB (medio B) y las células cultivadas en medio IMDM suplementado con hSerB - SCF (medio D) no proliferan en los días posteriores al recambio del medio. Esto demuestra, tal como se comentó anteriormente, en primer lugar que dicho proceso es regulado de forma positiva por citoquinas y factores de crecimiento. En ausencia de estos, las células no son capaces de proliferar y diferenciar correctamente. En segundo lugar, la influencia de la eritropoyetina (EPO) es vital para desplegar el proceso de eritropoyesis. El factor de

crecimiento SCF por sí solo no es capaz de modular la expansión y diferenciación de células eritroides. Esto sugiere que dicho factor ejerce su acción de forma sinérgica en combinación con otras citoquinas. Al día 14 de cultivo se decide discontinuar los cultivos bajo estas condiciones.

En cuanto a los cultivos en los medio de cultivo A (IMDM + hSerB, IL-3, SCF y EPO), medio C (IMDM + hSerB y EPO) y medio E (IMDM + hSerB, SCF y EPO) se observó un crecimiento exponencial sostenido hasta el día 14 de cultivo aproximadamente. No obstante, tal como se puede observar en las gráficas (**Figura 4-3**), los cultivos en medio A y medio E muestran un mayor crecimiento respecto al cultivo en medio C.

El medio de cultivo A (suplementado con todas las citoquinas y glucocorticoide) alcanza un factor de expansión de $4,54 \cdot 10^4$ veces, lo que equivale a unas 15 duplicaciones. De forma similar, el medio de cultivo E (suplementado con SCF y EPO) logra un factor de expansión de $3,54 \cdot 10^4$ veces y 15 duplicaciones. Esto confirma, tal como se comentó anteriormente, el efecto sinérgico del factor de crecimiento SCF combinado con EPO, actuando de forma cooperativa en la expansión de CPE y eritroblastos.

Por otro lado, si bien se ha demostrado que la combinación de IL-3 junto a SCF y EPO sustenta la expansión y compromiso de CMH y CPH con el linaje eritroide, pareciera ser que su acción en estados avanzados de maduración es irrelevante en términos de expansión. De hecho, IL-3 es considerada como citoquina de acción temprana (Metcalf, 2008) y por tanto no esencial en fases avanzadas del proceso.

En cuanto al cultivo en medio formulado con EPO como único factor de crecimiento, el factor de expansión calculado ($6,66 \cdot 10^3$) resultó ser menor en comparación con los medios A y B ($4,54 \cdot 10^4$ y $3,54 \cdot 10^4$ respectivamente).

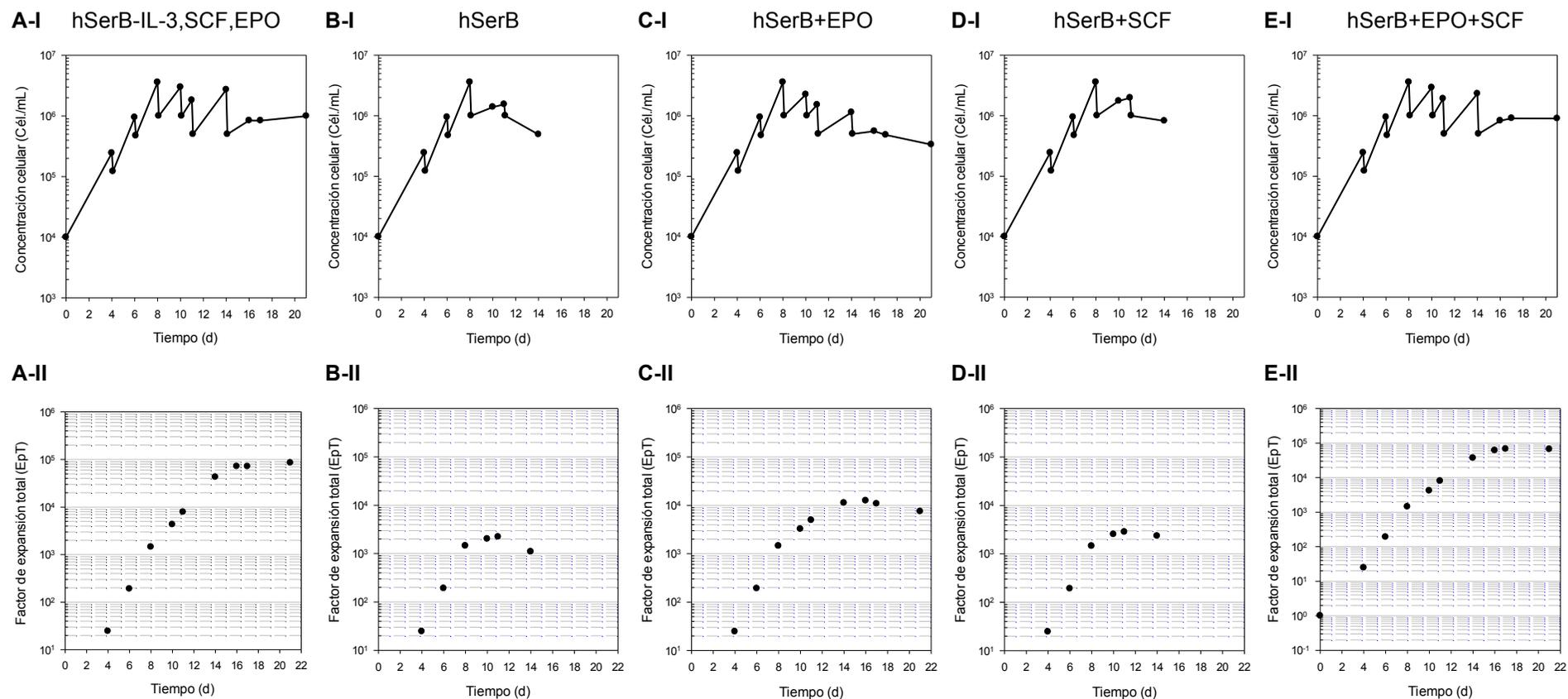


Figura 4–2 Evolución en el tiempo de la concentración celular (**A, B, C, D, E, - I**) y factor de expansión total (**A, B, C, D, E, -II**) de los distintos medios experimentales estudiados. Cultivo **A**: Citoquinas, **B**: Suero, **C**: EPO, **D**: SCF y **E**: EPO+SCF. La composición de los distintos medios se resume en la **Tabla 4-3**. El tiempo de cultivo es de entre 14 y 21 días. Durante la Fase I se realizó dilución $\frac{1}{2}$ con medio fresco (medio “citoquinas”) al día 4 y 6. Al día 8 de cultivo se inician los cultivos en los distintos medios a una concentración inicial de $1 \cdot 10^6$ Cél./mL por cultivo, y cada 2 días se diluyen los cultivos a una concentración de $1 \cdot 10^6$ Cél./mL, o 1:1 en caso de no observarse crecimiento neto

Estos resultados indican que, en términos de expansión celular, si bien la EPO es capaz de estimular por sí sola el programa de eritropoyesis, la acción cooperativa con SCF promueve una mayor proliferación celular.

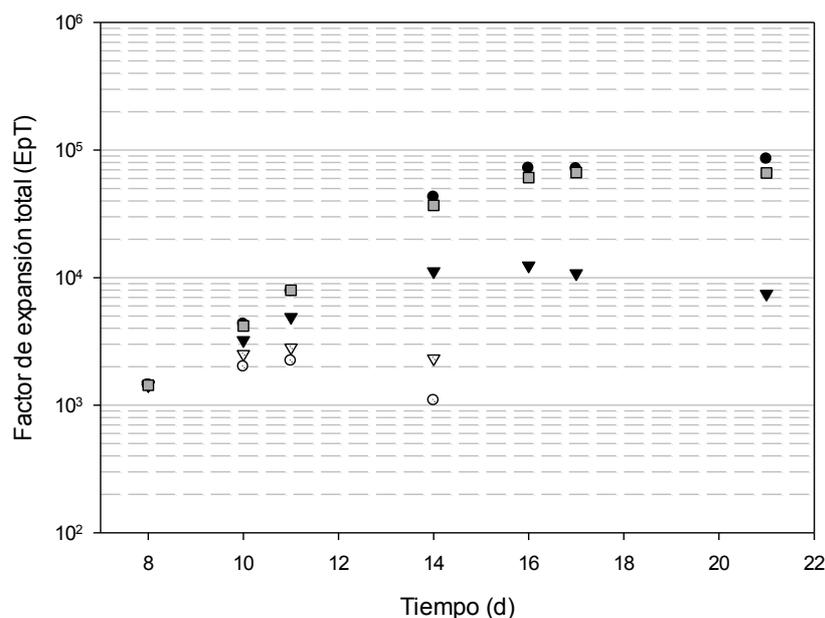


Figura 4-3 Gráfica comparativa de los factores de expansión alcanzados en los distintos medios de cultivo estudiados para la fase II. (●) Medio A (IMDM+hSerB+IL-3, SCF y EPO); (○) Medio B (IMDM+hSerB); (▼) Medio C (IMDM+hSerB+EPO); (▽) Medio D (IMDM+hSerB+SCF) y (■) Medio E (IMDM+hSerB+SCF y EPO). Los cultivos se mantienen a 37°C, 95% de humedad y en atmósfera enriquecida al 5% de CO₂.

4.2.1.2 Análisis del perfil de maduración celular y porcentaje de células enucleadas

A fin de caracterizar el proceso de diferenciación de las células en cultivo bajo las condiciones de estudio ensayadas anteriormente, se lleva a cabo una caracterización citométrica con el objetivo de determinar la evolución del perfil fenotípico. Este estudio fenotípico se realiza en base a la detección de las proteínas de membrana características del proceso de diferenciación eritroide: CD45, CD36, CD71 y CD235a, tal como se ha descrito en el capítulo anterior (**Figura 3-9**).

Dicha caracterización se realiza a los 14 y 21 días de cultivo. Tal como se puede observar en la **Figura 4-4**, los resultados obtenidos muestran que al día 14 de cultivo el perfil de maduración de las células en el medio A (citoquinas) y el medio E (SCF y EPO) se mantienen en un estado más inmaduro. La fracción mayoritaria en estos cultivos (65,8% y 70,5% respectivamente) presentan el perfil fenotípico característico del estadio madurativo intermedio: $CD45^-/CD36^+/CD235a^{low/+}$, correspondiente a eritroblastos policromáticos/ortocromáticos. Por el contrario, el medio C (suplementado con EPO) muestra un perfil de maduración más avanzado. Un 52,2% de las células en cultivo bajo estas condiciones expresan un perfil fenotípico característico correspondiente a eritroblastos ortocromáticos/reticulocitos ($CD45^-/CD36^{low/-}/CD235a^+$). Como se mencionó anteriormente, conforme avanza el programa de diferenciación, la capacidad de expansión de los eritroblastos en cultivo se va restringiendo. Podemos suponer por tanto, que el incremento en los factores de expansión observados en los cultivos en medio A y el medio E es probablemente debido al hecho de que en estos cultivos, la combinación de factores exógenos empleada es capaz de retener el cultivo en estados más inmaduros ($>65\%$ $CD45^-/CD36^+/CD235a^{low/+}$) favoreciendo así la expansión en detrimento de la maduración.

Analizando los resultados al día 21 de los cultivos en los medios experimentales A, C y E, podemos comprobar una diferencia notable en el avance de la maduración respecto al perfil obtenido al día 14 para las tres condiciones. La fracción mayoritaria en estos cultivos expresa un perfil fenotípico avanzados, correspondiente con eritroblastos ortocromáticos/reticulocitos ($CD45^-/CD36^{low/-}/CD235a^+$). Si bien, los resultados obtenidos muestran que el porcentaje de células con el fenotipo especificado es ligeramente superior en el medio de cultivo suplementado con EPO (93,9 %) respecto a

los cultivos en medio medio A y medio de cultivo E, en donde los porcentajes son 79,4 % y 84,9 % respectivamente.

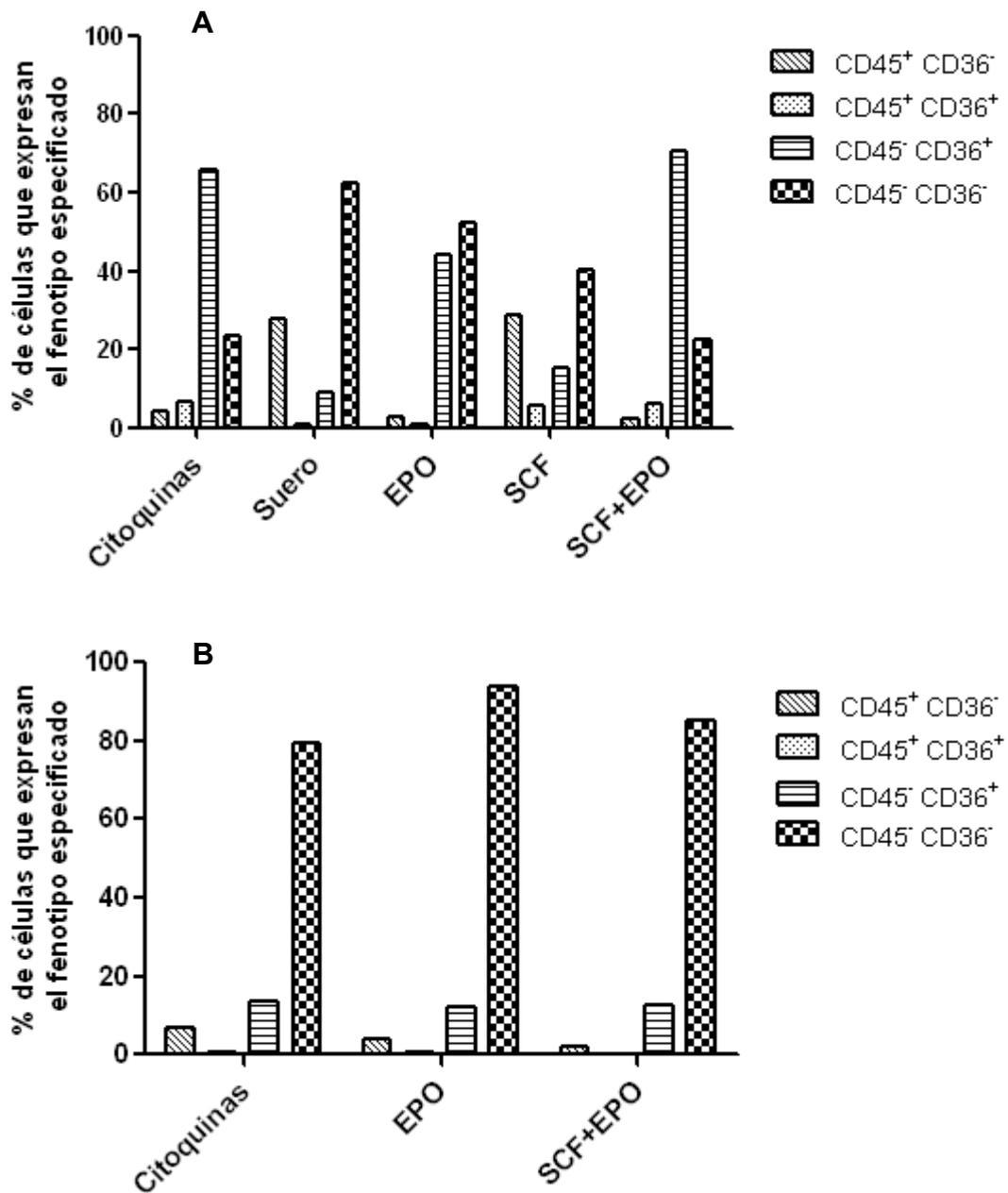


Figura 4-4 Representación de los porcentajes de células en los distintos estados madurativos según el perfil de expresión de los marcadores CD45 y CD36 en los distintos medios de cultivos estudiados. **A:** Perfil a día 14 de cultivo y **B:** Perfil a día 21 de cultivo.

Por tanto, se puede afirmar que en base a estos resultados, la acción del factor de crecimiento SCF en combinación EPO favorece la expansión del cultivo, y esto no condiciona la maduración terminal.

Una vez determinado el perfil fenotípico de las células en cultivo, resta analizar el porcentaje de células enucleadas generadas bajo las distintas condiciones estudiadas. La determinación se realiza por citometría de flujo mediante tinción del DNA de las células con el reactivo Retic-COUNT™ (BD Biosciences) (7.3.5). La **Figura 4-5** resume los valores porcentuales de células enucleadas detectadas en los distintos medios estudiados a 14 días y 21 días de cultivo.

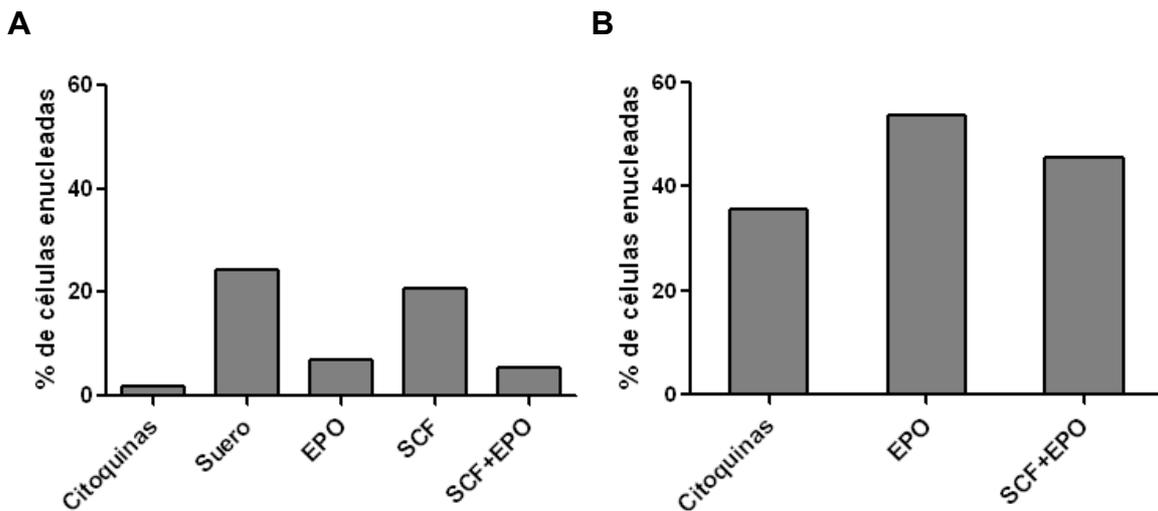


Figura 4-5 Representación del porcentaje de células enucleadas en los distintos medios cultivo estudiados. **A)** Células enucleadas a día 14 de cultivo; **B)** células enucleadas a día 21 de cultivo.

Tal como se puede observar, los resultados obtenidos muestran al día 14 de cultivo un mayor porcentaje de células enucleadas en aquellos cultivos con limitada capacidad de expansión (medios B y D). Este porcentaje, probablemente sea producto de la diferenciación terminal de los progenitores maduros en cultivo. Por otro lado, en aquellos cultivos donde se ha logrado estimular la proliferación celular, reteniendo las

células en estados más inmaduros mediante combinación de citoquinas empleadas, tal como se pudo comprobar en el perfil fenotipo estudiado, se puede observar al día 21 de cultivo un mayor porcentaje de células enucleadas. En este punto, las células cultivadas con el medio C (IMDM suplementado con hSerB y EPO) logran el mayor porcentaje de enucleación, siendo de un 53,6% sobre el total. Las células en el medio E (IMDM suplementado con suero, SCF y EPO) alcanzan el 45,6% y por último las células en medio A (IMDM suplementado con suero, IL-3, SCF y EPO) alcanzan un 35,6% de enucleación. Si bien, el medio de cultivo C (suplementado con EPO) favorece una mayor maduración terminal y genera por consiguiente el mayor porcentaje de células enucleadas, el medio de cultivo E (suplementado con SCF y EPO), debido a la sinergia que esta combinación produce, promueve una mayor expansión del cultivo y no condiciona la maduración terminal, obteniéndose por tanto, un mayor rendimiento.

Medios Exp.	Tiempo de cultivo 14 días			Tiempo de cultivo 21 días		
	EpT	Nº Duplicaciones	% Enucleación	EpT	Nº Duplicaciones	% Enucleación
A) Citoquinas	2,28E+04	14	1,7	4,54E+04	15	35,6
B) hSerB	5,81E+02	10	24,4	--	--	--
C) EPO	5,99E+03	13	6,8	6,66E+03	13	53,6
D) SCF	1,24E+03	10	20,6	--	--	--
E) SCF/EPO	1,97E+04	14	5,4	3,54E+04	15	45,6

Tabla 4-2 Resumen de los principales parámetros de cultivo determinados en los distintos medios experimentales estudiados a 14 días y 21 días de cultivo. Factor de expansión total (EpT) de los cultivos; número de duplicaciones y porcentaje de células enucleadas (ReticCount neg.).

En resumen, en la **Tabla 4-2** podemos observar los principales parámetros de cultivo determinados para los distintos medios experimentales estudiados. Teniendo en cuenta los resultados en su conjunto, como se ha mencionado anteriormente, la combinación de citoquinas SCF y EPO proporciona en esta fase del proceso, un balance óptimo entre expansión y diferenciación terminal, quedando por tanto definido el medio de cultivo a

emplear en la fase de expansión y diferenciación terminal de CPE y eritroblastos (fase II).

4.2.2. Caracterización *in vitro* del potencial de expansión y diferenciación de las CPE

Tal como se ha observado anteriormente, la combinación de citoquinas empleadas en la etapa de expansión y diferenciación terminal de células progenitoras eritroides condiciona el grado de expansión y maduración de los cultivos *in vitro*. Como hemos podido comprobar en dicha etapa del proceso, la EPO es un factor esencial y necesario para sostener la eritropoyesis. Su acción promueve la expansión y diferenciación terminal de eritroblastos. Hemos podido comprobar también, que el factor de expansión logrado en cultivos *in vitro* depende en gran medida del estado madurativo de los progenitores eritroides. En este sentido, el efecto combinado de los factores SCF y EPO en el medio de cultivo propició una mayor expansión celular retardando la diferenciación de células progenitoras, tal como se ha podido comprobar en los estudios realizados del perfil fenotípico. La heterogeneidad celular generada como producto del proceso eritropoyetico, y el carácter altamente transitorio de estas células confieren un perfil asíncrono a los cultivos *in vitro*. Esto dificulta el estudio y caracterización de las distintas poblaciones celulares generadas en las sucesivas etapas del proceso, condición necesaria a fin de establecer sistemas de cultivo robustos, consistentes y fiables para la producción a escala de eritrocitos. Por tanto, y con el objetivo de evaluar la capacidad de expansión y diferenciación de las células progenitoras eritroides, según su estado madurativo, se decide realizar un estudio definiendo las distintas poblaciones según el perfil de expresión de los marcadores CD45 y CD36 seguido de una separación celular por citometría de flujo, y a partir de las fracciones celulares obtenidas, iniciar una serie

de cultivos *in vitro* a fin de evaluar la capacidad de expansión y maduración terminal de las fracciones seleccionadas.

La **Figura 4–6** resume el procedimiento experimental seguido. Al igual que en los estudios realizados anteriormente para la definición del medio de cultivo en la fase de expansión y diferenciación terminal, la fracción de células progenitoras eritroides se obtiene mediante cultivo de expansión y diferenciación descritos en el capítulo III (Fase I de la estrategia). En resumen, el cultivo se inicia a partir de células CD34⁺ purificadas de SCU a una concentración inicial de $1 \cdot 10^4$ Cél. CD34⁺/mL, en medio de cultivo IMDM suplementado con hSerB, citoquinas (IL-3, SCF y EPO) y glucocorticoides (HC) (7.2.1). El producto celular, CPE y eritroblastos, se obtienen transcurridos 7 días de cultivo. Dichas células son clasificadas en función de la expresión del perfil fenotípico empleando los marcadores CD34, CD45 y CD36. En base a estos marcadores se definen 3 subpoblaciones de interés: CD34⁻/CD45⁺/CD36⁻ (Blastos), CD34⁻/CD45⁺/CD36⁺ (Proeritroblastos/eritroblastos basófilos) y CD34⁻/CD45⁻/CD36⁺ (eritroblastos policromatófilos/ortocromáticos). En base al criterio establecido, las células son separadas mediante citometría de flujo, empleando un separador celular BD FACSAria II (BD Biosciences).

El proceso de separación celular se lleva a cabo en Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (Badalona, Catalunya), en la Unidad de Citometría. El perfil fenotípico del conjunto total de células al momento de la separación esta compuesto por un 32,9% de células CD45⁺/CD36⁻ (CD34⁻), 50,2% CD45⁺/CD36⁺ (CD34⁻) y 15,1% CD45⁻/CD36⁺ (CD34⁻). Una vez seleccionadas, las fracciones son recolectadas en medio IMDM suplementado al 5% con hSerB y antibióticos para luego ser nuevamente analizadas por citometría de flujo a fin de comprobar el perfil fenotipo y determinar el grado de pureza logrado en la separación (**Figura 4–7**).

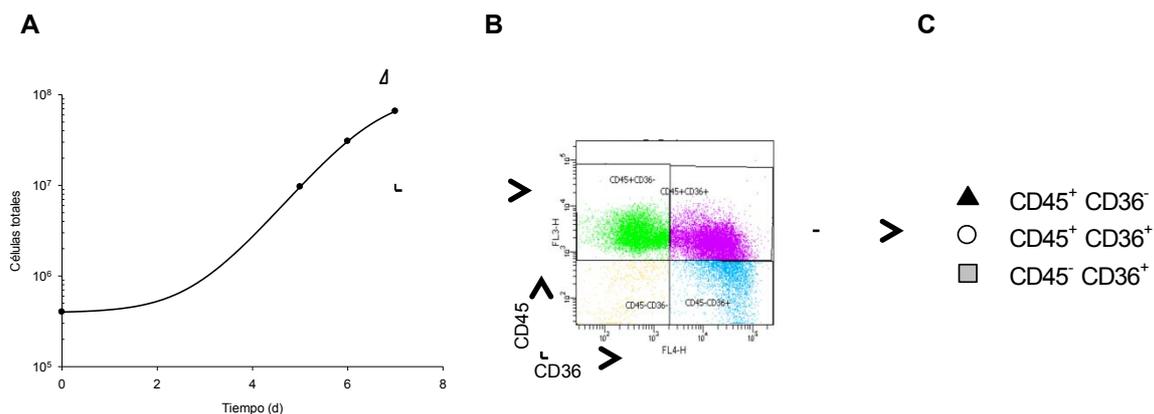


Figura 4-6 Esquema experimental planteado para la caracterización funcional *in vitro* de las distintas poblaciones progenitoras eritroides en cultivo. Para dicho fin se realiza un cultivo de expansión a partir de células $CD34^+$ de SCU (**A**); a día 7 de cultivo se definen las distintas subpoblaciones en base a la expresión de los marcadores característicos CD45 y CD36 (**B**) y se seleccionan (*Fluorescence-activated cell sorting*) las distintas subpoblaciones para estudio de cultivos en condiciones de expansión y diferenciación terminal (Fase II) (**C**).

Como resultado de la separación se obtiene una pureza $>90\%$ en las tres fracciones separadas en cuanto a los marcadores CD45 y CD36, y un nivel apenas detectable de células $CD34^+$ ($\sim 0,1\%$). Las 3 fracciones son centrifugadas (340 g, 10 min.) y luego resuspendidas en medio de cultivo IMDM suplementado con hSerB, SCF y EPO (7.2.1) a una concentración de $1 \cdot 10^5$ Cél/mL. Los cultivos se mantienen a 37°C y en atmósfera enriquecida al 5% de CO_2 , empleando sistemas de cultivos estáticos (*T-flask*) y un volumen de cultivo entorno a 10 mL. De la misma manera que en experimentos anteriores, la estrategia de cultivo llevada a cabo consistió en diluciones del medio de cultivo cada 2-3 días. Previo a cada actuación se toma muestra de cada uno de los cultivos para la cuantificación celular y análisis del perfil fenotípico mediante citometría de flujo.

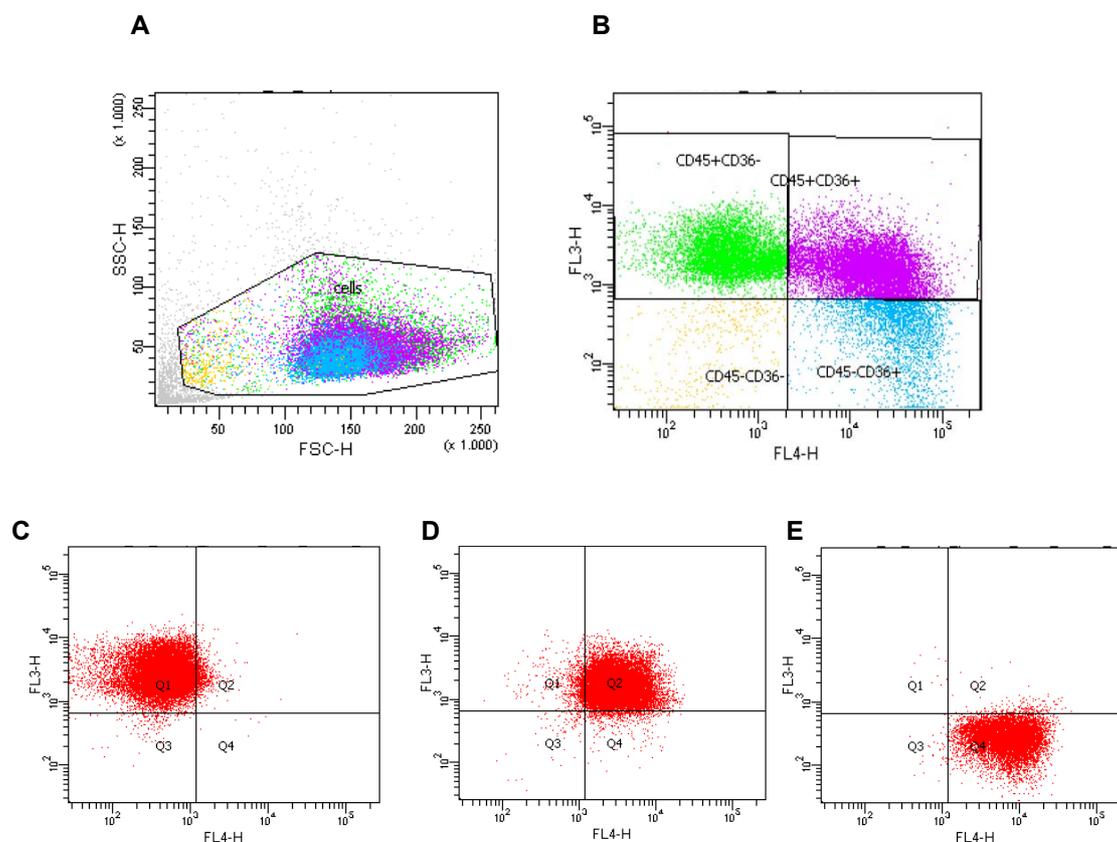


Figura 4–7 Selección de las distintas subpoblaciones celulares a día 7 de cultivo. Células en cultivo al día 7 fueron seleccionadas (*Fluorescence-activated cell sorting*) y segregadas mediante citometría de flujo. **A:** Representación de todas las células según tamaño y complejidad. **B:** Análisis y determinación de las distintas poblaciones según expresión de los marcadores característicos CD45 y CD36. **C, D, y E** Análisis post-separación de las distintas poblaciones seleccionadas.

Tal como se observa en la **Figura 4–8**, los resultados obtenidos muestran que la capacidad de expansión de las células en cultivo, depende de su estado madurativa, siendo mayor para estados mas inmaduros. Esta observación concuerda con lo discutido anteriormente, en donde se afirmaba que la capacidad de expansión se ve reducida conforme avanza el programa de diferenciación eritropoyetico. Los factores de expansión logrados en cultivo a 20 días fueron de $1,5 \cdot 10^4$ veces para la fracción inicial $CD45^+/CD36^-$ (fracción mas inmadura), $1,04 \cdot 10^4$ veces para la fracción $CD45^+/CD36^+$ y $2,83 \cdot 10^3$ veces para la fracción $CD45^-/CD36^+$ (fracción más madura). Curiosamente, e

independientemente del grado de maduración inicial, todos los cultivos arriban a una fase estacionaria entorno a los 12-14 días de cultivo. Estos resultados muestran que cada población logra distintos factor de expansión a partir de diferencias en la tasa de crecimiento. Teniendo en cuenta que el cultivo eritroide es un proceso en evolución continua, y que cada población está en constante crecimiento y maduración, se puede concluir que el proceso global es asincrónico.

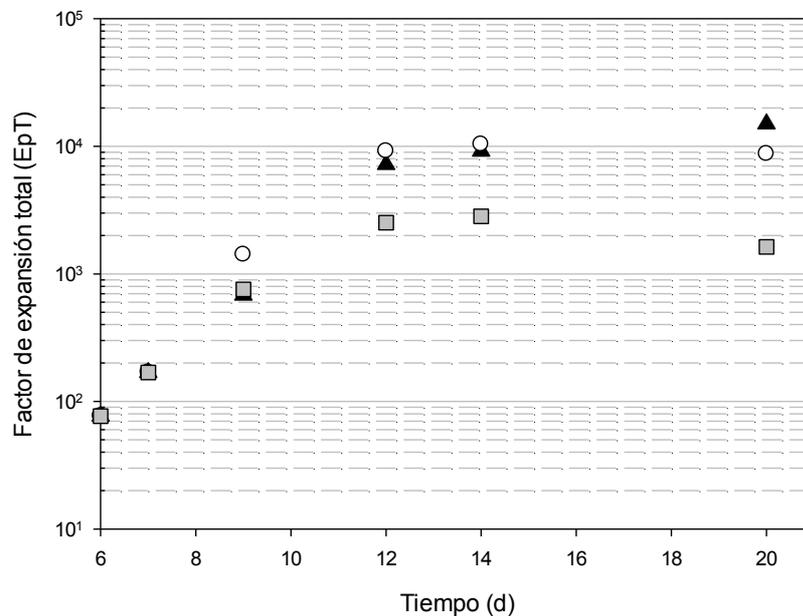


Figura 4-8 Representación del factor de expansión total de las distintas poblaciones de progenitores eritroides seleccionadas y posteriormente cultivadas bajo condiciones de expansión y diferenciación (Fase II). (▲) CD45+CD36-, (○) CD45+CD36+ y (■) CD45-CD36+. La expansión de CPE se realiza aplicando la estrategia desarrollada (Fase I) hasta el día 7 en medio de cultivo IMDM + Suero + Citoquinas. Al día 4 se realiza la primera actuación (dilución a 1/2 con medio de cultivo fresco), y posteriormente se actúa cada 2 días aplicando el mismo procedimiento. El día 7 se realiza la selección de las distintas subpoblaciones y se inician los cultivos a una concentración de $1 \cdot 10^5$ Cél./mL en medio de cultivo IMDM + hSerB + EPO/SCF. Cada dos días se realizan adiciones de medio fresco manteniendo la concentración células entre $0,5 \cdot 10^6$ y $1,0 \cdot 10^6$ Cél./mL. Los cultivos se mantienen a 37°C, 95% de humedad y en atmósfera enriquecida al 5% de CO₂.

Con el objetivo de caracterizar el proceso de maduración eritroide de las poblaciones celulares en cultivo seleccionadas, se realiza una determinación fenotípica mediante citometría de flujo a diferentes intervalos de tiempo a lo largo del cultivo. Tal como se

observa en la **Figura 4–10**, los resultados obtenidos muestran que, pese a las diferencias en los parámetros cinéticos de crecimiento entre las tres poblaciones, todas tienen la capacidad de generar células maduras al final del cultivo, observándose un perfil fenotípico similar en la etapa final del cultivo. El porcentaje de células con el fenotipo $CD45^-/CD36^-$ de 70,5%, 63,3% y 84,3% respectivamente (**Figura 4–9 B**).

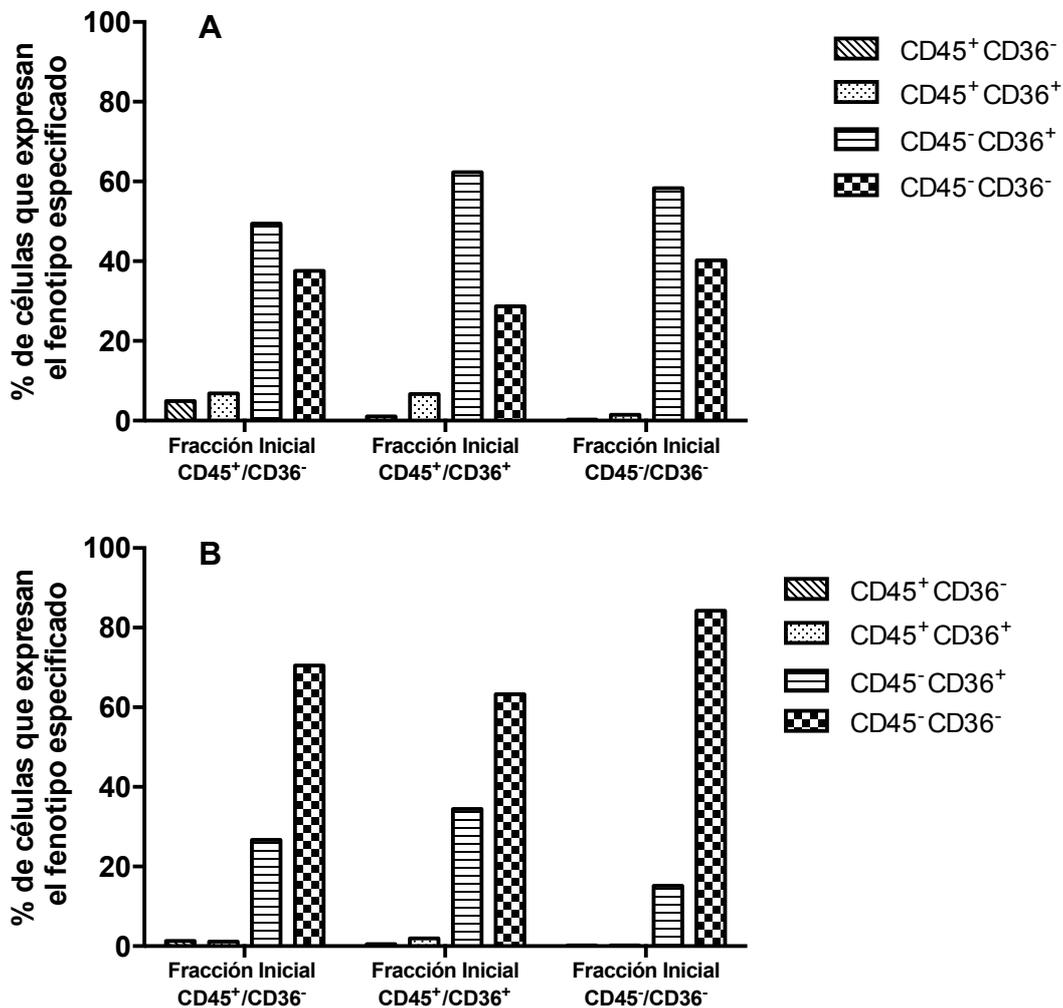


Figura 4–9 Representación de los porcentajes de células en los distintos estados madurativos según el perfil de expresión de los marcadores CD45 y CD36 de las distintas fracciones iniciales seleccionadas. A: Perfil a día 14 de cultivo y B: Perfil a día 20 de cultivo.

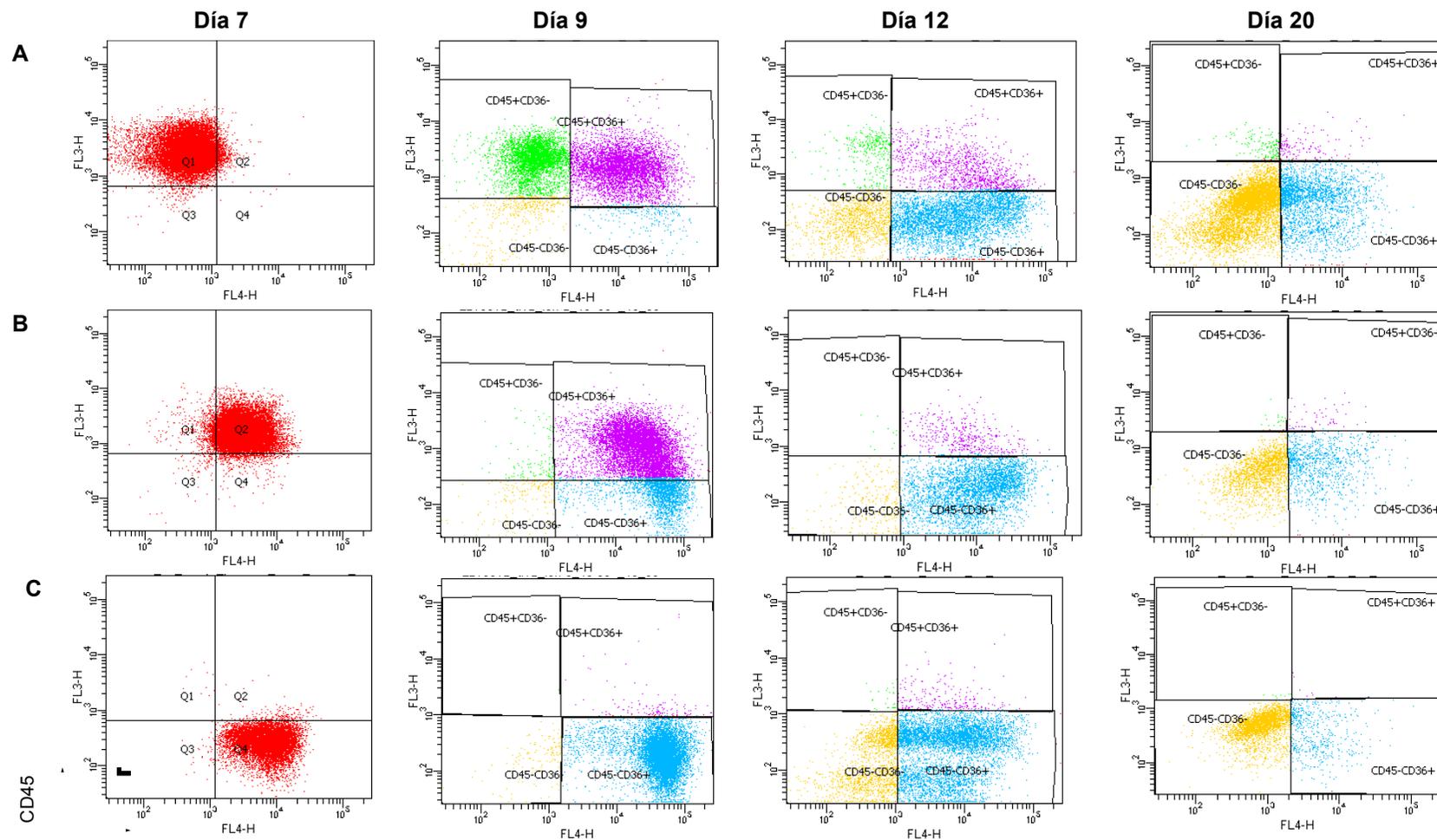


Figura 4–10 Evolución en el tiempo de los perfiles fenotípicos de las distintas poblaciones seleccionadas en cultivos de expansión y maduración eritroide. El grado de maduración fue definido en base al perfil de expresión de los marcadores CD45 y CD36. **A:** Perfil fenotípico en cultivo de la población CD45⁺CD36⁻; **B:** perfil fenotípico en cultivo de la población CD45⁺CD36⁺ y **C:** perfil fenotípico en cultivo de la población CD45⁻CD36⁺.

Observado el perfil fenotípico, podemos destacar el hecho que transcurridos 14 días de cultivo, en todos los cultivos se alcanza un grado de maduración avanzado, >90% de las células obtenidas en los tres cultivos presentan un fenotipo característico distribuido entre eritroblastos ortocromáticos y reticulocitos ($CD45^-/CD36^{+/-}$) (**Figura 4–9 A**). Este hecho coincide con la entrada en una fase estacionaria de crecimiento, como se destacó en el perfil de expansión de los distintos cultivos. Tal como se ha descrito anteriormente, a medida que las células progresan a través del proceso de diferenciación su potencial de ciclado decrece y en la etapa final se da la salida irreversible del ciclo celular. Se ha sugerido que dicha detención está estrechamente ligada a los fenómenos de condensación de la cromatina, que normalmente ocurre en la etapa de diferenciación terminal (Boehm et al., 2009; Dirlam et al., 2007).

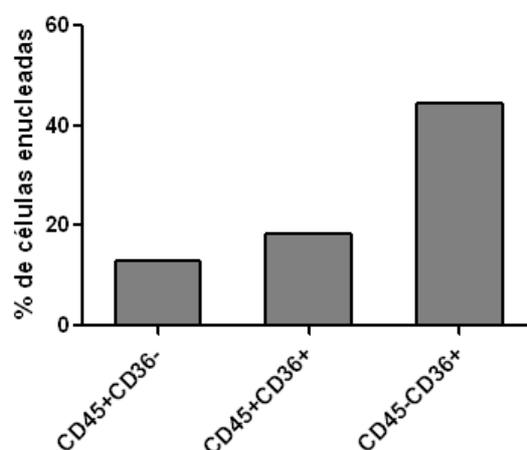


Figura 4–11 Representación del porcentaje de células enucleadas a día 21 de cultivo de las subpoblaciones seleccionadas.

Tal como se puede observar en la **Figura 4–11**, el análisis del porcentaje de células enucleadas al día 20 de cultivo muestra que la fracción inicial más madura ($CD45^-/CD36^+$) es la que genera el mayor porcentaje, siendo de un 44,4%. El porcentaje en los

otros cultivos es de 12,9% para la fracción CD45⁺/CD36⁻ y de un 18,3% para la fracción inicial CD45⁺/CD36⁺. Teniendo en cuenta la diferencia en los factores de expansión, el resultado indica que, si bien se logra un mayor porcentaje en la población inicial más madura, el número total de células enucleadas es similar en todos los cultivos.

4.2.3. Validación de la estrategia integrada para la generación *in vitro* de eritrocitos

Los estudios realizados anteriormente, han permitido definir una estrategia de cultivo para la expansión y diferenciación terminal de CPE y eritroblastos. Dicha estrategia, basada en una combinación diferencial de citoquinas y un régimen de diluciones seriadas, permite de manera eficiente la expansión y diferenciación terminal de células eritroides sin necesidad de cultivo sobre capa estromal de células mesenquimales de origen humano u otros. Esto confiere ventajas significativas al desarrollo del bioproceso en términos de seguridad y confiabilidad, reduciendo los riesgos potenciales asociados al empleo de líneas celulares auxiliares, pero más importante aún, simplificando el proceso de escalado dado que el programa de eritropoyesis, en su totalidad, se da a lugar con células anclaje no-dependientes.

A continuación, con el fin de poder evaluar la potencial utilidad de la estrategia integrada desarrollada para la generación *ex vivo* de eritrocitos a partir de células CD34⁺ purificadas de SCU, se llevan a cabo una serie de cultivos integrando las fases desarrolladas de expansión y compromiso de CMH/CPH con el linaje eritroide (fase I, desarrollada en el capítulo III) y la fase de expansión y diferenciación terminal de CPE y eritroblastos (fase II, desarrollada en el presente capítulo), tal como se resume en la **Figura 4–12**. Como se ha mencionado anteriormente, dada la variabilidad intrínseca

relacionada con la fuente celular primaria (células CD34⁺ purificadas de SCU), sumado al perfil heterogéneo y dinámico que adquieren los cultivos durante las distintas etapas del proceso, se hace imprescindible evaluar resultados sobre un conjunto considerable de cultivos. Por otro lado, la correcta caracterización del potencial de expansión y el perfil de distribución de las poblaciones a lo largo del cultivo permitirá identificar atributos críticos de calidad, es decir, las características que definen la calidad del producto y que impacto tienen estos atributos sobre el proceso. Esta información es crucial para determinar estrategias de optimización, y comparativamente, evaluar distintas estrategias de expansión. Por último, y teniendo en cuenta las consideraciones realizadas por la Agencia Europea del Medicamento (EMA/CAT/571134/2009) en torno al desarrollo de productos de terapias celulares avanzadas, los productos generados para dichas aplicaciones deben producirse mediante bioprocesos robustos, asegurando la calidad a lo largo de todo el proceso a fin de garantizar la consistencia y reproducibilidad del producto final. Por tanto, los estudios a continuación desarrollados, tiene por objetivo cubrir las premisas antes discutidas, entorno a la viabilidad de la estrategia desarrollada, robustez y escalabilidad.

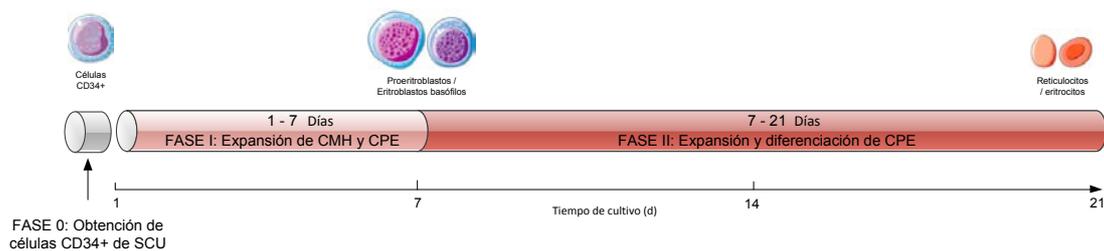


Figura 4–12 Esquema de la estrategia de cultivo combinada, desarrollada para la expansión de CMH y CPE en primer lugar (Fase I) seguido de una expansión y diferenciación terminal de CPE y eritroblastos (Fase II).

4.2.3.1 Estudio de la metodología de cultivo desarrollada: evaluación de robustez y viabilidad para la generación de eritrocitos en sistemas estáticos de cultivo.

A tal efecto, una vez definida la estrategia de cultivo, y con el objetivo de evaluar su viabilidad en la generación de cantidades significativas de producto celular (necesarias para su correcta caracterización funcional *ex vivo*), se realiza una serie de cultivos de expansión y diferenciación empleando la estrategia integrada. En resumen, esta estrategia consistió de una primera fase de cultivo, realizado a partir de células CD34⁺ purificadas de SCU en un volumen aproximado de cultivo de 10 mL y a una concentración inicial de $1 \cdot 10^4$ Cél. CD34⁺/mL en sistemas estáticos de cultivo (*T-Flask*). A dichos cultivos se le realizaron diluciones periódicas a fin de disminuir el impacto negativo de los factores inhibidores del cultivo acumulados a lo largo del cultivo, durante un total de 7 días empleando medio de cultivo IMDM suplementado con hSerB y citoquinas (7.2.1). A partir del día 7 de cultivo, se inicia una segunda fase modificando el medio de cultivo y empleando a partir de este momento diluciones en función de la concentración celular, ajustando la concentración de células totales a $0,5 \cdot 10^6$ Cél./mL luego de cada actuación. El perfil de la concentración celular, así como la evolución del volumen de cultivo, a modo de ejemplo en uno de los cultivos realizados, se pueden apreciar en la **Figura 4–13**. El volumen final, es la suma de los volúmenes correspondientes a los frascos de cultivo empleados. En este estudio, se iniciaron los cultivos en frascos de cultivo T-25 (*T-Flask* de 25 cm²) con un volumen útil aproximado de 10 mL, y se finalizaron en frascos de cultivo T-175 (*T-Flask* de 175 cm²) con un volumen útil por frasco de 100 mL. Los cultivos se mantienen a 37°C y en atmosfera enriquecida al 5% en CO₂. Periódicamente y previo a las actuaciones, se toma muestra de los cultivos para el seguimiento de la densidad celular. A partir de los datos obtenidos se calculan los factores de expansión total y número de duplicaciones.

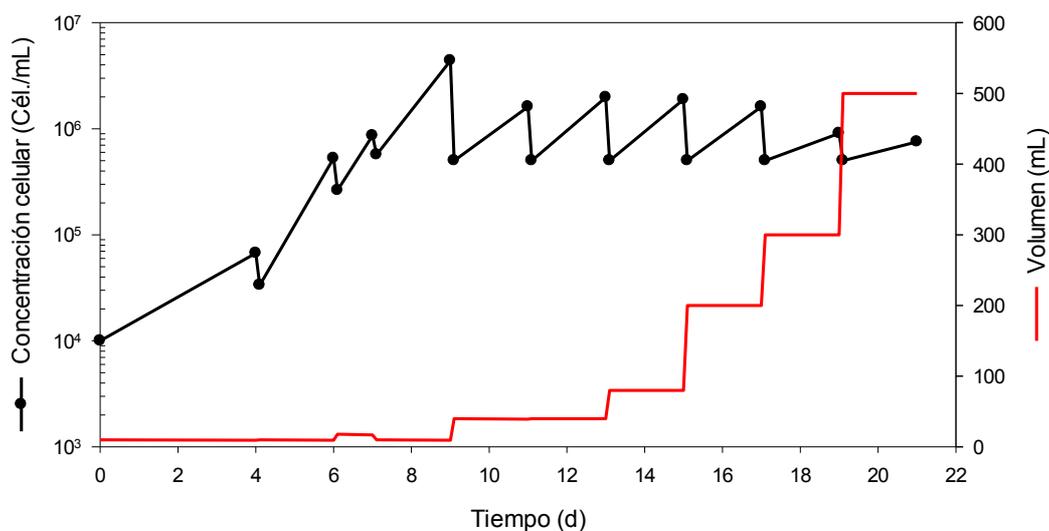


Figura 4–13 Representación de la evolución de la concentración celular y volumen de medio de cultivo de un lote como ejemplo, empleando la estrategia integrada de expansión y diferenciación. La expansión de CPE se realiza aplicando la estrategia desarrollada (Fase I) hasta el día 7 en medio de cultivo IMDM + Suero + Citoquinas. Al día 4 se realiza la primera actuación (dilución a $\frac{1}{2}$ con medio de cultivo fresco), y posteriormente se actúa cada 2 días aplicando el mismo procedimiento. A día 7 se realiza un recambio de medio total por medio IMDM + Suero + EPO/SCF (Fase II) y se actúa cada dos días realizando adiciones de medio fresco manteniendo la concentración celular entre $0,5 \cdot 10^6$ y $1,0 \cdot 10^6$ Cél./mL. Los cultivos se mantienen a 37°C, 95% de humedad y en atmósfera enriquecida al 5% de CO₂.

Tal como se puede observar en la **Figura 4–14**, los resultados obtenidos muestran que la estrategia desarrollada, aplicada a cultivos de expansión, permite la expansión sostenida del cultivo por un periodo aproximado de 16 días. Mas específicamente, el cultivo expuesto como ejemplo representado en la **Figura 4–13**, logra un factor de expansión total al final del cultivo de $1,2 \cdot 10^6$ veces. Una observación que se desprende de los cultivos sometidos a una estrategia de adición de medio de cultivo (entiéndase, estrategia de cultivo *fed-batch*) a diferencia de los estudios realizados en menor escala y conservando un volumen de cultivo aproximadamente constante es un incremento en los factores de expansión logrados. Tal como pudimos observar en los estudios de caracterización de las distintas poblaciones progenitoras eritroides realizado anteriormente en este capítulo, a consecuencia del carácter asíncrono de los cultivos, emular el efecto de dilución retirando una parte del cultivo y remplazándola por medio

fresco (con el fin de conservando el volumen final de cultivo) genera una depleción de células más inmaduras con mayor capacidad de expansión y un tiempo de duplicación menor al promedio de células en cultivo, limitando en parte, la capacidad de expansión total del cultivo bajo este régimen. Por tanto es evidente que, empleando una estrategia de cultivo tipo *fed-batch*, la capacidad de expansión total del cultivo se ve favorecida. No obstante, estos experimentos conllevan un consumo de recursos considerablemente mayores a los estudios en pequeña escala y volumen constante.

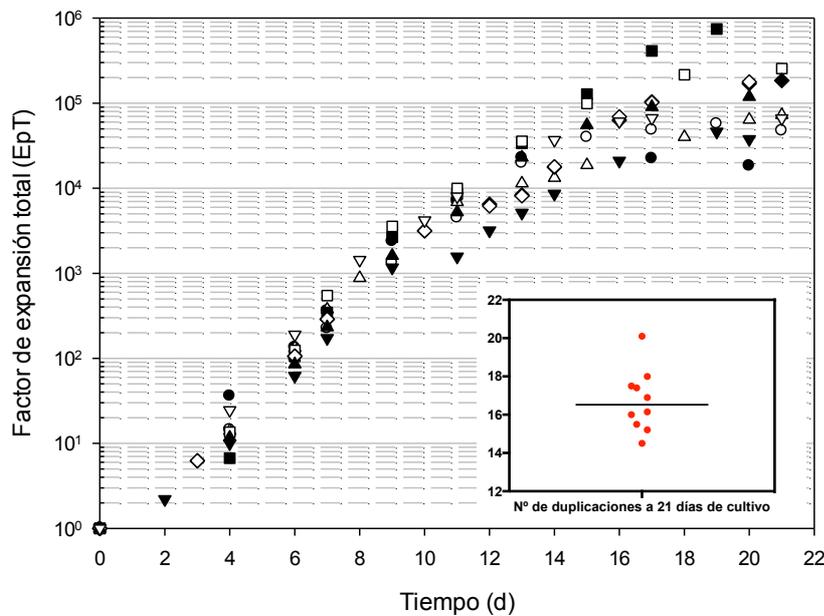


Figura 4–14 Representación de la evolución de los factores de expansión totales de todas las expansiones realizadas (N=10) y número de duplicaciones teóricas a día 21 de cultivo, empleando la estrategia integrada de expansión y diferenciación eritroide a partir de células CD34⁺ de SCU.

Como se ha mencionado anteriormente, y con el fin de caracterizar la robustez de la estrategia desarrolla, se han llevado a cabo un total de 10 cultivos de expansión a partir de un inóculo celular de $1 \cdot 10^4$ Cél. CD34⁺/mL en sistemas estáticos de cultivo (*T-Flask*), siguiendo la estrategia antes descrita. Tal como se resume en la **Figura 4–14**, los

resultados obtenidos muestran que la estrategia desarrollada permite una expansión celular sostenida en el tiempo, lográndose factores de expansión comprendidos en un rango de $4,75 \cdot 10^4$ y $1,12 \cdot 10^6$ ($2,1 \cdot 10^5 \pm 3,2 \cdot 10^5$, $n=10$) de células totales al final de cultivo. En términos de número de duplicaciones teóricas, esto se traduce en unas $16,7 \pm 1,6$. Si bien consideramos estos resultados de forma positiva, conviene destacar la variabilidad en los factores de expansión logrados al final de cultivo. Este fenómeno puede ser atribuible a características intrínsecas de la fuente celular empleada (Csaszar et al., 2013).

4.2.3.2 Estudio del grado madurativo de las poblaciones celulares generadas en cultivos discontinuos alimentados en base a su caracterización fenotípica

Con el objetivo de caracterizar la evolución del perfil fenotípico de las células en las sucesivas etapas del cultivo a partir de la estrategia desarrollada, estas son analizadas por citometría de flujo a distintitos intervalos de tiempo mediante la combinación de marcadores característicos de células progenitoras y marcadores característicos del linaje eritroide (CD34, CD45, CD36, CD235a y CD71) (7.3.4).

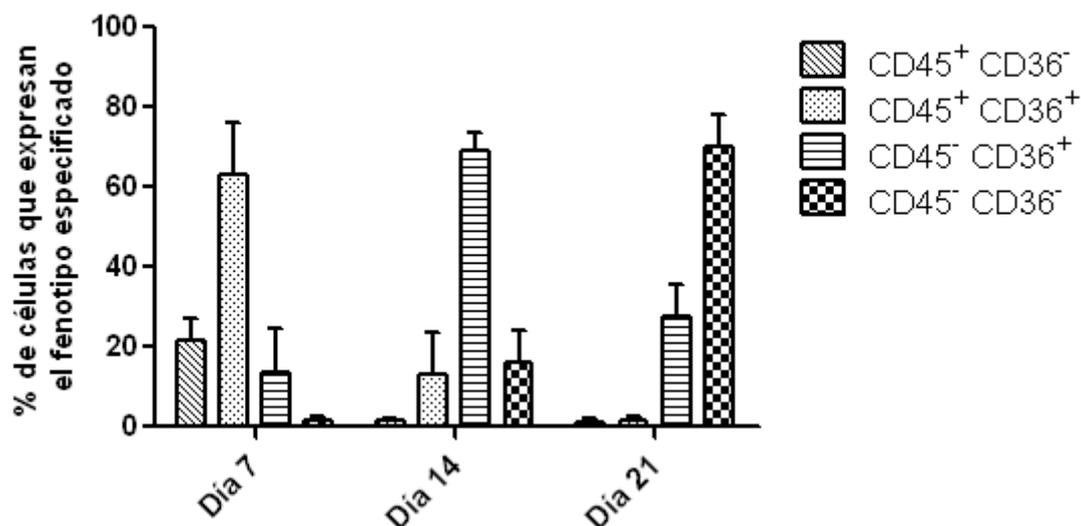


Figura 4–15 Representación de los porcentajes de células en los distintos estados madurativos según el perfil de expresión de los marcadores CD45 y CD36 a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se presentan como media con su desviación estándar correspondiente (n=5).

El estudio del perfil inmunofenotípico a diferentes intervalos de tiempo realizado en los cultivos siguiendo la metodología desarrollada, muestra que el perfil de evolución es similar y consistente, lote a lote, en los 5 cultivos estudiados. Como podemos observar en la **Figura 4–15**, transcurrido los primeros 7 días de cultivo, un $62,9 \pm 13,0$ % de las células en cultivo presentan un fenotipo característico del primer estadio madurativo: CD45⁺ CD36⁺. Esta observación nos permite comprobar sobre la expansión de CMH y CPH, el compromiso con el linaje eritroide. A partir de este momento, se inicia la segunda fase del proceso, orientada a la expansión y diferenciación terminal de las CPE y eritroblastos en cultivo. Las condiciones de cultivo fijadas, así como el medio definido para esta fase, permiten la proliferación y continua maduración de las células observándose al día 14 un claro avance del perfil de diferenciación: un $68,9 \pm 4,7$ % de las células presentan un fenotipo propio de eritroblastos en estado avanzado de maduración (CD45⁻ CD36⁺). Llegados a este punto, en donde la fracción mayoritaria de células en cultivo presenta dicho perfil fenotípico, se observa un descenso drástico en la

capacidad proliferativa del cultivo producto del avance en el programa de diferenciación eritroide. A partir de este momento, las células atraviesan la etapa terminal de diferenciación, caracterizada por el incremento en la expresión de los marcadores característicos CD235a y CD71. Al día 21 de cultivo, la población CD45⁺ CD36⁻ deviene mayoritaria siendo un $70,0 \pm 8,1$ % de la población total. La caracterización inmunofenotípica de las células según los marcadores característicos de células eritroides maduras confirma en su mayoría el perfil típico de reticulocitos y eritrocitos, ya que estas expresan glicoforina A (CD235a) en un $95,3 \pm 8,1$ % y receptor de transferrina (CD71) en un $92,7 \pm 5,3$ % (n=9). La evolución de los marcadores estudiados a lo largo del cultivo nos permite comprender y caracterizar las sucesivas etapas críticas del proceso como son, tanto el compromiso con el linaje eritroide por parte de las CMH y CPH en cultivo, así como la correcta evolución del programa de diferenciación eritroide. Una consideración importante en el desarrollo de bioprocesos, es la definición de estrategias de control que permitan asegurar tanto la calidad del producto final, así como la calidad del proceso en todas sus etapas. En este sentido, la plataforma desarrollada para la caracterización fenotípica de células eritroide, cumple en principio, con los atributos necesarios para su implementación y desarrollo como estrategia de control a fin de asegurar la calidad a lo largo del proceso.

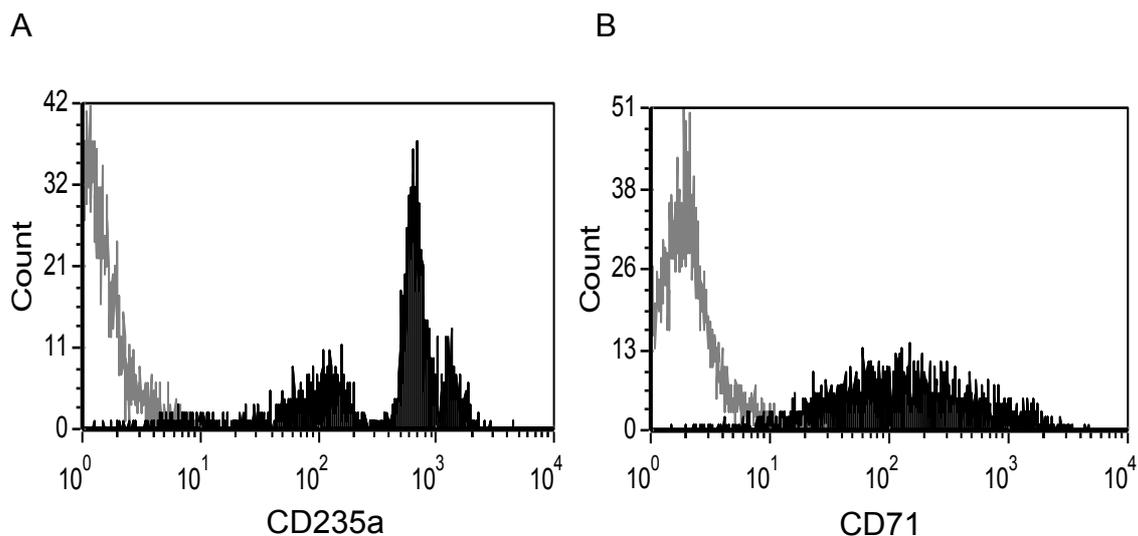


Figura 4–16 Análisis por citometría de flujo para la determinación del porcentaje de expresión de **A:** Glicoforina A (CD235a) y **B:** receptor de transferrina (CD71) en cultivos al día 21. En los histogramas, la línea gris corresponde a los controles de isotipo y la superficie en negro a las células marcadas con el correspondiente anticuerpo. Los datos corresponden a un cultivo representativo.

4.2.4. Estudio del proceso de enucleación bajo condiciones de normoxia e hipoxia en medios de cultivo experimentales.

Como se ha mencionado anteriormente, un aspecto crítico del proceso eritropoyético es la etapa de enucleación, condición necesaria para la formación del reticulocito en la fase terminal de maduración. Tal como se ha podido comprobar, la estrategia de cultivo desarrollada permite en su fase final la enucleación de un parte significativa de células con perfil fenotípico característico de células maduras. No obstante, el reto consiste en recrear condiciones de cultivo que permitan la generación del mayor número posible de células enucleadas al final del cultivo. Con este objetivo en claro, se realizan una serie de estudios modificando la composición del medio de cultivo empleado en los últimos 5 días de cultivo a fin de evaluar si estas modificaciones mejoran en el porcentaje de enucleación. Los resultados publicado por Miharada y colaboradores (Miharada et al., 2006), en donde demostraron que la interacción de eritroblastos con otras células no era condición necesaria para la diferenciación eficiente y enucleación celular, empleaban en

su etapa final medio de cultivo IMDM suplementado con albúmina de origen humano y grado clínico, en ausencia de citoquinas. Mas recientemente, el trabajo que hasta la fecha reporta el proceso de expansión más sorprendente (en teoría, aproximadamente 500 unidades de sangre por unidad de SCU expandida) publicado por Timmins y colaboradores (Timmins et al., 2011) emplea medio de cultivo basal IMDM suplementado con albúmina de origen bovino y una combinación de citoquinas y glucocorticoides compuestas por: IL-3, SCF, EPO e HC. En la etapa final de diferenciación eliminado del cultivo el factor de crecimiento SCF y la HC, logran una eficiencia de enucleación mayor al 90% a 21 días de cultivo, según los datos publicados. Como se ha discutido anteriormente, los glucocorticoides promueven la proliferación e inhiben la diferenciación de progenitores eritroides (Kolbus, 2003; Leberbauer, 2005; Lindern et al., 1999; Stellacci et al., 2009). Por tal motivo, queda justificada su remoción en la fase de diferenciación terminal. No obstante, en cierto grado, los glucocorticoides pueden estar presentes en los sueros empleados en cultivo, lo que confiere una duda razonable a su empleo en etapas de maduración avanzadas. Sin embargo, la eliminación del suero del medio de cultivo puede comprometer seriamente la viabilidad celular. Por tanto, en base a la información presentada anteriormente, se decide estudiar en la fase final de maduración la sustitución del hSerB por albúmina huma de grado clínico, y el efecto de las citoquinas SCF y EPO generando tres formulaciones experimentales. En detalle, la composición de los medios experimentales y el medio control se resume en la **Tabla 4-3**. En paralelo, los estudios se llevaran a cabo bajo condiciones de normoxia e hipoxia a fin de evaluar el efecto de la concentración de oxígeno en la etapa final de diferenciación, tal como se ha introducido al inicio del capítulo.

Componentes	Medios de cultivo experimentales			
	hSerB+SCF+EPO	HSA+SCF+EPO	HSA+EPO	HSA
Medio Basal	IMDM	IMDM	IMDM	IMDM
Suero humano	5% (v/v)	--	--	--
Albúmina humana	--	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)
L-Glutamina	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Transferrina	330 µg/mL	330 µg/mL	330 µg/mL	330 µg/mL
Insulina	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL
EPO	3 IU/mL	3 IU/mL	3 IU/mL	--
SCF	100 IU/mL	100 IU/mL	--	--

Tabla 4-3 Detalle de los componentes y concentraciones empleadas en los distintos medios experimentales estudiados.

Los cultivos se inician a partir del producto celular generado al día 16 de cultivo, en base a la metodología desarrollada anteriormente. En resumen, las células producto de cultivo al día 16 son centrifugadas (340 g, 10 min.) a fin de eliminar el medio de cultivo condicionado y luego resuspendidas en los distintos medios formulados a una concentración de $5 \cdot 10^5$ Cél./mL. Para el mantenimiento de los cultivos se emplearon dos incubadores, ambos a una temperatura de 37°C y en atmosfera enriquecida al 5% de CO₂, empleando sistemas de cultivos estáticos (*T-flask*) y un volumen de cultivo entorno a 10 mL. En un incubador, la condición de oxígeno era normal (ambiental) y en el otro incubador, mediante el suministro de una mezcla de gases de grado clínico, se configuró a una concentración de oxígeno entorno al 3%. El producto celular resultante en todas las condiciones se caracterizó mediante recuento celular, análisis de fenotipo y porcentaje de enucleación al inicio y final de cultivo.

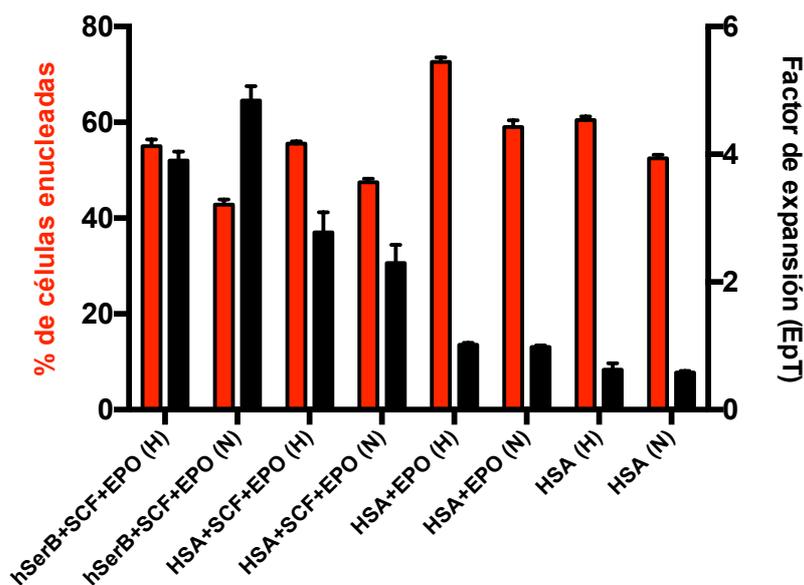


Figura 4–17 Representación del porcentaje de células enucleadas (%; ■) y factor de expansión (EpT, ■) alcanzado en los distintos medios de cultivo estudiados, bajo condiciones de normoxia (N) e hipoxia (H).

Como podemos observar en la **Figura 4–17**, los resultados obtenidos muestran que el medio formulado con hSerB, SCF y EPO permite una mayor expansión de células totales, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Curiosamente, se observó mayor porcentaje de enucleación a baja concentración de oxígeno ($55,0 \pm 1,4\%$). Teniendo en cuenta el factor de expansión logrado y el porcentaje de células enucleadas, el medio control (formulado con hSerB+SCF+EPO) es el que permite, al final del cultivo, el mayor número de células enucleadas totales. En comparación, el medio suplementado con HSA+EPO es la condición que proporciona el mayor porcentaje de células enucleadas bajo condiciones de hipoxia ($72,7 \pm 0,9\%$) y normoxia ($59,0 \pm 1,4\%$), no obstante la capacidad de expansión se ve limitada respecto al medio de cultivo control. Observando los resultados obtenidos, podemos suponer que los cultivos suplementados con albúmina humana tienden a promover la maduración terminal, dando como resultado un mayor grado de enucleación. No obstante, conviene señalar que el objetivo final es lograr el mayor número de células totales enucleadas.

Por tanto, promover la expansión en detrimento de un mayor grado de enucleación, sería una solución de compromiso aceptable. En este sentido, en base a los criterios fijados y los resultados obtenidos, el medio control suplementado con hSerB, SCF y EPO es el que proporciona un balance óptimo.

En este estudio, se investigó el efecto directo de pO_2 en la proliferación y diferenciación de células eritroides, en la etapa terminal de maduración observándose como resultado una leve mejora en los porcentajes de enucleación al final del cultivo, en todas las combinaciones de medios experimentales estudiados bajo condiciones de hipoxia. No obstante, el factor de expansión no demostró ser regulado de forma positiva bajo dicha condición. Estas observaciones concuerdan con los trabajos publicados por Rogers y colaboradores (Rogers et al., 2008), no obstante el efecto directo de pO_2 en las células progenitoras eritroides, y sus mecanismos de acción no han sido dilucidado de forma clara todavía, hecho que justifica el bajo consenso y contradicciones que se observa en los trabajos publicados al respecto (Ivanovic, 2009a; 2009b; Perry et al., 2007; Rogers et al., 2008; Vlaski et al., 2009). Podemos suponer que, la falta de consenso se encuentra relacionado a dos factores claves: en primer lugar, la heterogeneidad en los protocolos ensayados. Y en segundo lugar, problemas técnicos relacionados con los sistemas de cultivo empleados y el control del oxígeno a bajas concentraciones. En este sentido, la implementación de la estrategia desarrollada en sistemas de cultivo agitados y que permitan la implementación de controles activos sería una herramienta tecnológica valiosa en el estudio, desarrollo y optimización de procesos eritropoyéticos.

4.2.5. Caracterización de células eritroides generadas en cultivos *ex vivo*

Los estudios realizados anteriormente ponen de manifiesto que la estrategia de cultivo desarrolla permite la expansión y compromiso con el linaje eritroide de CMH/CPH promoviendo en una primera fase, la generación de células progenitoras y células precursoras eritroides. En una segunda fase de la estrategia desarrollada, dichas células son capaces de proliferar y madurar de forma terminal generando como resultado células enucleadas. A fin de poder evaluar características básicas del producto generado como posible candidato terapéutico alternativo en clínica, este debería exhibir unos atributos y funciones biológicas similares a las células homologas nativas. Por tanto, el siguiente apartado tiene como objetivo evaluar propiedades morfológicas y funcionales características del tipo celular. La información obtenida es crítica para evaluar la calidad de la estrategia desarrollada y especialmente relevante para el desarrollo del trabajo.

Por tanto, en primer lugar se lleva a cabo una caracterización morfológica e inmunohistoquímica de muestras celulares generadas en cultivo a distintos intervalos de tiempo con el fin de comprobar cualitativamente las principales características morfológicas de las células producidas mediante examen microscópico. Posteriormente, se realizan una serie de análisis y ensayos funcionales con el fin de caracterizar parámetros hematológicos básicos de las células enucleadas producidas en cultivo.

4.2.5.1 Análisis morfológico de las células generadas en cultivo

El estudio del perfil inmunofenotípico llevado a cabo pone de manifiesto que, mediante la estrategia de expansión y diferenciación desarrollada, el perfil de las poblaciones celulares evoluciona produciéndose una maduración progresiva de las células progenitoras y precursoras generadas en cultivo. A fin de poder constatar la identidad

celular y caracterizar los cambios morfológicos a través de las distintas etapas del proceso, se evaluó la morfología celular mediante examen microscópico y tinción May-Grünwald-Giemsa de muestras citocentrifugadas, a distintos intervalos de tiempo. La identidad de las células se confirma de forma complementaria mediante marcajes inmunocitoquímicos de los marcadores CD235a (linaje eritroide) y CD3 (linfocitos). Las muestras fueron procesadas y analizadas gentilmente por la Dra. Lourdes Florensa y colaboradores en el Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia del Hospital del Mar (Parc de Salut Mar, Barcelona).

Como se puede observar en la **Figura 4–18 A**, en la muestra analizada transcurridos 5 días de cultivo siguiendo la estrategia de cultivo antes desarrollada, podemos observar una población mayoritaria compuesta por células con características morfológicas semejantes a proeritroblastos (> 95%) y una positividad mayor al 85% del marcador de glicoforina A, marcador característico del linaje eritroide. Se observó también menos de un 5% de células con características morfológicas semejantes a células granulocíticas y en ningún caso se detectó positividad para el marcador CD3, característico de células linfocíticas. Probablemente, dichas células y otras quizá presentes en estadios tempranos del cultivo, son productos residuales del proceso de purificación de células CD34⁺. Tras 12 días de cultivo, como podemos observar en la **Figura 4–18 B**, las células presentan una positividad mayor al 96% respecto al marcador de glicoforina A y una distribución celular compuesta por un 7% de proeritroblastos, 11% eritroblastos basófilos, 25% eritroblastos policromáticos, 55% eritroblastos ortocromáticos y un 2% de hematíes.

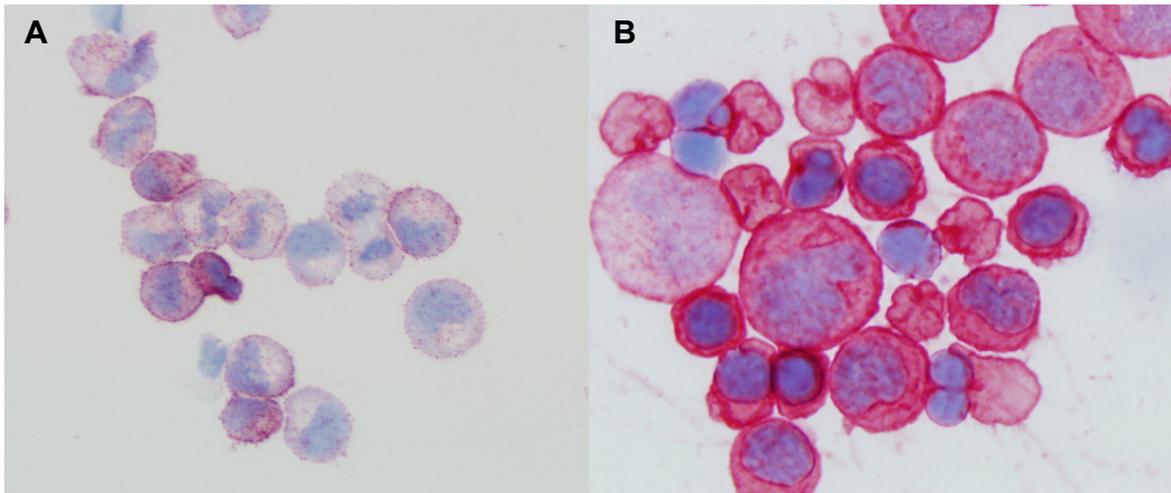


Figura 4–18 Imágenes de células en cultivo obtenidas mediante microscopía óptica. Citocentrifugación y tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD235a (Glicoforina-A) para determinar positividad de membrana (inmunocitoquímica). **A:** Muestra evaluada al día 5 de cultivo. Células en su mayoría proeritroblastos, positividad para Glicoforina-A > 85% (+/++). Presencia de otras células < 5% (granulos). En ningún caso se detectó positividad para CD3 (linfocitos) **B:** Muestra evaluada al día 12 de cultivo. Proeritroblastos 7%, eritroblastos basófilos 11%, eritroblastos policromáticos 25%, eritroblastos ortocromáticos 55% y hematíes 2%, positividad para Glicoforina-A > 96% (++/+++). Las muestras fueron procesadas y analizadas gentilmente por la Dra. Lourdes Florensa y colaboradores en el Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia del Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona.

La tinción May-Grünwald-Giemsa de muestras citocentrifugadas, correspondientes al día 21 de cultivo confirma la presencia de células enucleadas en cultivo. Esto comprueba que, mediante la estrategia desarrollada, se logra la maduración terminal del cultivo, inclusive la enucleación celular de una fracción del cultivo. No obstante, y tal como se observó mediante estudios por citometría de flujo, en la etapa final del cultivo se observa un remanente de células nucleadas, compuesta básicamente por eritroblastos en distintos grados de maduración. Dicho fenómeno es una consecuencia directa del carácter asíncrono de este tipo de cultivos, como hemos podido comprobar anteriormente.

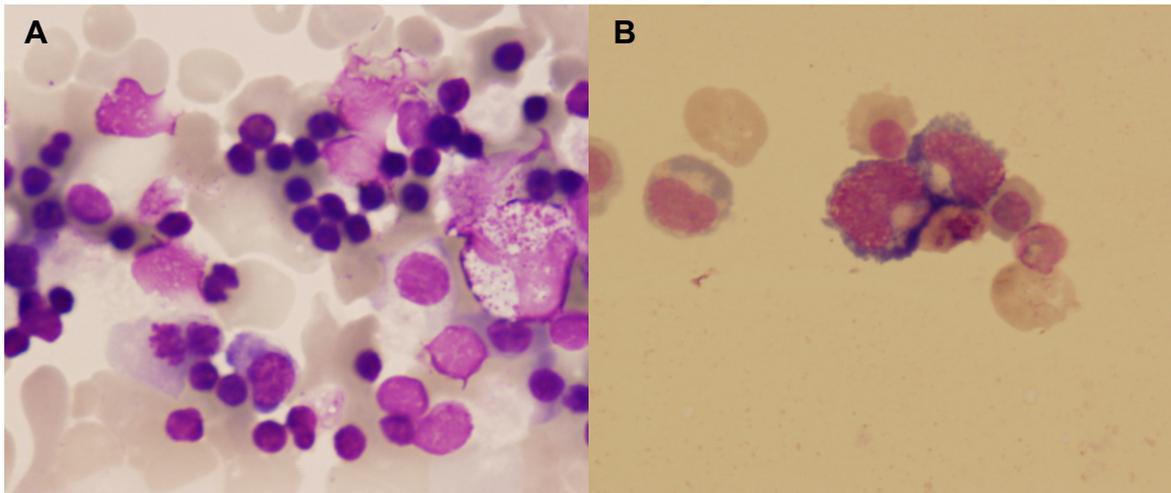


Figura 4–19 Caracterización morfológica de células en cultivo a tiempo 21 días por citología óptica con tinción May-Grünwald-Giemsa de muestras citocentrifugadas. En ambas imágenes (**A** y **B**) se observan eritroblastos en distintas etapas de maduración, células en proceso de enucleación y células enucleadas. Las muestras fueron procesadas y analizadas gentilmente por la Dra. Lourdes Florensa y colaboradores en el Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia del Hospital del Mar. Parc de Salut Mar, Barcelona.

Con el objetivo de caracterizar el producto celular enucleado, generado mediante la estrategia desarrollada, la suspensión celular producida al día 21 de cultivo fue purificada mediante su paso a través de un filtro leuco-reductor (Leukotrap[®] RC2D, Pall Corporation, NY, EEUU) a fin de eliminar los núcleos expulsados y eritroblastos residuales. La etapa de separación dio como resultado una población homogénea de células enucleadas, tal como podemos observar en la **Figura 4–20**. No obstante la eficiencia del proceso fue muy baja, recuperándose una fracción menor al 10% de las células totales iniciales. Cabe destacar que dichos sistemas están concebidos para el procesamiento de unidades de sangre en donde la concentración por unidad de volumen de hematíes es 3 ordenes de magnitud superior a los cultivos celulares generados.

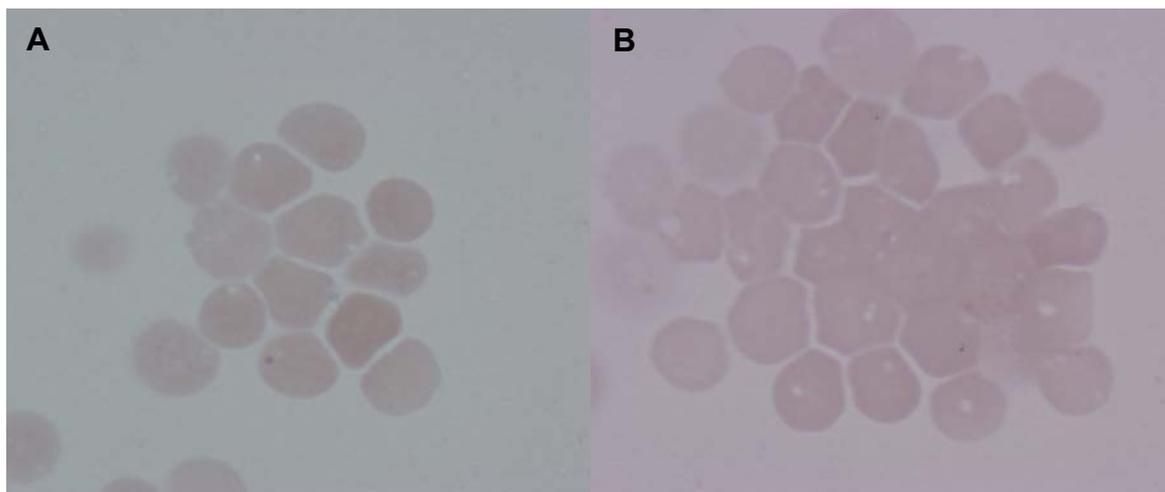


Figura 4–20 Caracterización morfológica de células en cultivo a tiempo 21 días, post-filtrado en filtro leucodeplecinador (RC2D, Pall), por citología óptica con tinción May-Grünwald-Giemsa de muestras citocentrifugadas. En ambas imágenes (**A** y **B**) se observa solo células enucleadas. Las muestras fueron procesadas y analizadas gentilmente por la Dra. Lourdes Florensa y colaboradores en el Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia del Hospital del Mar. Parc de Salut Mar, Barcelona.

4.2.5.2 Caracterización y evaluación funcional de hemoglobinas sintetizadas en células de cultivo.

A continuación, y a fin de caracterizar la composición de hemoglobina presente en las células enucleadas generadas en cultivo previamente purificadas, se emplea un método analítico integrado de referencia (Variant™ II, Bio-Rad, CA, EEUU), para la separación y determinación del porcentaje relativo de hemoglobinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico (7.7).

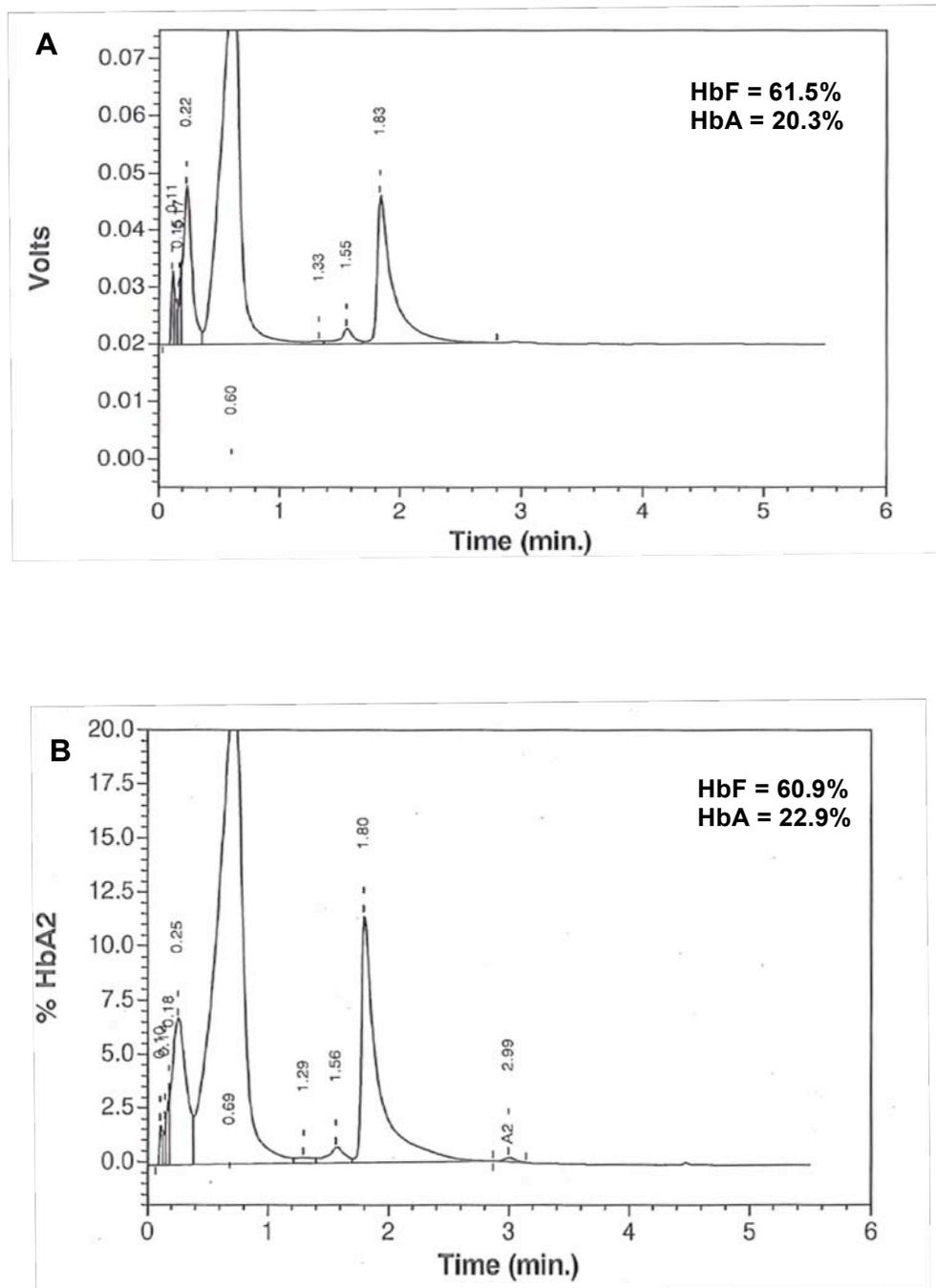


Figura 4–21 Cromatogramas de muestras analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación cuantitativa de hemoglobinas (Variant II, Bio-Rad). **A:** Muestra de células en cultivo a día 21. **B:** Muestra ejemplo de sangre periférica de un recién nacido.

A tal efecto, muestras con $1 \cdot 10^6$ células enucleadas fueron procesadas y cromatografiadas empleando el sistema de elución *dual kit's* (Bio-Rad, CA, EEUU).

Las áreas bajo los picos de hemoglobina fetal (HbF) y hemoglobina adulta (HbA) de las

muestras analizadas fueron integradas usando el software del sistema. Como podemos observar en la **Figura 4–21**, los resultados experimentales confirman que las células enucleadas generadas en cultivo expresan principalmente hemoglobina fetal (61,5%) y su composición es muy similar a la obtenida en sangre periférica en periodo neonatal. Estos resultados son consistentes con reportes publicados actualmente, en donde los eritrocitos producidos a partir de células CD34⁺ de SCU expresan en su mayoría HbF (Migliaccio et al., 2012b; Rousseau et al., 2013). La naturaleza de la hemoglobina sintetizada depende tanto del origen de las células CD34⁺, como así de las condiciones de cultivo empleadas. El trabajo publicado por Giarratana y colaboradores (Giarratana et al., 2004) comprobó dichas diferencias empleando células CD34⁺ de SCU, SPM y MO. En dicho trabajo, los eritrocitos obtenidos a partir de células CD34⁺ de SCU expresan principalmente HbF (64%), mientras que los eritrocitos obtenidos a partir de células CD34⁺ purificadas de SPM o MO de adultos, expresaban en su mayoría HbA (95%). En cuanto al efecto de las condiciones de cultivo empleadas, sobre la expresión del tipo de hemoglobinas, otros trabajos publicados plantean la hipótesis de que las vías de señalización relacionadas con la expansión eritroide, mediadas principalmente por las citoquinas EPO y SCF tienen efecto sobre la expresión de hemoglobina fetal (Lavelle et al., 2001; Mabaera et al., 2008; Peschle et al., 1993). En el trabajo publicado por Bhanu y colaboradores (Bhanu, 2004) observaron que la suplementación de SCF en cultivos de células eritroides genera un aumento, tanto de la expansión células, como así de la producción de hemoglobina fetal. Un aporte significativo en este sentido, fue publicado por Neildez-Nguyen y colaboradores (Neildez-Nguyen et al., 2002). En dicho trabajo, demostraron que eritroblastos generados a partir de células CD34⁺ de SCU en cultivos expresaban mayoritariamente hemoglobina fetal (74%) y en modelos *in vivo* eran capaces de madurar de forma terminal, generando eritrocitos funcionales que

expresaban ante todo hemoglobina adulta (HbA, 97%). Estos resultados sugieren que el cambio en la expresión de hemoglobinas puede ser acelerado mediante la interacción de células derivadas de SCU y el microambiente adulto *in vivo*.

Por último, se han realizado mediciones del porcentaje de saturación de oxígeno en muestras de células enucleadas obtenidas a 21 días de cultivo. Dicha determinación puede ser interpretada como una medida de la capacidad de unión del oxígeno con la Hb, y por tanto, un indicativo de la funcionalidad de las células producidas *ex vivo*. A tal fin, las muestras han sido acondicionadas y analizadas empleando un sistema automatizado capaz de cuantificar hemoglobinas funcionales y no funcionales, a partir de medidas espectrofotométricas, y mediante dichas determinaciones, calcular el porcentaje de saturación de oxígeno ($\%_sO_2$) (*Co-oximeter IL-682, Instrumental Laboratory, MA, EEUU*). Los resultados obtenidos han sido consistentes en dos experimentos independientes y muestran un valor promedio de saturación de oxígeno ($\%_sO_2$) de $99,2 \pm 2,88\%$ (n=4). Los resultados indican que las células generadas en cultivo se encuentran saturadas en oxígeno lo cual tiene sentido, ya que dichas células se mantienen bajo condiciones normales de temperatura y presión. El valor de referencia, en sangre arterial es de un 94-97%.

Por tanto, estos resultados parecen indicar que el proceso de expansión y diferenciación *in vitro* es capaz de producir células enucleadas al final del cultivo, las cuales presentan características similares a células homologas nativas.

4.3. DISCUSIÓN

El trabajo desarrollado en el capítulo anterior ha permitido definir una estrategia de cultivo basada en una combinación de citoquinas y glucocorticoides (IL-3, SCF, EPO e HC), que permite la expansión y compromiso de CMH/CPH, dando como resultado básicamente células progenitoras y precursoras eritroides. El trabajo realizado en el presente capítulo se ha centrado en el estudio y caracterización del potencial de expansión y diferenciación terminal de las células progenitoras y precursoras eritroides con el fin de lograr establecer una estrategia integrada para la obtención de eritrocitos a partir de células CD34⁺ de SCU.

Con este objetivo en claro, en primer lugar se han llevado a cabo una serie de estudios a fin de establecer los requerimientos del medio de cultivo necesarios para expansión y diferenciación terminal de células progenitoras y precursoras eritroides. La generación de eritrocitos a partir de las células progenitoras, depende de la consecución de un extenso programa de diferenciación en el cual, las células se dividen y diferencian sometándose a numerosos cambios substanciales, como la reducción en tamaño, condensación de la cromatina y hemoglobinización previo a su enucleación. Dicho proceso se encuentra regulado intrínsecamente por varios factores, de los cuales dos son de crucial importancia en cultivos *ex vivo*, la EPO y el factor de crecimiento SCF tal como hemos podido observar. El estudio de las cinéticas de crecimiento junto a la evolución del perfil fenotípico y la determinación del porcentaje de células enucleadas en los cultivos ensayados nos han permitido comprobar que, si bien la EPO es capaz de estimular por sí sola el programa de eritropoyesis, la acción cooperativa con SCF promueve una mayor proliferación. Esto nos ha permitido optimizar la composición del medio de cultivo en la fase de expansión y diferenciación terminal. Como resultado, mediante la estrategia desarrollada se obtienen altas tasas de expansión con un elevado

contenido de células precursoras eritroides que logran madurar de forma terminal generando células enucleadas en un alto porcentaje.

A fin de poder caracterizar la capacidad de expansión y diferenciación de las poblaciones celulares en distintos estadios de maduración y evaluar su contribución en la generación de células enucleadas en cultivos *ex vivo*, se ha realizado un estudio segregando las poblaciones definidas en base al el perfil de expresión de los marcadores CD45 y CD36 mediante una separación celular por citometría de flujo al día 7 de cultivo. El perfil establecido en función de los marcadores CD45/CD36, nos permite identificar una jerarquía en los cultivos de células progenitoras y precursoras eritroides. Tal como se estimaba, tras 20 días en cultivo siguiendo la metodología antes desarrollada, la población mas inmadura (CD45⁺/CD36⁻) logró un mayor potencial de expansión (EpT $1,5 \cdot 10^4$) en comparación con la fracción CD45⁺/CD36⁺ (EpT $1,04 \cdot 10^4$) y la fracción más madura CD45⁻/CD36⁺ (EpT $2,83 \cdot 10^3$). No obstante, la evolución del perfil fenotípico de las poblaciones estudiadas mostró que, a pesar de las diferencias en las cinéticas de crecimiento, todas las poblaciones maduran de forma consistente generando células enucleadas al final del cultivo.

Por otro lado, y en referencia a la evaluación morfológica y funcional de las células enucleadas generadas, se ha llevado a cabo una caracterización morfológica e inmunohistoquímica de las células a distintos intervalos de tiempo confirmándose características similares de la serie eritropoyetica, una reducción del tamaño progresivo conforme avanza el programa de diferenciación y finalmente la generación de células enucleadas en la etapa final del cultivo. Se ha comprobado su identidad mediante inmunohistoquímica y la naturaleza unilineaje de las células en cultivo quedó evidenciada ante la ausencia de células no eritroides en estados avanzados del cultivo. Los estudios funcionales realizados han consistido en la cuantificación y caracterización del

contenido de hemoglobinas en los reticulocitos generados *ex vivo*. La separación y determinación del porcentaje relativo de hemoglobinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico confirmó que las células expresan principalmente hemoglobina fetal (61,5%). El tipo de hemoglobina (fetal o adulta) sintetizada por células producidas *ex vivo* reflejan tanto el origen de las células primarias empleadas como así la estrategia de cultivo desarrollada (Bhanu, 2004; Lavelle et al., 2001; Mabaera et al., 2008; Wojda et al., 2002). Esta diversificación puede reflejar la intensidad de los factores inductores de la eritropoyesis empleados en la estrategia desarrollada. Por último, se analizó el porcentaje de saturación de oxígeno en las células producidas *ex vivo* a fin de evaluar la capacidad de unión de las hemoglobinas con el oxígeno. El valor promedio obtenido en las muestras analizadas muestra una elevada capacidad de captación de oxígeno (%_sO₂ de 99,2 ± 2,88%). Estos valores indican que las células generadas en cultivo se encuentran saturadas en oxígeno, comparable al valor de referencia en sangre arterial (94-97%). En este sentido, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que efectivamente las células enucleadas producidas presentan unas características similares a las células nativas homologas. Estos resultados se corresponden con trabajos publicados por otros grupos de investigación (Giarratana et al., 2004; Neildez-Nguyen et al., 2002) en donde también observan la naturaleza fetal de las hemoglobinas sintetizadas en las células producidas *ex vivo* a partir de células CD34⁺ de SCU. Estos datos sugieren que las células generadas *ex vivo* son capaces de sintetizar Hb fetal, pero que el cambio en la expresión hacia hemoglobina adulta puede darse mediante su interacción con el microambiente adulto *in vivo* (Neildez-Nguyen et al., 2002).

Una vez definidos los requerimientos temporales así como la estrategia de cultivo, que en su conjunto permite la expansión y diferenciación terminal de células precursoras

eritroides a partir de células CD34⁺ de SCU, se decidió ensayar la estrategia integrada a una serie de cultivos representativos con el fin de caracterizar el potencial de expansión y el grado de maduración alcanzado. Los resultados obtenidos muestran que la estrategia desarrollada permite de forma consistente un factor de expansión a 21 días de cultivo de entre $2,0 \cdot 10^4$ y $1,2 \cdot 10^6$ con una media de expansión de $2,1 \cdot 10^5$ para un total de 10 experimentos realizados. El perfil fenotípico al final del cultivo se caracteriza por una población mayoritaria CD45⁻ CD36⁻ ($70,0 \pm 8,1\%$) la cual co-expresa glicoforina A (CD235a) en un $95,3 \pm 8,1\%$ y receptor de transferrina (CD71) en un $92,7 \pm 5,3\%$, marcadores característicos de células eritroides maduras. El porcentaje medio de enucleación logrado para estos cultivos es de un $42,9 \pm 1,1\%$. Pese a la variabilidad en los factores de expansión logrados al final de cultivo, fenómeno atribuible a la variabilidad intrínseca característica de la fuente celular empleada (Csaszar et al., 2013; luc Douay MD et al., 2009), analizando en conjunto los resultados podemos destacar que la estrategia desarrollada permite de forma consistente y reproducible lograr factores de expansión elevados y a su vez, una extensa maduración de las células precursoras eritroides. A su vez, la estrategia definida facilita el escaldo del proceso. No obstante, la obtención de cantidades significativas requeridas para su ensayo clínico conlleva problemas tecnológicos debido a los elevados volúmenes de cultivo necesarios. Como ya hemos comentado anteriormente, la producción de eritrocitos *ex vivo* a partir de células madre como producto alternativo a futuro, es el enfoque mas aceptado entre la comunidad científica hoy día. En este sentido, números grupos de investigación han reportado protocolos experimentales empleando células CD34⁺ de SCU para la generación *ex vivo* de eritrocitos (Migliaccio et al., 2012b; Singh, 2014). Los factores de expansión reportados en estos trabajos comprenden un rango de entre 10^4 y 10^6 respecto de las células CD34⁺ iniciales (Fujimi et al., 2008; Giarratana et al., 2004; Miharada et

al., 2006; Neildez-Nguyen et al., 2002; Vlaski et al., 2009). No obstante, la gran variedad de estrategias y condiciones de cultivo empleadas, así como el uso de células estromales en algunos, hace difícil evaluar de forma comparativa los resultados obtenidos. Por este motivo, creemos conveniente destacar dos trabajos en particular. En primer lugar, el trabajo realizado por el grupo de investigación del Prof. Douay (Giarratana et al., 2011), protocolo mediante el cual se realizó la primera prueba de concepto, transfundiendo células autólogas producidas *ex vivo* en paciente humano. En dicho protocolo, han reportado factores de expansión (a 18 días de cultivo) de $6,15 \cdot 10^4$ en base a células CD34⁺ iniciales de SPM y un porcentaje de células enucleadas entorno al 81%. En dicho estudio, la generación de $1 \cdot 10^{10}$ células enucleadas (el equivalente a 2,5 mL de una unidad de transfusión) para la prueba de concepto requirió el empleo de 13 litros de medio de cultivo. En segundo lugar, podemos destacar el trabajo publicado por el grupo del Dr. Timmins (Timmins et al., 2011) por tratarse del trabajo que hasta la fecha reporta el proceso de expansión más sorprendente. En dicho trabajo, destaca la no utilización de co-cultivos sobre capa estromal, logrando factores de expansión a 21 días de $1,73 \cdot 10^6$ y un 90% de células enucleadas.

Como hemos podido comprobar, la estrategia desarrollada es comparable en términos de rendimiento a los desarrollos de referencia en este campo, no obstante queda claro que mediante la tecnología empleada para el cultivo, hoy día sólo es posible la generación de un volumen reducido de células enucleadas para su evaluación en pruebas de concepto. Si bien todavía quedan por resolver numerosas cuestiones biológicas y regulatorias relativas a la eficacia y seguridad de estos nuevos productos de terapia celular, teniendo en cuenta que el objetivo final es la generación de eritrocitos para fines de transfusión y debido al gran número de células que esto requiere, el gran reto hoy día pasa por trasladar los procesos de cultivo de sistemas estáticos (2D)

inviabiles para la producción a gran escala, a su producción en sistemas agitados escalables: bioreactores.

Por tanto, el siguiente capítulo se plantea con el objetivo de transferir la estrategia desarrollada de expansión y diferenciación de CMH/CPH, a sistemas de cultivo agitados y escalables como plataforma de referencia para la generación de eritrocitos *ex vivo*.

CAPÍTULO 5

Generación *ex vivo* de eritrocitos en
bioreactores de tanque agitado

5. GENERACIÓN *EX VIVO* DE ERITROCITOS EN BIOREACTORES DE TANQUE AGITADO

5.1. INTRODUCCIÓN

Mediante la estrategia de cultivo definida en el capítulos IV, compuesta por una primera etapa de expansión y compromiso de CMH/CPH, seguida por una etapa de diferenciación de eritroblastos, se ha logrado obtener como resultado células enucleadas (reticulocitos y eritrocitos) con características morfológicas y funcionales semejantes a las células homologas nativas.

Pese a los buenos resultados obtenidos, y si bien todavía quedan por resolver numerosas cuestiones biológicas y regulatorias relativas a la eficacia y seguridad de estos nuevos productos de terapia celular, en el contexto del desarrollo de un bioproceso que persigue como objetivo la generación de eritrocitos con fines terapéuticos, dicha estrategia tiene dos inconvenientes principales. En primer lugar, la generación de un número de células clínicamente relevantes para su correcta evaluación funcional, en función de las densidades celulares alcanzadas y los factores de expansión obtenidos, requeriría de volúmenes de cultivo muy elevados. En segundo lugar, los sistemas de cultivo empleados (*T-flask*) para el desarrollo a escala laboratorio, a raíz de su naturaleza estática, presentan una serie de limitaciones que en su conjunto hacen inviable la transferencia tecnológica de la estrategia desarrollada para la producción a escala.

Estas observaciones ponen de manifiesto las limitaciones de las técnicas de producción en los sistemas de cultivo estáticos empleados (2D) hasta el momento, y por tanto, la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo mas eficientes y escalables para el desarrollo de bioprocesos que permita definir las características y necesidades de un proceso de producción a escala, mediante un diseño racional, con el cual lograr de

forma consistente el producto de terapia celular avanzado. En este sentido, la implementación de bioreactores como sistemas de cultivo avanzados, es la alternativa más apropiada para el desarrollo de procesos escalables, mediante los cuales lograr dosis celulares elevadas. Estos sistemas a su vez, permiten la implementación de sistemas de monitorización y control del proceso, aspectos esenciales para el cultivo bajo condiciones controladas y reproducibles, condición necesaria a fin de asegurar que tanto el proceso, así como el producto final, cumplan con los requisitos de calidad predeterminados para la industria, de manera consistente y fiable.

Es por este motivo que el presente capítulo se plantea con el objetivo de transferir la estrategia de cultivo desarrollada en sistemas estáticos (2D), a sistemas de cultivo agitados (*STB*), adaptando las distintas etapas del proceso (expansión, diferenciación y maduración) bajo condiciones monitorizadas y controladas del ambiente de cultivo.

Como hemos comentado anteriormente, la elección habitual para el cultivo de CMH/CPH a escala laboratorio son los sistemas de cultivo estáticos, tales como los frascos de cultivo (*T-flask*), placas de pocillos o bolsas permeables a gases. A pesar de su uso generalizado por su simplicidad, facilidad de manejo y bajo coste, estos sistemas presentan una serie de desventajas, operacionales y regulatorias, que limitan su aplicabilidad para la producción de grandes cantidades celulares. Dichas limitaciones radican en su naturaleza estática y la consecuente generación de gradientes de concentraciones (pH, pO₂, nutrientes, metabolitos, etc.) en el medio de cultivo. Por otro lado, la monitorización de variables críticas de cultivo, así como el control del proceso y su escalado es muy complejo en estos sistemas. El enfoque típico para solventar estas dificultades es pasar de estos sistemas de cultivo (2D) al cultivo en bioreactores. Cultivos de expansión y diferenciación de una gran variedad de células madre han sido estudiados por numerosos grupos de investigación empleando diversos tipos de

bioreactores, en general con buenos resultados respecto a los cultivos en sistemas estáticos (Liu et al., 2013; Rodrigues et al., 2011). Las CMH/CPH son células anclaje-no dependientes, lo que le confiere una característica muy ventajosa desde un punto de vista operacional, ya que permite su crecimiento en suspensión. Diferentes configuraciones de bioreactores han sido adaptados para la expansión y diferenciación de estas células (Cabrita et al., 2003; Collins et al., 1996; Nielsen, 1999). Entre las distintas configuraciones de bioreactores disponibles, los tipos mas empleados son: cámaras de perfusión, cartuchos de fibra hueca (*hollow-fiber*), reactores rotatorios de lecho empacado, bioreactores tipo *wave* y bioreactores de tanque agitado (Liu et al., 2013; Ozturk and Hu, 2005). Si bien, todos estos sistemas han demostrado ser competentes en cultivos de expansión de CMH/CPH, dado la gran cantidad de células eritroides requeridas para su aplicación terapéutica, pocas de estas alternativas permiten el escalo requerido. En este sentido, dada su relativa simplicidad de operación y facilidad de escalado, el bioreactor de tanque agitado reúne las condiciones necesarias para el desarrollo y optimización de un bioproceso de estas características. Los biorreactores de tanque agitado (*STB*) son el tipo de biorreactore más ampliamente utilizados para el cultivo de células en suspensión, debido principalmente a la amplia experiencia generada en el cultivo de bacterias y células animales en los últimos 60 años. Su flexibilidad, eficiencia, robustez y reproducibilidad han extendido su uso en la industria biofarmacéutica, y por diferencia, es la tecnología de referencia empleada para la producción de vacunas virales, proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales, entre otros productos (De Jesus and Wurm, 2012). Básicamente consta de un recipiente equipado con un impulsor para proporcionar un ambiente agitado, homogéneo y dinámico que permite el crecimiento de las células en suspensión. Sus principales características son la eficiencia en la transferencia de gases y nutrientes, control y

monitorización precisa del ambiente de cultivo (pH, pO₂, temperatura, etc.), permite la operación de un amplio tipo de estrategias de cultivo (*batch*, *fed-batch*, perfusión, etc.) y permite de forma muy sencilla y reproducible la generación de modelos *scale down*, esenciales para el estudio y optimización de parámetros de cultivo y control de procesos. El cultivo de CMH/CPH se ha estudiado con particular atención en estos sistemas de cultivo (Cabral, 2001; Cabrita et al., 2003; Collins et al., 1998a; 1998b; Liu et al., 2006). Si bien estos trabajos han centrado su atención en la expansión de CMH o células progenitoras inmaduras como producto celular para trasplantes, la experiencia generada aporta una cantidad de información relevante para la transferencia de la metodología desarrollada a estos sistemas de cultivo agitados.

La meta que se persigue en el diseño del bioproceso, mediante la transferencia de la estrategia desarrollada a sistemas de cultivo agitados, es la definición de un sistema de cultivo escalable y reproducible, para la generación de eritrocitos a partir de CMH/CPH. Para dicha implementación, es fundamental conocer los requerimientos del cultivo y entender su funcionamiento con el fin de establecer la mejor estrategia y condiciones para el cultivo (Kirouac and Zandstra, 2008; Nielsen, 1999). La heterogeneidad celular y su carácter altamente transitorio le confiere a estos cultivos un perfil asíncrono, tal como hemos podido comprobar en los estudios de crecimiento celular realizados en los capítulos III y IV. En la fase de expansión, una de las principales limitaciones es la rápida generación de células maduras (diferenciadas) y la consecuente acumulación de factores inhibidores producidos por estas (*Inhibitory Feedback Signaling*) (Kirouac and Zandstra, 2006; Kirouac et al., 2009; Majka et al., 2001). Por tanto, es fundamental atenuar el efecto negativo causado por estos factores a fin de aumentar la capacidad proliferativa. En este sentido, la estrategia operacional más conveniente es la alimentación del cultivo con medio fresco a fin de diluir la concentración celular y

factores endógenos inhibidores producidos por células adultas acumuladas en los cultivos *in vitro*, tal como hemos estudiado en el capítulo III. Esto permite a su vez garantizar un nivel de nutrientes adecuado y ajustar la combinación de citoquinas requeridas en las sucesivas etapas del cultivo.

Un factor a tener en cuenta es el efecto negativo que puede generar la agitación en los cultivos. En los bioreactores de tanque agitado, la agitación da lugar a la transferencia de energía desde el impulsor al medio de cultivo. Esto favorece la difusión de los gases, permite la homogeneidad de la fase líquida y mantiene a las células en suspensión. No obstante, las células pueden sufrir estrés hidrodinámico producto de la agitación mecánica (Collins et al., 1998b; Nielsen, 1999). De hecho, se ha descrito el efecto negativo de la agitación en las fases tempranas de proliferación celular de cultivos eritroides y su impacto en la viabilidad de los cultivos en etapas avanzadas (Boehm et al., 2010; Timmins et al., 2011). Por tanto, queda claro que para la implementación exitosa de los cultivos eritroides en sistemas agitados, varios parámetros críticos deben ser estudiados y ajustados eficientemente con el fin de minimizar efectos negativos en cultivo.

En resumen, el objetivo del presente capítulo se centra transferir la estrategia de cultivo integrada para la generación de eritrocitos *ex vivo* desarrollada en sistemas estáticos de cultivo al cultivo en bioreactores de tanque agitado como plataforma tecnológica de cultivo para la generación a escala de eritrocitos bajo condiciones controladas.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. Transferencia de la estrategia de cultivo desarrollada a bioreactores de tanque agitado

Definida la estrategia de cultivo desarrollada en el capítulo anterior, para la generación de eritrocitos *ex vivo* mediante la expansión y diferenciación en cultivo de células CD34⁺ de SCU, implementada en sistemas de cultivo estáticos, el objetivo del presente capítulo se centra en la transferencia de dicha estrategia a sistemas de cultivo agitados (*STB*), a fin de establecer una plataforma de cultivo que permita el desarrollo y escalado del bioproceso bajo condiciones controladas de cultivo.

Sin considerar la etapa de purificación celular (denominada fase 0 de la estrategia, obtención de células CD34⁺ de SCU), de forma resumida, la metodología de cultivo consta de dos etapas de bioreacción: la fase de expansión y compromiso de CMH/CPH y la fase de expansión y diferenciación terminal de células progenitoras y células precursoras eritropoyéticas. Dicha metodología se basa en una composición diferencial de citoquinas en los medios de cultivo empleados para cada una de las fases y diluciones periódicas del volumen de cultivo; lo que permite atenuar en parte el efecto negativo generado por factores endógenos inhibidores del crecimiento producidos por células adultas acumuladas en los cultivos.

Con el objetivo de transferir dicha estrategia de cultivo a sistemas agitados (*STB*) y evaluar su rendimiento tanto en la fase de expansión como en la etapa de diferenciación, se ha seguido un esquema experimental basado en 3 condiciones de estudio. Tal como se detalla en la **Tabla 5-1**, estas condiciones son: desarrollo de la estrategia integra en sistemas estáticos (*T-flask* 25 cm²) como control. Desarrollo de la primera fase (expansión y compromiso de CMH/CPH) en sistemas de cultivo estáticos y desarrollo

de la segunda fase (diferenciación de CPE) en bioreactor. Y por último, desarrollo de la estrategia integra (fase I y fase II) en bioreactor. Con esta aproximación experimental se pretende evaluar de forma independiente las etapas de expansión y diferenciación en sistemas agitados. Como se ha comentado anteriormente, las CMH/CPH son particularmente sensibles al estrés hidrodinámico, y por tanto, la agitación podría comprometer el cultivo en la fase de expansión. En este sentido, estudios refieren el efecto negativo de la agitación sobre células progenitoras eritroides en la fase de expansión temprana (Timmins et al., 2011). Por este motivo se estudió una estrategia “hibrida” compuesta por una primera fase de expansión en sistemas estáticos y una segunda fase de diferenciación en bioreactor. Para dicho escenario, el cultivo estático se llevó a cabo empleando bolsas de cultivo estériles permeables a gases (MACS[®] GMP, Miltenyi Biotech) a fin de trabajar en sistemas cerrados como alternativa validable en caso de ser necesario su escaldo y transferencia bajo buenas prácticas de manufactura.

Sistemas de cultivo	Estrategia de cultivo
• Estático	Primera y segunda fases de cultivo en sistemas estáticos como control (n=3)
• Estático – Bioreactor	Primera fase de expansión en bolsa de cultivo y segunda fase del cultivo en bioreactor (n=2)
• Bioreactor	Primera y segunda fases del cultivo en bioreactor (n=2)

Tabla 5-1 Detalle de la aproximación realizada para evaluar la adaptación de las distintas fases del cultivo en sistemas agitados (bioreactor). Sistema de cultivo estático control: frasco de cultivo (*T-flask* 25 cm²). Sistema estático y cerrado de cultivo: bolsas de cultivo estériles permeables a gases (volumen 100 – 250 mL) (MACS[®] GMP, Miltenyi Biotech). Sistema de cultivo agitado: bioreactor de tanque agitado miniBio (volumen de operación 50 – 250 mL) (Applikon[®], Delft, Holanda).

Todos los cultivos se inician a partir de células CD34⁺ de SCU a una concentración inicial de 1,0·10⁴ Cél. CD34⁺/mL. El medio de cultivo empleado es el medio IMDM suplementado con hSerB y citoquinas (composición variable en función de la etapa de cultivo) (7.2.1). Los cultivos en sistemas estáticos se mantienen a 37°C, en atmósfera

enriquecida al 5% de CO₂. Con el objetivo de evaluar la monitorización, el control de variables del proceso y optimizar las condiciones de cultivo en los bioreactores empleados (Ver **Figura 5–2 B**), se realizaron numerosos cultivos de corta duración. En base a estos estudios se han establecido las condiciones de agitación (90-100 rpm), temperatura (37°C) y aireación (mezcla de aire y 5% de CO₂ a 0,2 L/min.) necesarias para abordar el estudio y caracterización de la estrategia de cultivo en estos sistemas. La estrategia de adición ha sido idéntica para todo los casos de estudio, y tal como se ha descrito en el capítulo IV (4.2.3). Periódicamente, se toma muestra de los cultivos para el seguimiento de la densidad y viabilidad celular mediante citometría de flujo. A partir de los valores obtenidos, se calculan los factores de expansión y el porcentaje de células viables en los cultivos. Complementariamente, se realiza una caracterización fenotípica de los cultivos con el objetivo de determinar si el cultivo bajo condiciones agitadas tiene algún impacto en la diferenciación y maduración terminal de los cultivos. Por último, se determina el porcentaje de células enucleadas al final de cultivo mediante citometría de flujo.

5.2.1.1 Expansión de cultivos eritroides en sistemas agitados (STB).

Tal como se puede observar en la **Figura 5–1**, los resultados obtenidos muestran que todos los sistemas de cultivo empleados soportan el desarrollo de la estrategia de cultivo, permitiendo la expansión de CMH/CPH durante la primera fase del cultivo, seguido de una expansión más moderada en la etapa de diferenciación. Estas observaciones generales son coherentes con la evolución estudiada del cultivo, caracterizada por una fase temprana de elevada proliferación (hasta los 8-10 días de cultivo), seguida por una etapa de expansión moderada en la fase de diferenciación, y

finalmente una expansión casi nula en la fase de maduración terminal como producto del avance del programa de diferenciación eritropoyetico.

Mas específicamente, los cultivos desarrollados en sistemas estáticos como control, logran factores de expansión de $7,27 \cdot 10^4$ veces, similar a los valores de expansión observados en el capítulo IV. Sorpresivamente, los cultivos estáticos llevados a cabo en bolsas de cultivo estériles permeables a gases (ver **Figura 5–1 A**) mostraron un rendimiento inferior en la fase de expansión temprana ($2,1 \cdot 10^3$ veces) en comparación a los observados en frascos de cultivo *T-flask*. Posiblemente, esto se deba a una limitación por transporte de oxígeno deficiente, justamente en la etapa donde se registra la mayor tasa de crecimiento, y por consiguiente, mayor requerimiento de nutrientes.

Sistema de cultivo	Tiempo de cultivo 14 días		Tiempo de cultivo 21 días	
	EpT	Viabilidad	EpT	Viabilidad
Estático	$1,32 \cdot 10^4$	83 %	$7,27 \cdot 10^4$	67,1%
Estático – Bioreactor	$2,10 \cdot 10^3$	76 %	$4,20 \cdot 10^3$	67,7%
Bioreactor	$1,56 \cdot 10^4$	85 %	$1,99 \cdot 10^4$	69,6%

Tabla 5-2 Detalle de los factores de expansión, viabilidad determinados en los sistemas de cultivo estudiados a 14 y 21 días de cultivo.

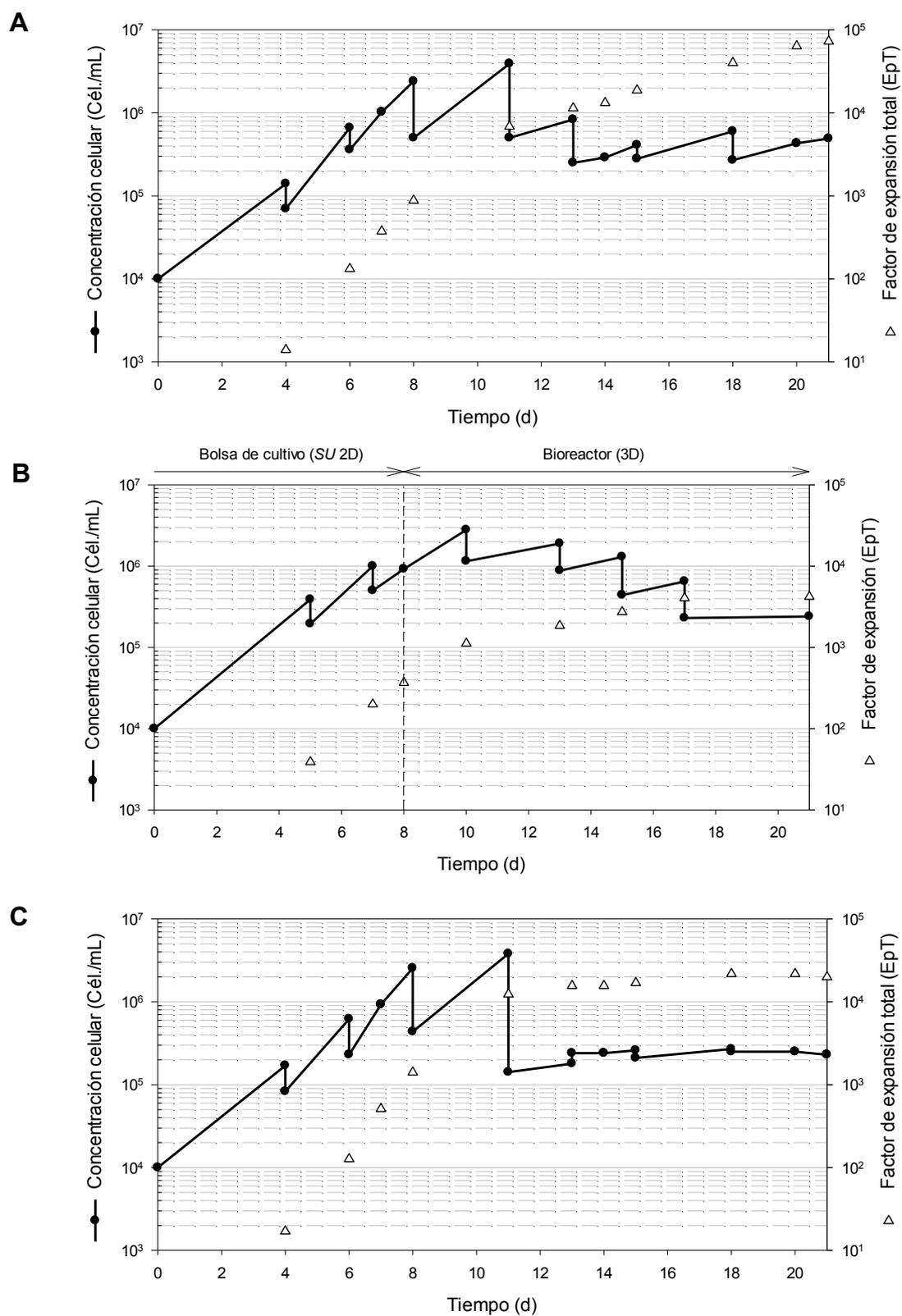


Figura 5-1 Perfil de la concentración celular y factor de expansión correspondientes a los cultivos durante los 21 días de cultivo empleando la estrategia desarrollada de expansión y diferenciación en los distintos sistemas de cultivo estudiados. A: Cultivo en sistema estático (*T-flask* 25 cm²). B: Cultivo de expansión en bolsa *SU* (fase I) y expansión y diferenciación en bioreactor (fase II). C: Cultivo en bioreactor.

En referencia a los cultivos en bioreactor, tal como se puede observar en la **Figura 5–1 B y C**, no se observan diferencias significativas en cuanto a la evolución del perfil de concentración celular, tanto en la fase de expansión, así como en la etapa de diferenciación. En referencia a los factores de expansión logrados, se ha observado una mayor capacidad en los sistemas estáticos control ($7,27 \cdot 10^4$) respecto al cultivo en bioreactor ($1,99 \cdot 10^4$), no obstante dicha diferencia puede atribuirse a diferencias intrínsecas de la fuente celular, como hemos podido comprobar en el capítulo IV (Csaszar et al., 2013).

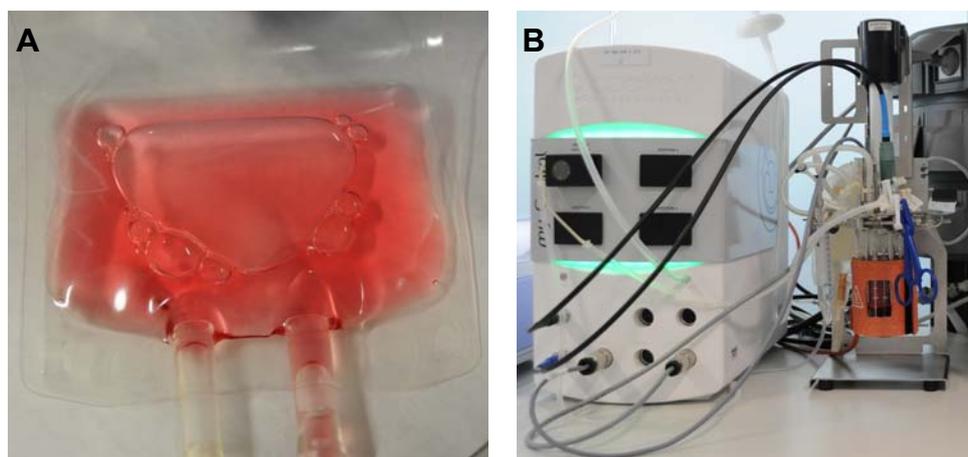


Figura 5–2 Imágenes tomadas de los sistemas empleados para la implementación de la estrategia de cultivo a sistemas agitados (STR). A) Bolsa de cultivo permeable a gases MACS GMP (Milenyi Biotech). B) Bioreactor de tanque agitado miniBio (Applikon).

Notoriamente, en todos los sistemas estudiados, luego de la fase temprana de proliferación y compromiso de CMH/CPH, en donde se registra la mayor tasa de expansión celular y una viabilidad del 98,2 % para el cultivo en bioreactor, y de un 94,1 % para el cultivo estático control, se observa una disminución significativa de la viabilidad celular, independientemente del sistema empleado (69,6 % para el cultivo en bioreactor y 67,1 % para el cultivo control al final del cultivo), en la etapa de diferenciación posterior. Curiosamente, estas observaciones fueron destacadas también

por otros grupos de investigación (Boehm et al., 2010; Daud et al., 2016; Timmins et al., 2011). No obstante, no se han dilucidado las causas relacionadas a dicho fenómeno. Algunos autores han observado que el aumento de la concentración celular en fase avanzada de diferenciación mitiga dicha observación, y plantean la hipótesis que esto se deba a interacciones mediadas célula-célula (Boehm et al., 2009). Pese a esta observación, los resultados obtenidos permiten concluir que la agitación de los cultivos no afecta la viabilidad celular de manera significativa respecto a los cultivos en estático.

5.2.1.2 Caracterización de cultivos eritroides en sistemas agitados

Con el objetivo de determinar si el efecto de la agitación en cultivo altera el proceso de diferenciación eritropoyético, se analizan por citometría de flujo muestras de los cultivos a distintos intervalos de tiempo mediante la combinación de marcadores característicos CD36 y CD45. Tal como podemos observar en la **Figura 5-3**, la evolución de los marcadores estudiados es muy similar en las tres condiciones, no observándose diferencias significativas en la evolución de los marcadores estudiados.

En detalle, el estudio del perfil inmunofenotípico a diferente intervalos de tiempo realizado en los distintos cultivos siguiendo la metodología desarrollada, muestra que el perfil de evolución es similar y consistente con los resultados ya antes observados en el capítulo IV. Como podemos observar en la **Figura 5-4**, transcurrido los primeros 7 días de cultivo, entre un 50 % y un 62 % de las células en cultivo expresan fenotipo característico del primer estadio madurativo ($CD45^+$ / $CD36^+$), confirmando el compromiso con el linaje eritroide de las CMH/CPH en cultivo. En la etapa final de los cultivos, entre un 90 % y un 95 % de las células en los distintos sistemas de cultivo

estudiados se corresponden con un fenotipo $CD45^- CD36^{+/-}$ característico de células eritroides maduras.

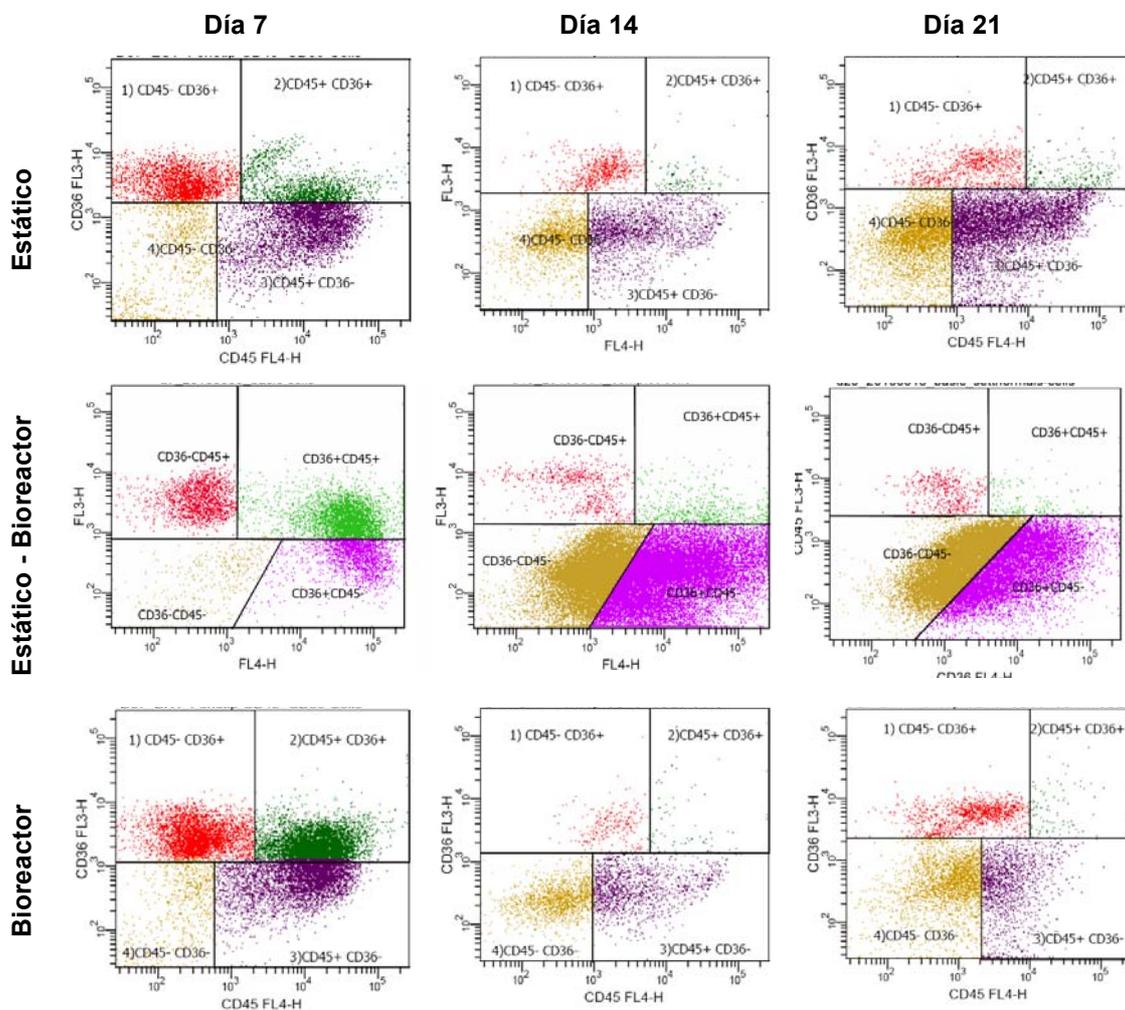


Figura 5–3 Comparación del análisis fenotípico según la distribución de los marcadores CD36 (ordenadas) y CD45 (abscisas) realizado en los sistemas de cultivos estudiados a distintos intervalos de tiempo. Las adquisiciones citométricas se realizan con el equipo FACSCalibur (BD Biosciences). Para el análisis de los resultados se emplea el software CellQuest Pro (BD Biosciences).

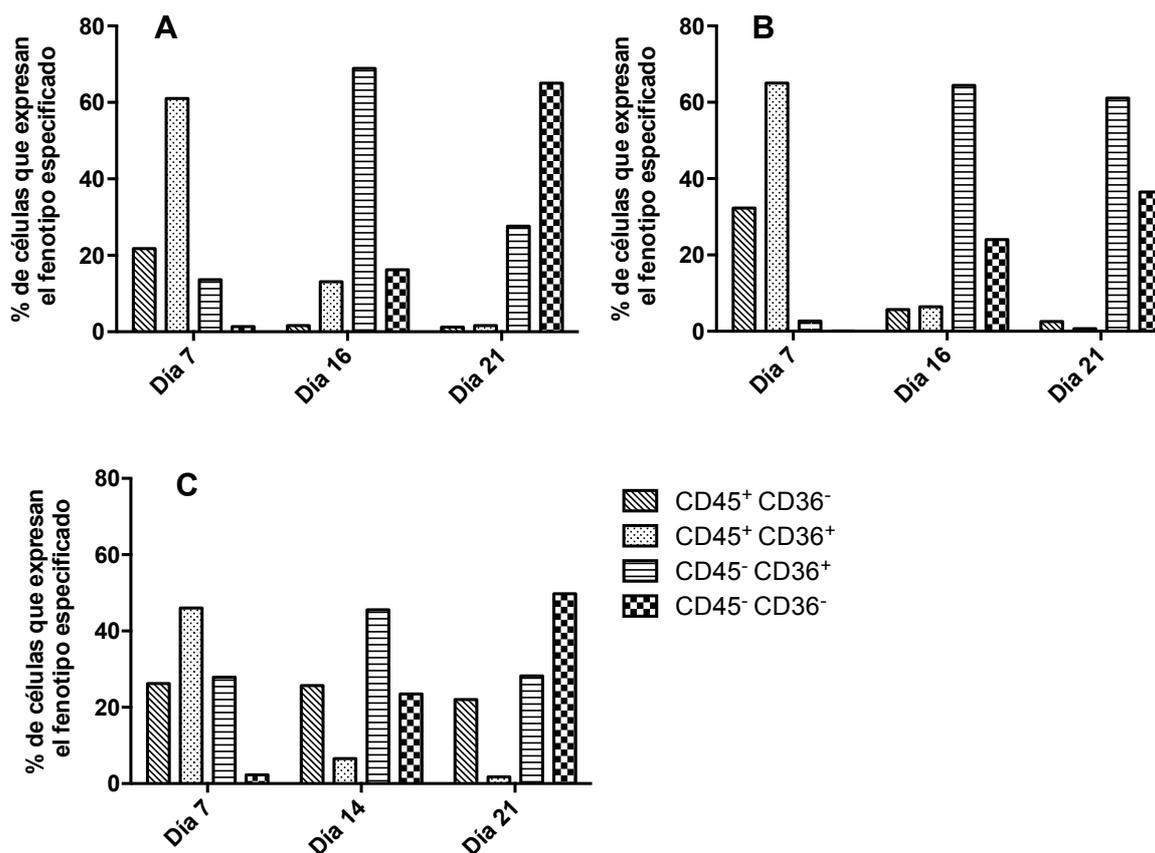


Figura 5-4 Representación de los porcentajes de células en los distintos estados madurativos según el perfil de expresión de los marcadores CD45 y CD36 a diferentes intervalos de tiempo de cultivos de expansión y diferenciación. A: Cultivo en sistema estático (*T-flask* 25 cm²). B: Cultivo de expansión en bolsa *SU* (fase I) y expansión y diferenciación en bioreactor (fase II). C: Cultivo en bioreactor.

El estudio de la coexpresión de los marcadores característicos de células eritroides maduras, el receptor de transferrina (CD71) y glicoforina A (CD235a), nos permite un análisis más detallado del perfil fenotípico de las poblaciones más maduras (CD45⁻ CD36^{+/-}) obtenidas al final de cultivo en los distintos sistemas estudiados. Tal como podemos observar en la **Figura 5-5**, el porcentaje de las poblaciones que expresan el fenotipo característico de los reticulocitos (CD45⁻ CD36⁻ CD71⁺ CD235a⁺) es similar tanto para el cultivo en sistema estático (85,9 %), así como para el cultivo en bioreactor (90,2 %). Por tanto, estos resultados parecen indicar que bajo condiciones agitadas de cultivo, la estrategia desarrollada no se ve afectada, obteniéndose como resultado un perfil fenotípico similar a los cultivos en sistemas estáticos.

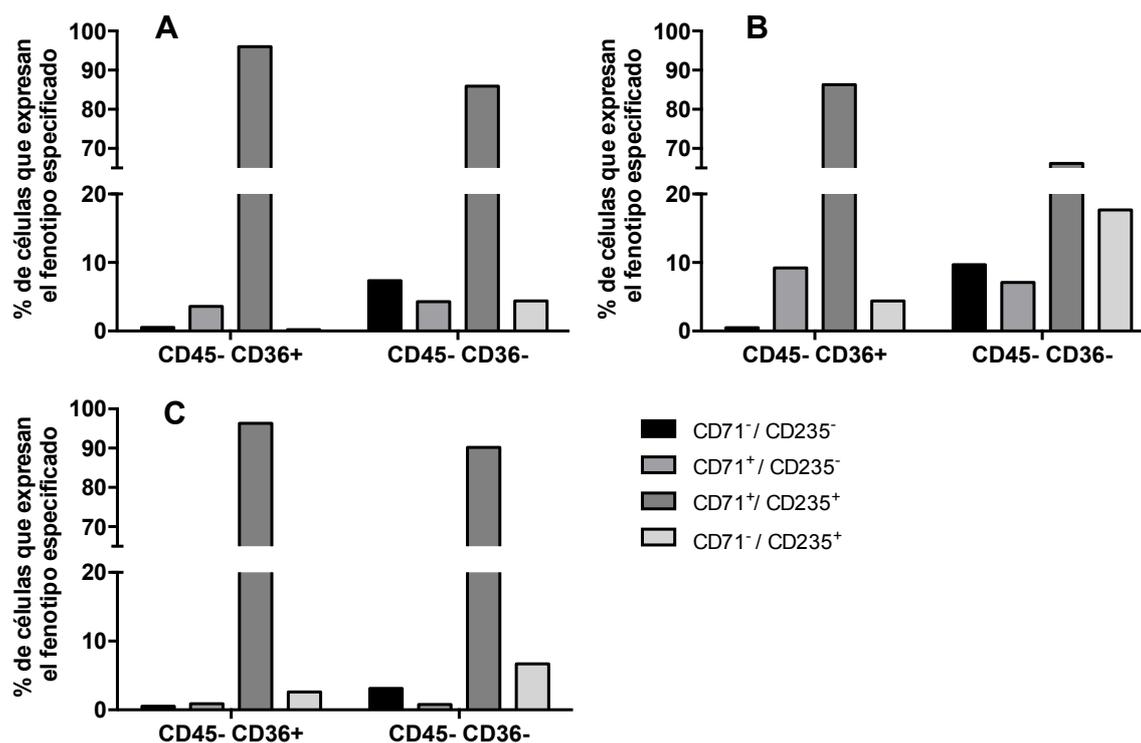


Figura 5–5 Representación del porcentaje de células positivas según el perfil de expresión de los marcadores CD71 y CD235a de las poblaciones CD45⁻/CD36⁺ (reticulocitos) y CD45⁻/CD36⁻ (eritrocitos) a día 21 de los cultivos. A: Cultivo en sistema estático (*T-flask* 25 cm²). B: Cultivo de expansión en bolsa *SU* (fase I) y expansión y diferenciación en bioreactor (fase II). C: Cultivo en bioreactor.

Una vez determinado el perfil fenotípico de las células en los distintos sistemas de cultivo estudiados, resta analizar el porcentaje de células enucleadas generadas. La determinación se realiza por citometría de flujo mediante tinción del DNA de las células con el reactivo Retic-COUNT™ (BD Biosciences) (7.3.5). La **Figura 5–6** resume los valores porcentuales de células enucleadas detectadas en los distintos sistemas de cultivo a 21 días de cultivo.

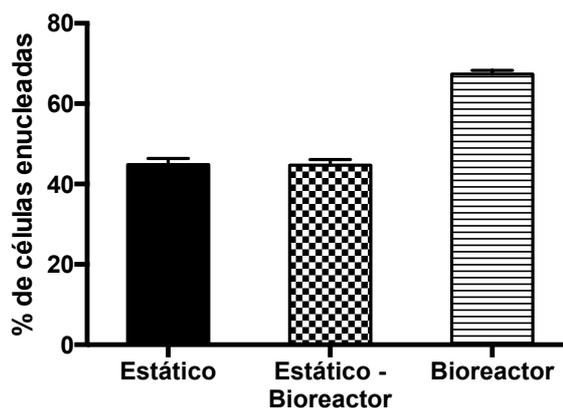


Figura 5-6 Determinación del porcentaje de células enucleadas a 21 días de cultivo en los distintos sistemas de cultivo estudiados.

Los resultados obtenidos muestran un mayor porcentaje de células enucleadas (67,5 %) en los cultivos bajo condiciones de agitación respecto a los cultivos estáticos (44,2 %). Esto podría significar que de alguna forma, las células en cultivos agitados tienden a madurar con mayor velocidad, no obstante cabe destacar que dichas diferencias no han sido observadas en los perfiles fenotípicos estudiados anteriormente. Si podría darse que, la agitación del medio favorezca al proceso puntual de enucleación, permitiendo desprender la unión de los núcleos extruidos de los ertrioblastos (Keerthivasan et al., 2011; Lu et al., 2008). No obstante, es importante recordar que dichas diferencias, también pueden ser atribuidas a diferencias intrínsecas de la fuente celular, como ya hemos observado anteriormente. En este sentido, se deberían realizar estudios más en detalle a fin de caracterizar el impacto de la agitación en las etapas avanzadas de diferenciación.

Sistema de cultivo	Tiempo de cultivo 21 días		
	EpT	Viabilidad	Enucleación
Estático (2D)	$7,27 \cdot 10^4$	67,1%	44,2 %
Estático – Bioreactor	$4,20 \cdot 10^3$	67,7%	65,3 %
Bioreactor	$1,99 \cdot 10^4$	69,6%	67,5 %

Tabla 5-3 Detalle de los factores de expansión, viabilidad y porcentaje de enucleación logrados en cada uno de los sistemas de cultivo estudiados a 21 días de cultivo.

5.2.1.3 Caracterización del perfil metabólico de cultivo eritroides

La proliferación y diferenciación de células progenitoras, en general, se asocia a un aumento en los requerimientos metabólicos del cultivo (Beutler et al., 2005; Oburoglu et al., 2014). Como consecuencia, las concentraciones de nutrientes y metabolitos pueden sufrir variaciones que afecten el destino de las células en cultivo. Por tanto, y con el objetivo de evaluar el perfil metabólico celular, en sistemas estáticos de cultivo y cultivo en bioreactor, muestras de sobrenadante fueron recogidas en distintos puntos temporales y analizadas para determinar la concentración de glucosa como principal fuente de carbono y energía, y lactato como principal subproducto del metabolismo celular.

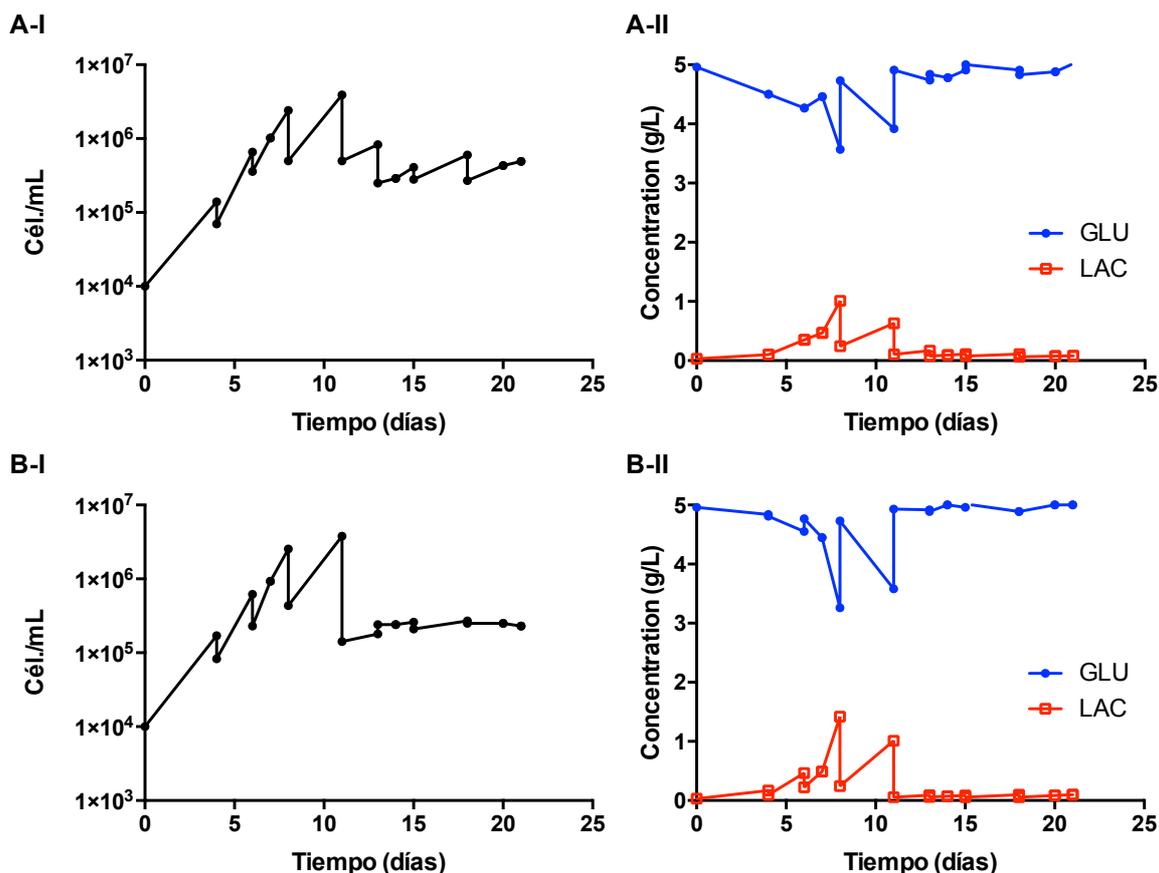


Figura 5–7 Representación de la evolución de la concentración de células totales (Cél./mL) y concentración de glucosa (GLU) y lactato (LAC) en sistemas de cultivo estáticos (A) y para el cultivo en bioreactor (B).

El perfil de concentración de ambos componentes, glucosa y lactato, junto a la evolución de la concentración celular en cultivos estáticos y cultivo en bioreactor se pueden apreciar en la **Figura 5–7**. Se puede observar que los perfiles de concentración de ambos metabolitos siguieron un comportamiento esperado, tanto en los sistemas estáticos, como en el cultivo en bioreactor. A mayor concentración celular se observa un mayor consumo de glucosa y la consecuente acumulación de lactato como subproducto del metabolismo celular. No obstante, la concentración de glucosa en ningún de los cultivos llega a ser limitante, siendo el mínimo registrado de 3,6 g/L para el cultivo estático y 3,26 g/L para el cultivo en bioreactor. En cuanto a la acumulación de lactato en el medio, que ha ciertas concentraciones puede ejercer un efecto inhibitorio sobre el

crecimiento celular, se ha registrado un valor máximo de 1,01 g/L (11,22 mM) para el cultivo estático y 1,42 g/L (13,77 mM) en el bioreactor. En base a observaciones realizadas por otros grupos de investigación, la inhibición de células hematopoyéticas se observa a concentraciones de lactato superiores a 20 mM en cultivo (Beutler et al., 2005; Patel et al., 2000), por tanto, las concentraciones observadas en los cultivos no deberían influir negativamente al crecimiento celular. Otra observación que se desprende del análisis, son los cambios substanciales en la actividad metabólica de las células a lo largo del proceso eritropoyético. Particularmente, el mayor consumo de glucosa y producción de lactato tiene lugar en la primera fase del cultivo, durante la etapa temprana de compromiso con el linaje eritroide, entre los 6 y 8 días en cultivo, y coincide con el periodo de mayor proliferación y mayor concentración celular registrados ($2,5 \cdot 10^6$ Cél./mL en el cultivo estático y $2,8 \cdot 10^6$ en el bioreactor). Estas observaciones, también destacadas en otros estudios publicados (Ceredig et al., 2009; Daud et al., 2016; Dorshkind, 2010; Ratcliffe et al., 2012), permiten suponer que las células en cultivo a través de las sucesivas etapas de compromiso, diferenciación y maduración; modifican su perfil metabólico. Si bien aun no se ha dilucidado cómo y en que grado contribuyen los parámetros metabólicos clave a la especificación del linaje y compromiso de CMH/CPH, recientemente se ha demostrado que, bajo condiciones de estrés, el compromiso de las CMH/CPH con el linaje eritroide dependen del metabolismo de la glucosa y glutamina principalmente para la biosíntesis de nucleótidos que regulan el compromiso con el linaje de las CMH/CPH bajo condiciones de estrés metabólico (Brown and Ceredig, 2009; Oburoglu et al., 2014).

Por tanto, y en base a los datos del perfil metabólico antes comentados, podemos concluir que, mediante la estrategia de alimentación discontinua implementada, tanto en soportes de cultivo estáticos, así como en bioreactores, además de atenuar el bloqueo de

la capacidad duplicativa de las CMH/CPH permitiendo una mayor proliferación celular, mediante la dilución de factores inhibidores generados por células maduras en cultivo, la concentración de glucosa, principal fuente de carbono y energía en cultivo, así como la concentración de lactato, principal subproducto del metabolismo celular, se mantienen en niveles no críticos para el cultivo. No obstante, es fundamental una mejora comprensión de los procesos metabólicos implicados en las distintas etapas del cultivo. Un conocimiento más profundo de los requerimientos y mecanismos metabólicos permitirían optimizar la formulación del medio de cultivo y la estrategia de adición, maximizando el rendimiento de los componentes y permitiendo ajustar las necesidades temporales en cultivo (Altamirano et al., 2013; Beutler et al., 2005; Chen et al., 2001; Dorshkind, 2010).

Finalmente, los resultados obtenidos y analizados en su conjunto, permiten concluir que la transferencia de la metodología de cultivo a sistemas agitados, monitorizados y controlados de cultivo es viable. Así mismo, no se ha observado un efecto negativo, producto de la agitación, sobre la viabilidad celular respecto a cultivos control. En cuanto a la evolución del fenotipo en la etapa de diferenciación, a partir de la comparación con la evolución en sistemas estáticos, se puede concluir que el hecho de cultivar las células bajo condiciones de agitación no altera el perfil fenotípico de las células en cultivo. Por último, los resultados del estudio del perfil metabólico no evidencian limitación del cultivo por acumulación de lactato o limitación de glucosa en ninguna de las fases de desarrollo.

No obstante, pese a haber logrado resultados muy positivos, conviene destacar la necesidad de profundizar los estudios de optimización a fin de mejorar los rendimientos del cultivo. En este sentido, la plataforma de cultivo desarrollada puede aportar datos útiles para el análisis de los parámetros críticos de cultivo bajo condiciones controladas.

5.3. DISCUSIÓN

En los últimos años se han hecho progresos considerables entorno a la expansión y diferenciación de células eritroides con el objetivo de generar células enucleadas *ex vivo* para fines terapéuticos (Migliaccio et al., 2012b; Wickrema and Kee, 2009). No obstante, hasta la fecha, la mayoría de los métodos publicados para la generación de eritrocitos a partir de diversas fuentes celulares emplean sistemas estáticos de cultivo a pequeña escala, lo que imposibilita la generación de un número de células clínicamente relevantes para su correcta evaluación funcional (Marshak et al., 2001; Rousseau et al., 2013).

Estas observaciones ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar sistemas de cultivo mas eficientes y escalables que permitan el desarrollo de bioprocesos para la producción, de forma consistente y reproducibles, cantidades significativas de producto celular. Es por este motivo que en el presente capítulo se ha estudiado la transferencia de la estrategia desarrollada en sistemas estáticos de cultivo a bioreactores de tanque agitados.

Con este objetivo en claro, en primer lugar se han llevado a cabo una serie de estudios a fin de optimizar las condiciones de cultivo en los bioreactores. Los experimentos realizados han permitido definir condiciones de agitación (90-100 rpm), temperatura (37°C) y aireación (mezcla de aire y 5% de CO₂ a 0,2 L/min.) que soportan la expansión y diferenciación de CMH/CPH, minimizando el estrés hidrodinámico de las células en suspensión (Cabrita et al., 2003; Wickrema and Kee, 2009).

Una vez definidas las condiciones de operación en los bioreactores, se han llevado a cabo una serie de cultivos en estos sistemas empleando la metodología desarrollada definida en el capítulo IV. Los resultados obtenidos permiten concluir que, mediante la

metodología de cultivo desarrollada, es factible la expansión y diferenciación de CMH/CPH en sistemas agitados de cultivo. No obstante, bajo las condiciones de estudio, los factores de expansión observados en cultivos agitados resultaron ser levemente inferiores a los observados en sistemas estáticos. En los estudios comparativos realizados, el factor de expansión observado para el cultivo en biorreactor fue de $1,99 \cdot 10^4$ veces, mientras que los cultivos control realizados en sistemas estáticos se observaron factores de expansión de $7,27 \cdot 10^4$ veces.

A continuación, y con el objetivo de comprobar que, bajo condiciones agitadas de cultivo, el programa de diferenciación eritropoyético no se ve afectada (de forma positiva o negativa), se ha realizado una caracterización fenotípica de los cultivos a distintos intervalos de tiempo. Los resultados obtenidos del perfil inmunofenotípico muestran una evolución similar y consistente con los resultados observados en cultivos estáticos, confirmándose el compromiso temprano con el linaje eritroide, luego de la primera etapa de expansión (62,0 % CD45⁺ CD36⁺). En la etapa final de cultivo, un 90,2 % de las células expresaban el fenotípico característico de células eritroides maduras (CD45⁻ CD36⁻ CD71⁺ CD235a⁺).

En cuanto al porcentaje de células enucleadas obtenidas al final de los cultivos, los resultados obtenidos muestran un mayor porcentaje de células enucleadas (67,5 %) en los cultivos bajo condiciones de agitación respecto a los cultivos estáticos (44,2 %). No observándose diferencias significativas en la evolución del fenotipo respecto a los cultivos estáticos, se podría suponer que en cierta forma, la agitación favorece el proceso de enucleación. En este sentido, estudios centrados en el proceso de enucleación *ex vivo* (Thomson and Lotze, 2003; Yoshida et al., 2005) han observado que luego del proceso de extrusión nuclear, el núcleo continúa ligado al eritroblasto por una extensión de la membrana, y que una leve agitación es capaz de romper dichas

uniones. No obstante, cabría realizar estudios más específicos al respecto a fin de corroborar si efectivamente la agitación favorece el proceso de enucleación celular en la etapa terminal de diferenciación.

Como ya hemos mencionado anteriormente, en los últimos años se han publicado un número considerable de métodos para la generación de eritrocitos a partir de diversas fuentes celulares (Migliaccio et al., 2012b; Singh, 2014; Thomson and Lotze, 2003). No obstante, en relación al uso de bioreactores como plataforma tecnológica para el cultivo de células eritroides, solo un número limitado de publicaciones se han publicado hasta la fecha (Housler et al., 2012; Ratcliffe et al., 2012; Timmins et al., 2011). En 2011, el grupo de investigación del Dr. Timmins publicó resultados de una estrategia en dos etapas de cultivo, empleando para la segunda etapa un bioreactor no convencional *single use*, tipo *wave bioreactor* de 1 litro. En dicho estudio, la estrategia implementada básicamente consistía de una primera fase de expansión en sistemas estáticos convencionales de CMH/CPH por un periodo de 8 días, seguida de una segunda etapa de expansión y diferenciación en bioreactor. Dicha estrategia reportó rendimientos similares a los observados en cultivos estáticos, lográndose factores de expansión entorno a 10^7 veces a 21 días de cultivo y una tasa de enucleación entorno al 90%. No obstante, los autores mantuvieron intencionalmente concentraciones celulares muy bajas durante el cultivo en bioreactor ($1 \cdot 10^5$ Cél./mL). El trabajo publicado por Ratcliffe y colaboradores, presentan resultados de expansión y diferenciación de células eritroides empleando un sistema de micro-bioreactores controlados de 15 mL de volumen (AMBR, Tap biosystems) a partir de células progenitoras pre-expandidas en sistemas estáticos. En dicho estudio logran concentraciones celulares entorno a los $10 \cdot 10^6$ Cél./mL, no obstante los factores de expansión logrados son muy bajos (6 duplicaciones celulares en 10 días de cultivo), y no aportan información respecto a la maduración

celular. Por último, el trabajo publicado por Housler y colaboradores, presenta un bioreactor, del tipo cartucho de fibra hueca customizado (*custom-made hollow-fiber bioreactor*), de 8 mL de volumen en donde desarrollan concentraciones celulares de hasta $2 \cdot 10^8$ Cél./mL, no obstante la caracterización celular no fue abordada y no queda claro si dicho sistema es escalable. En este sentido, a diferencia de los trabajos antes discutidos, la estrategia aquí desarrollada permite la expansión temprana de CMH/CPH bajo condiciones controladas de cultivo en sistemas agitados, observándose una mejora en los factores de expansión en dicha etapa. No obstante, pese a los avances tecnológicos realizados, todavía existen retos substanciales por superar para la generación a escala de dosis celulares significativas.

En resumen, se ha logrado transferir la estrategia de cultivo a bioreactores de tanque agitado, bajo condiciones monitorizadas y controladas de proceso. Los rendimientos observados, en términos de expansión total, han sido inferiores a los observados en sistemas estáticos control, no obstante el grado de maduración y porcentaje de enucleación, bajo condiciones agitadas, ha sido similar a los cultivos control.

CAPÍTULO 6

Conclusiones generales y trabajo a futuro

6. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

6.1. CONCLUSIONES

El trabajo realizado en el presente proyecto de tesis doctoral ha permitido desarrollar una metodología de cultivo para la generación de eritrocitos *ex vivo* a partir de la expansión y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical. Para dicho fin, en primer lugar se ha definido una estrategia de cultivo que permite la expansión y compromiso con el linaje eritroide de células progenitoras hematopoyéticas. A continuación, se han establecido condiciones de cultivo que soportan la diferenciación terminal y enucleación de las células precursoras eritroides en cultivo. De forma paralela, se han caracterizado funcionalmente las distintas poblaciones celulares, así como el producto celular generado, mediante técnicas *in vitro*. Por último, se ha transferido la metodología desarrollada a bioreactores de tanque agitado como plataforma tecnológica para la generación a escala, bajo condiciones monitorizadas y controladas de cultivo.

En base a los resultados obtenidos, las conclusiones que pueden extraerse del presente trabajo se listan a continuación:

- I. La estrategia de expansión desarrollada, basada en un régimen de diluciones seriadas, permite la proliferación de forma extensiva y reproducible de células progenitoras comprometidas con el linaje eritroide.
- II. La combinación diferencial de citoquinas y glucocorticoides empleados permite la expansión y especialización selectiva de los progenitores hematopoyéticos hacia el linaje eritroide, así como la diferenciación terminal de células precursoras eritroides en cultivo.

- III. El producto celular resultante, célula enucleadas eritroides, presentan características morfológicas semejantes a las células nativas homologas. Estas expresan principalmente hemoglobina fetal (61,5%) y muestran una elevada capacidad de captación de oxígeno (%sO₂ de 99,2 ± 2,88%).
- IV. La implementación de birreactores de tanque agitado como sistema de cultivo controlados y escalables, permite la expansión de células CD34⁺ de SCU y diferenciación terminal de células precursoras eritroides con rendimientos similares a los observados en sistemas estáticos de cultivo.

6.2. TRABAJO A FUTURO

El trabajo realizado ha permitido sentar las bases para la generación de eritrocitos *ex vivo* a partir de células progenitoras hematopoyéticas, empleando como sistemas de cultivo bioreactores de tanque agitados. Pese a los buenos resultados obtenidos, la generación de dosis celulares clínicamente relevantes para su correcta evaluación funcional requiere todavía de mejoras substanciales en los rendimientos del procesos. En este sentido, el sistema de cultivo desarrollado como plataforma de cultivo avanzada, permitirá la optimización de variables críticas del proceso bajo condiciones controladas y reproducibles. Paralelamente, a fin de cumplimentar los requerimientos regulatorios entorno a la fabricación de productos de terapia celular avanzada, será necesario la sustitución del suero empleado en las formulaciones de los medios de cultivo, y de ser posible, definir un medio libre de componentes de origen animal, libre de proteínas y químicamente definido. Logrados estos requerimientos, y definido un proceso bajo buenas prácticas de manufactura, será posible la generación de dosis clínicas para su correcta evaluación funcional.

CAPÍTULO 7

Materiales y métodos

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención de progenitores hematopoyéticos en SCU fresca

La purificación de células progenitoras presentes en la sangre de cordón umbilical requiere de dos etapas de separación. Primero, una concentración de células mononucleares (CMN) mediante centrifugación discontinua por gradiente de densidad, seguida de una separación magnética mediante selección por inmunofluorescencia de la población CD34⁺.

7.1.1. Concentración de CMN por centrifugación en gradiente de densidad

La diferencia de densidad celular es el principio de separación de la técnica. Los granulocitos y eritrocitos tienen una densidad mayor que las células mononucleares y por esto sedimentan a través de la solución durante la centrifugación. Las células con menor densidad, incluyendo linfocitos, células progenitoras, plaquetas y monocitos son retenidas en la interfase generada entre el plasma y la solución.

Previo a la centrifugación se debe estimar el volumen de la unidad de SCU (Banc de Sang i Teixits, Barcelona) determinando el peso y empleando un valor medio de densidad para la sangre (1,06 g/mL). Luego se debe diluir ésta con PBS (Life Technologies, CA, Estados Unidos) con una relación 3:1 aproximadamente.

El medio empleado para el gradiente de densidad es Lymphoprep™ (densidad 1,077 g/mL, Axis-Shield, Oslo, Noruega). En un tubo de fondo cónico de 50 mL se añaden 15 mL de Lymphoprep™ y a continuación se añaden 35 mL de la sangre previamente diluida, dejándola decantar suavemente sobre la interfase, evitando que la sangre se mezcle con el Lymphoprep™ (sistema bifásico). Luego, se centrifugan los tubos

cónicos a 340 g durante 55 minutos, a 20°C y sin freno al finalizar el ciclo. Una vez finalizada el ciclo de centrifugación se deben recuperar las células retenidas en la interface plasma-Lymphoprep. La fracción recuperada se transfiere a otro tubo cónico de 50 mL de capacidad y se le realizan dos lavados consecutivos con PBS y ciclos de centrifugación de 10 minutos a 340 g y 20°C. Por último, se resuspende el pellet en 10 mL de PBS y se toma una muestra de 100 µL de la fracción y se realiza un marcaje y cuantificación de células CD34⁺ y células nucleadas totales por citometría de flujo.

7.1.2. Separación magnética mediante selección positiva

Las células CD34⁺ son marcadas con anticuerpo CD34 (QBEND10) conjugado a micropartículas superparamagnéticas. Luego esta suspensión es cargada en una columna y se hace circular la solución a través de la columna sometida a un campo magnético. Las células marcadas magnéticamente son retenidas en la columna y las células no marcadas eluyen a través de esta. Una vez retirada la columna del campo magnético, y eluyendo las células retenidas se obtiene la fracción positiva de células CD34.

La CMN obtenidas en la etapa previa de concentración y cuantificadas, son nuevamente centrifugadas 10 minutos a 340 g y 20°C y el pellet se resuspende en 300 µL de PBS por cada $1 \cdot 10^8$ células nucleadas. Luego se añaden 100 µL de la solución de bloqueo FcR (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) por cada $1 \cdot 10^8$ células nucleadas y se incuban las células durante 5 minutos. Seguidamente, se añaden 100 µL de la solución coloidal CD34 *MicroBeads* (Miltenyi Biotec) por cada $1 \cdot 10^8$ células nucleadas. Se debe incubar las células durante 30 minutos a 2-8 °C en agitación suave. Finalizado el tiempo de incubación se diluye el volumen añadiendo 10 mL de PBS y se centrifugan las células (10 minutos a 340 g y 20°C) para eliminar interacciones inespecíficas. Luego

el *pellet* es resuspendido en 500 μL de PBS por cada $1 \cdot 10^8$ células nucleadas. Este volumen es cargado en una columna de separación MACS LS (Miltenyi Biotec) previamente hidratada con PBS y emplazada en el soporte magnético, de manera que las células no marcadas por el anticuerpo eluyan por la columna y queden retenidas las células marcadas con el anticuerpo monoclonal conjugado a las partículas superparamagnéticas. Seguido, se realizan una serie de lavados con PBS para asegurar la eliminación de células no marcadas. Finalmente, la fracción positiva es eluida retirando el campo magnético y haciendo pasar 5 mL de PBS a través de la columna.

7.1.3. Cálculo del porcentaje de recuperación y pureza de células CD34⁺

Se toma una muestra de 100 μL de la fracción y se realiza un marcaje y cuantificación de células CD34⁺ y células nucleadas totales por citometría de flujo.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se aplica la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Células CD34}^+_{\text{totales, final}}}{\text{Células CD34}^+_{\text{totales, inicial}}} \cdot 100$$

El número de células CD34⁺ totales final corresponde al valor determinado post-separación magnética, y el valor inicial corresponde al valor determinado luego de la concentración por centrifugación en gradiente de densidad.

La pureza de las células CD34⁺ se determina según la ecuación:

$$\text{Pureza} = P_t = \frac{\text{Células CD34}^+_{\text{totales}}}{\text{Células CD34}^+_{\text{totales}} + \text{Células nucleadas}_{\text{totales}}}$$

7.2. Cultivo celular

7.2.1. Formulación de medios de cultivo

7.2.1.1 Medios basales

Durante el desarrollo del trabajo se han empleado dos medios basales. El medio libre de suero HP01[®] (Macopharma, Mouvauz, Francia) y libre de componentes de origen animal, formulado con albúmina humana de grado clínico. Y finalmente, el medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Gibco[®] LifeTechnology – ThermoFisher Scientific, NY, Estados Unidos). Este medio es una modificación del medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), incluye selenio, así como aminoácidos y vitaminas adicionales. El medio esta formulado con 3,024 g/L de bicarbonato de sodio.

7.2.1.2 Suplementación de medios para cultivos eritroides

La estrategia de cultivo ha sido definida empleando el medio IMDM. Los suplementos empleados varían según la etapa del proceso. En la etapa de expansión, el medio es suplementado con suero adulto humano B a una concentración final de 5% v/v (Banc de Sang i Teixits, Barcelona), glutamina 2 mM (Gibco[®] LifeTechnology – ThermoFisher Scientific, NY, Estados Unidos), transferrina humana 330 µg/mL (Sigma Aldrich, MO, Estados Unidos), Insulina 10 µg/mL (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca), hidrocortisona $1 \cdot 10^{-6}$ M (Takeda, Osaca, Japon) y la siguiente combinación de citoquinas: EPO a una concentración de 3 UI/mL (Aranesp[®], Amgen, Thousand Oaks, Estados Unidos), SCF a una concentración de 100 UI/mL y IL-3 a una concentración de 5 ng/mL (ambas GellGenix, Freiburg, Alemania).

El medio básico empleado en la etapa de diferenciación es suplementado con suero adulto humano B a una concentración final de 5% v/v (Banc de Sang i Teixits,

Barcelona), glutamina 2 mM (Gibco® LifeTechnology – ThermoFisher Scientific, NY, Estados Unidos), transferrina humana 330 µg/mL (Sigma Aldrich, MO, Estados Unidos), Insulina 10 µg/mL (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) y la siguiente combinación de citoquinas: EPO a una concentración de 3 UI/mL (Aranesp®, Amgen, Thousand Oaks, Estados Unidos), SCF a una concentración de 100 UI/mL (GellGenix, Freiburg, Alemania). Una vez formulados los medios, se realiza una filtración esterilizante (0,2 µm) y se conservan a 2 – 8 °C hasta su utilización.

	Medios de cultivo	
	Medio de expansión	Medio de diferenciación
Medio basal	IMDM	IMDM
hSerB	5% (v/v)	5% (v/v)
L-Glutamina	2 mM	2 mM
Transferrina	330 µg/mL	330 µg/mL
Insulina	10 µg/mL	10 µg/mL
Hidrocortisona	10 ⁻⁶ M	--
EPO	3 IU/mL	3 IU/mL
SCF	100 ng/mL	100 ng/mL
IL-3	5 ng/mL	--

Tabla 7-1 Composición y concentración final de los suplementos en los medios de cultivo experimentales empleados para la expansión y diferenciación de cultivos eritroides.

7.2.2. Cultivos de expansión y diferenciación eritroide en sistemas estáticos de cultivo

Los cultivos de expansión y diferenciación eritroide se inician a partir de células CD34⁺ obtenidas de SCU a una concentración de entre 1·10³ y 1·10⁵ Cél. CD34⁺/mL. La metodología desarrollada emplea durante los primeros 8 días el medio de expansión, y a partir del octavo día el medio de diferenciación (Ver **Tabla 4-1**). Los sistemas

empleados para el soporte de los cultivos estáticos son frascos de cultivo estériles de poliestireno (*t-flask*) de 25, 75 y 150 cm² de superficie (Corning, NY, Estados Unidos). Un filtro de 0,22 µm en las tapas de los frascos permite el intercambio de gases con el exterior y facilita el control del pH en atmósferas de CO₂ controlado. También se han empleado bolsas de cultivo 2D estériles, permeables a los gases de volumen variable (100 mL – 250 mL) (*MACS[®] GMP Cell expansion bag*, Miltenyi Biotech). A los cultivos en discontinuo (*batch*) no se les realiza ninguna actuación, ni recambio de medio. Los cultivos discontinuos alimentados (*fed-batch*) se realizan adiciones periódicas con medio fresco. Todos los cultivos se mantienen en incubadores con atmósfera humidificada, a 37 °C y 5% de pCO₂.

7.2.3. Cultivos eritroides en bioreactor de tanque agitado miniBio

El bioreactor de tanque agitado miniBio (Applikon[®], Delft, Holanda) es un equipo diseñado y concebido para investigación y desarrollo de cultivos celulares a pequeña escala. Tal como se puede observar en la **Figura 7-1**, es un equipo compacto de mesada, compuesto básicamente por un bioreactor autoclavable provisto con sensores, sistema de agitación, aireación y control de la temperatura; y una unidad de control (*my-Control*) mediante la cual es posible la adquisición de datos y el control de las variables de proceso gracias a una serie de actuadores incorporados a la unidad.



Figura 7–1 Bioreactores miniBio empleados para cultivos de expansión y diferenciación eritroide: En el centro de la imagen se observa los bazos de cultivo equipados y en funcionamiento; y a ambos extremos las unidades de control *my-Control*.

La unidad de control ofrece todas las funciones necesarias para la automatización y control de las principales variables de proceso: temperatura, agitación, pH y oxígeno disuelto (pO_2). Estas funciones son la adquisición de datos, calibración de los sensores, gestión de los lazos de control (PID, PID adaptativo y on/off) y actuadores (bombas y válvulas). La interface con el usuario se genera a partir de una conexión en red con un ordenador personal (comunicación TCP/IP) lo que permite consignar y parametrizar los valores de las variables básicas de cultivo.

El software asociado al equipo, BioExpert Lite (versión 1.12, Applikon[®]) permite la adquisición y visualización de los datos de proceso de forma gráfica o como datos que pueden ser exportados para su posterior tratamiento.

También dispone de conexiones para gases de entrada (aire y CO_2) regulados por válvulas solenoides, que permiten el suministro controlado de estos gases al sistema, ya sea por cabezal (*overlay*) o en forma de microburbujas a través del *sparger*. El recipiente de cultivo es de vidrio (borosilicato), el volumen máximo de trabajo es 200 mL y el mínimo 50 mL. La temperatura del cultivo es controlada entorno al valor de

consigna mediante una manta térmica eléctrica que envuelve al recipiente. En la tapa superior dispone de varios puertos de entrada que permiten instalar sensores, entrada y salida de gases, tomo de muestras y otras funciones. En la **Figura 7-2** se observa una configuración típica para los cultivos desarrollados.

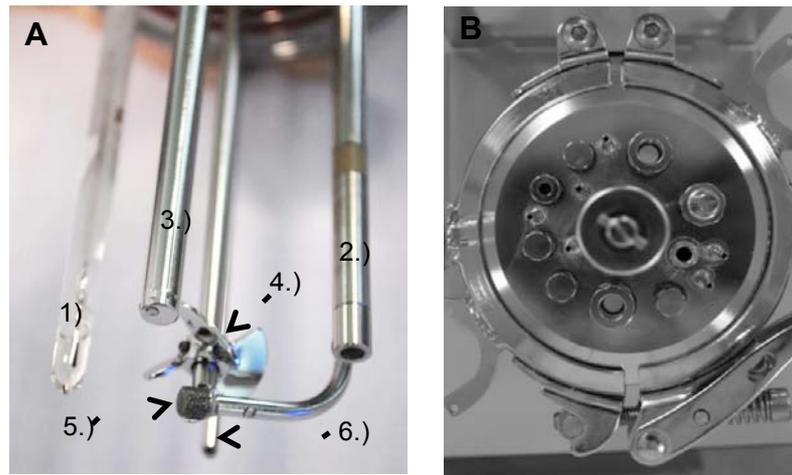


Figura 7-2 A) En la imagen de la izquierda se puede observar los distintos sensores y sistemas auxiliares empleados para la monitorización y control del proceso: 1) Sonda de pH; 2) sonda de pO₂; 3) vaina para sonda de temperatura (Pt-100); 4) sistema de agitación (hélice marina); 5) sistema de aireación (*micro-sparger*) y 6) cánula para toma de muestra. B) En la imagen de la derecha se observa la disposición de los distintos puertos de entrada en el cabezal del bioreactor.

7.2.3.1 Preparación y operación del bioreactor miniBio

De forma resumida se presentan a continuación las principales etapas y tareas a realizar por la preparación y operación del bioreactor, tanto para cultivos en discontinuo (*batch*), así como para cultivos discontinuos alimentados (*fed-batch*).

- Se montan los distintos componentes del bioreactor: sondas, tubuladuras, filtros y se claman todas las conexiones.
- Se calibra la sonda de pH y las bombas incorporadas al bioreactor.

- Corroborado la limpieza correcto estado de todas las piezas correspondientes al baso de cultivo, se llena con WFI o PBS.
- Se verifica el ajuste de las sondas y accesorios al bioreactor, se preparan los filtros de venteo y gases de entrada, se resguardan las conexiones y se verifica el sello mecánico del sistema de agitación. Es muy importante dejar sin clampar una salida para evitar una sobrepresión durante el autoclavado.
- El bioreactor junto al soporte se debe autoclavar para su esterilización, al menos 30 minutos a 121 °C. Una vez finalizado el ciclo de autoclavado, se debe comprobar la integridad de las tubuladuras, conexiones y filtros.
- Se conectan los gases y los cables de los sensores a la unidad de control. Se monta la manta térmica y se activan los controles de temperatura y agitación con valores de consiga de operación (ej.: 37 °C y 100 rpm) y se aguarda hasta que estas variables se estabilicen entorno a los valores fijados.
- Se calibra la sonda de pO₂, la cual debe polarizarse previo a su calibración un mínimo de 2 horas. Por características intrínsecas de los cultivos celulares, el 0 puede ser calibrado indicando 0 de corriente. Luego se introduce un caudal de aire hasta obtener una lectura estable y máxima de corriente, lo que corresponderá al 100%.
- Luego se procede a la inoculación del bioreactor, para lo cual se deberá desconectar todas las conexiones y trasladar el bioreactor junto al soporte al interior de una cabina de flujo laminar para operar en esterilidad.
- En el interior de la cabina se retira la WFI o PBS del interior del bazo y se inocula el medio de cultivo. Se recomienda que este, se encuentre previamente atemperado para evitar choques térmicos. Se cierra correctamente el bioreactor,

se retira del flujo laminar y se reconectan todas las sondas y tubuladuras a la unidad de control. Se reinicia el control de temperatura y la agitación.

- Se inicializan todas las consignas de control del cultivo. Se deja que las variables se estabilicen y se inicia la adquisición de datos.
- La inoculación de la suspensión celular o medio de cultivo se realiza mediante empleando un kit de conexión constituido por una (o varias) jeringas precargadas y tubuladura que se conecta de forma estéril al bioreactor mediante conector de tubos. Para la toma de muestra en esterilidad y/o actuaciones referidas al medio de cultivo, se procede empleando la misma metodología.
- Una vez finalizado los cultivos, se procede a la inactivación con hipoclorito de sodio al 5% p/v y descarte del cultivo y posterior limpieza del bioreactor.

7.2.4. Cálculo del factor de expansión, factor de expansión total y número de duplicaciones

El factor de expansión (E_p , del inglés *expansion factor*) para cada período a lo largo del cultivo se determina aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de expansión } (E_p) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células}_{\text{final}}}{\text{N}^\circ \text{ de células}_{\text{inicial}}}$$

El factor de expansión total o acumulado (E_{pT}) se calcula a partir del E_p , aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de expansión total } (E_{pT}) = \prod_{i=1}^n E_{p_i}$$

Por último, el número de duplicaciones realizadas durante el cultivo, se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Número de duplicaciones} = \frac{\text{Ln}(E_p)}{\text{Ln}(2)}$$

7.3. Técnicas de citometría de flujo

7.3.1. Cuantificación de células CD34⁺ y células nucleadas totales

La cuantificación de células CD34⁺ en los cultivos se realiza mediante citometría de flujo, siguiendo las recomendaciones establecidas por la *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) (Al-Rubeai and Naciri, 2014; Beutler et al., 2005; Sutherland et al., 1996). La metodología citométrica desarrollada analiza 4 parámetros: tamaño y complejidad celular; y expresión de las proteínas de membrana CD34 y CD45. Estos parámetros se combinan entre sí, empleando una estrategia de gateo secuencial para la selección de la población de interés y simultáneamente minimizar las interferencias producidas por debris celular y células adultas a las que los anticuerpos pueden ligarse de forma no específica. La adición de un volumen conocido de microesferas fluorescentes de densidad determinada permite la cuantificación tanto de células CD34⁺ como de las células nucleadas totales (CD45⁺) por unidad de volumen.

En un tubo de citometría, previamente rotulado, se disponen 5 µL del anticuerpo monoclonal CD34-PE y 5 µL del anticuerpo monoclonal CD45-FITC (ambos de BD Biosciences, NJ, Estados Unidos). Se añaden 50 µL de muestra celular al tubo, se homogeniza y se deja incubando durante 15 minutos al resguardo de la luz y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, y justo antes de realizar el

análisis, se añaden 100 μL PBS y 50 μL de microesferas fluorescentes *Perfect Count Microspheres* (Cytognos, Salamanca, España). Se homogeniza el tubo manualmente y se realiza la adquisición en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), adquiriendo no menos de 20000 eventos. Para el análisis de los resultados se emplea el software CellQuest Pro (BD).

7.3.2. Recuento celular por citometría de flujo

La concentración celular de muestras de cultivos se realiza mediante citometría de flujo, empleando microesferas fluorescentes de referencia *Perfect Count* (Cytognos). La adición de un volumen y densidad conocida de microesferas a la muestras permite determinar la concentración por unidad de volumen de la población celular de interés.

En un tubo de citometría se añaden 100 μL de PBS y 50 μL de muestra. Se añaden 50 μL (mismo volumen) de microesferas, se homogeniza el tubo y se realiza la adquisición en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD). Para el análisis de los resultados se emplea el software CellQuest Pro (BD). La concentración celular se determina empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración celular} \left(\frac{\text{Cél.}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas}}{\text{N}^\circ \text{ de microesferas contadas}} \times \text{N}^\circ \text{ microesferas/mL}$$

7.3.3. Viabilidad celular

El porcentaje de células viables se determina cuantificando los procesos de apoptosis y necrosis en los cultivos. Gracias a las características intrínsecas de estos procesos, es posible determinar la viabilidad celular en cultivos mediante citometría de flujo. Las células que han iniciado el proceso de apoptosis (células no viables) sufren una

translocación de la fosfatidilserina en su membrana celular, el marcaje con Anexina V conjugada a un fluorocromo permite identificar estas células ya que se une de forma específica a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de Ca^{2+} . El proceso de necrosis (muerte celular) se caracteriza por los daños que se producen en la membrana celular. El compuesto químico fluorescente 7-aminoactinomicina D (7-AAD) tiene una alta afinidad por el DNA. Las células con daños en su membrana, y por tanto, permeables al 7-AAD, quedan marcadas de forma específica, lo que permite su detección por citometría de flujo.

Previo al marcaje de la muestra celular, se realiza un lavado de las células con una solución salina tamponada con Ca^{2+} (*Binding Buffer*, BD Biosciences) para permitir la unión de la Anexina V-FITC (BD Biosciences). Las células son centrifugadas y el *pellet* es resuspendido en un volumen de *Binding Buffer* tal que la concentración final celular sea aproximadamente $1 \cdot 10^6$ Cél./mL. Se distribuyen 100 μL de la suspensión celular en 4 tubos de citometría previamente rotulados y se adicionan los reactivos según se detalla a continuación:

	Anexina V-FITC	7-AAD
Tubo 1	-	-
Tubo 2	5 μL	-
Tubo 3	-	5 μL
Tubo 4	5 μL	5 μL

Tabla 7-2 Esquema de marcaje celular para análisis de viabilidad por citometría de flujo de una muestra de cultivo celular.

Los tubos 2 y 4 luego de añadirles el volumen correspondiente de Anexina V-FITC se incuban durante 10 minutos al resguardo de la luz y a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo se añaden a los tubos 4 y 3 el volumen correspondiente de 7-

AAD (BD Biosciences) y se deja incubando durante otros 5 minutos en las mismas condiciones. Luego, se añaden 2 mL de *Binding Buffer* y se realiza una centrifugación (340 g, 5 min.). Finalmente se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 100 μ L de *Binding Buffer*. La adquisición se realiza en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Para el análisis de los resultados se emplea el software CellQuest Pro (BD Biosciences).

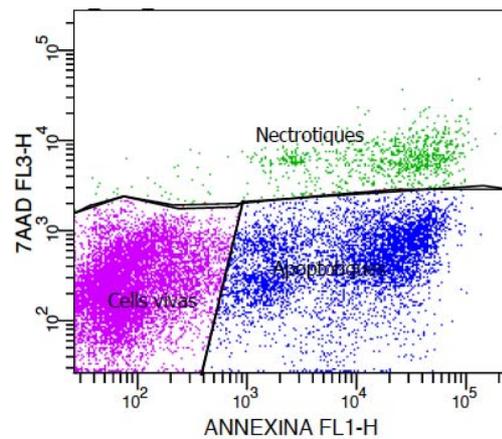


Figura 7–3 Ejemplo de análisis de viabilidad celular por citometría de flujo de un cultivo eritroide.

7.3.4. Fenotipo eritroide

El análisis de la expresión de los marcadores característicos del linaje eritroide CD36, CD45, CD71 y CD235a combinados entre ellos nos permite identificar las distintas etapas de diferenciación según se especifica en la tabla presentada a continuación:

	CPH	Proeritroblastos	Eritroblastos basófilicos	Eritroblastos policromatófilos	Reticulocitos	Eritrocitos
CD34	++	-/+	-	-	-	-
CD36	-	++	+++	++	-/+	-
CD45	++	+	-/+	-	-	-
CD71	-	+++	+++	+++	+/>+++	-
CD235a	-	+/>+++	+++	+++	+++	+++

Tabla 7-3 Detalle de la expresión de los distintos marcadores característicos en las sucesivas etapas de diferenciación eritroide (Beutler et al., 2005; Tirelli et al., 2011).

Con el fin de interpretar adecuadamente los resultados, y definir con exactitud las poblaciones se introduce como control la estrategia de marcaje FMO (*fluorescence minus one*) con el fin de asegurar que la propagación de los fluorocromos en el canal de interés esté debidamente identificada. En la **Tabla 7-4** se detalla las diferentes combinaciones empleadas, además del marcaje completo.

	CD45-PerCP	CD36-APC	CD71-PE	CD235a-FITC
Tubo 1: Unstained	-	-	-	-
Tubo 2: FMO CD45	-	5 µL	5 µL	1 µL
Tubo 3: FMO CD36	5 µL	-	5 µL	1 µL
Tubo 4: FMO CD71	5 µL	5 µL	-	1 µL
Tubo 5: FMO CD235	5 µL	5 µL	5 µL	-
Tubo 6: CD36 + CD45	5 µL	5 µL	-	-
Tubo 7: All	5 µL	5 µL	5 µL	1 µL

Tabla 7-4 Detalle de las combinación de anticuerpos y volumen añadido a cada tubo para el análisis de fenotipo. Los tubos 1, 2, 3, 4, 5 son empleados para establecer los umbrales de positividad de cada población. Para el análisis simple de fenotipo (CD36/CD45), se emplean solo los tubos 1, 2, 3 y 6. Para el análisis completo se emplean todos los tubos. En estadios avanzados del cultivo se debe diluir 1:4 el volumen de CD235a-FITC. Todos los anticuerpos empleados son de la casa comercial BD Biosciences.

Se depositan 100 µL de la suspensión celular en cada uno de los tubos de citometría y seguido se añaden los anticuerpos según se especifica en la **Tabla 7-4**. Se incuban durante 15 minutos al resguardo de la luz y a temperatura ambiente, finalizada la

incubación se realiza un lavado de los tubos con 3 mL de PBS seguido de una centrifugación (340 g, 5 min.). Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 100 μ L de PBS. La adquisición se realiza en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Para el análisis de los resultados se emplea el software CellQuest Pro (BD Biosciences).

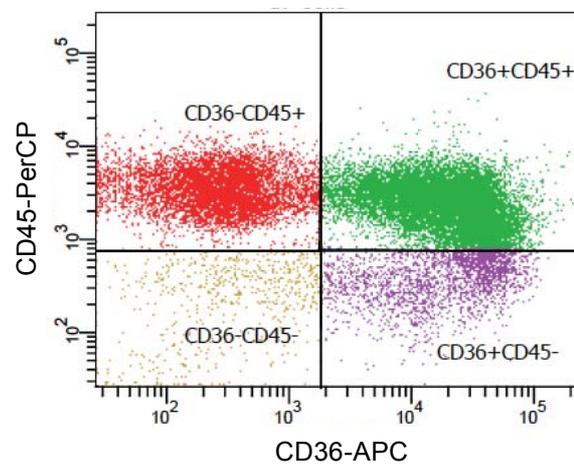


Figura 7-4 Ejemplo del análisis citométrico para la determinación de la distribución y porcentaje de las distintas poblaciones eritroides para los marcadores CD36 y CD45.

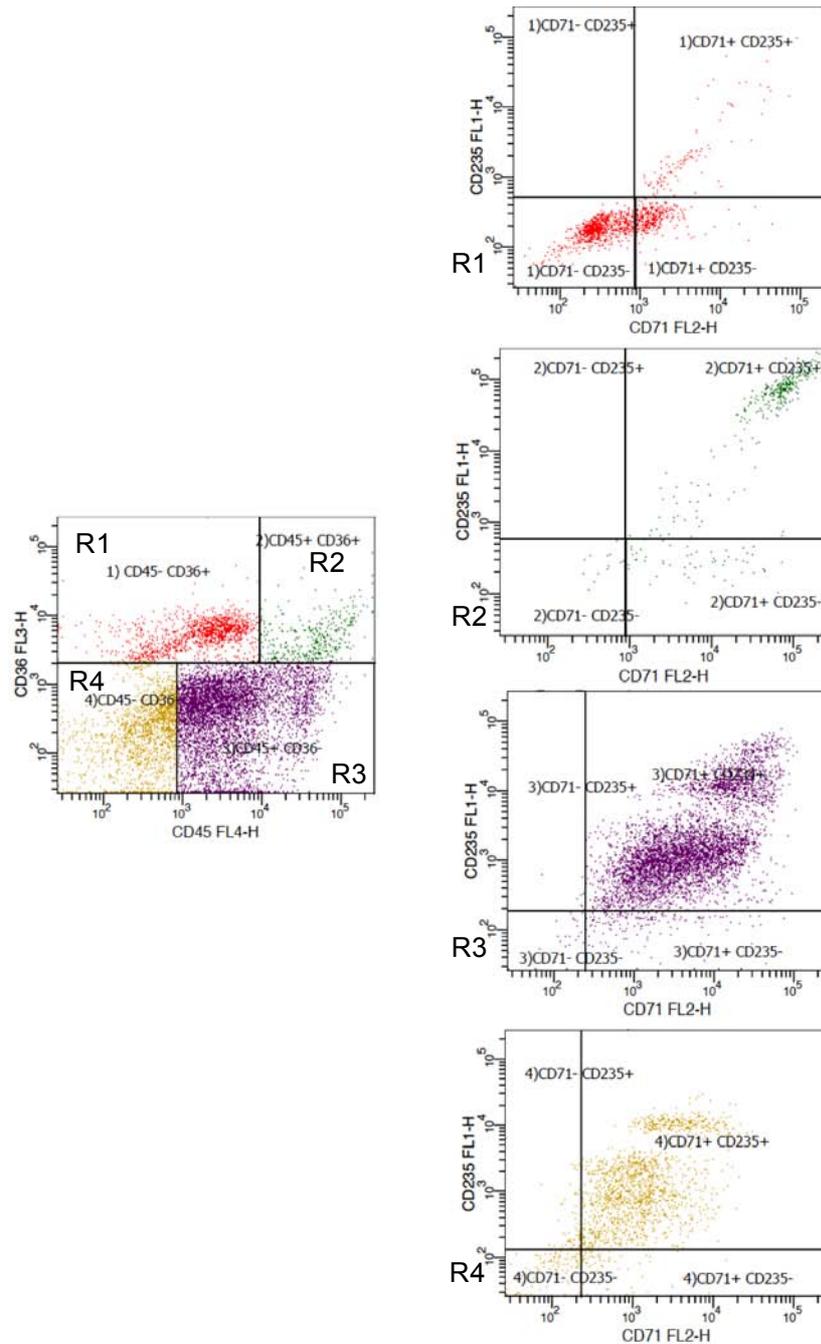


Figura 7-5 Ejemplo del análisis citométrico para la determinación de la distribución y porcentaje de las distintas poblaciones eritroides para los marcadores CD36, CD45, CD71 y CD235a: Fenotipo “completo”. En la imagen de la derecha, se determina la distribución de los marcadores CD36 y CD45 en 4 regiones. En la izquierda, se analiza para cada región la distribución y porcentaje de los marcadores CD71 (receptor de transferrina) y CD235a (glicoforina a).

7.3.5. Determinación del porcentaje de células enucleadas

La determinación del porcentaje de células enucleadas (reticulocitos y eritrocitos) presentes en cultivos eritroides se determina mediante tinción del DNA de las células con el reactivo Retic-COUNT™ (BD Biosciences), funcionalmente equivalente al naranja acridina, de carga positiva y permeable a la membranas celulares. Los reticulocitos son células enucleadas, pero todavía conservan orgánulos residuales. Estos residuos contienen restos de DNA y RNA, a los cuales se une el reactivo Retic-COUNT™ formando un complejo nucleótidos-reactivo fluorescente lo que permite su adquisición y análisis por citometría de flujo.

Previo a la determinación se debe estimar la concentración celular de la muestra a analizar. Se extrae un volumen con $2 \cdot 10^5$ Células totales y se realiza un lavado con 3 mL de PBS. Luego se centrifuga la muestra (340 g, 5 min.) y se descarta el sobrenadante. El pellet se resuspende en 100 μ L de PBS. La muestra resuspendida se distribuye en 2 tubos de citometría previamente rotulados y se añaden los reactivos según se detalla a continuación:

- Tubo CONTROL: 50 μ L de suspensión celular + 400 μ L de PBS
- Tubo MUESTRA: 50 μ L de suspensión celular + 400 μ L de Retic-COUNT™

Se homogenizan los tubos y se incuban durante 45 minutos y hasta un máximo de 2 horas, a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. El tubo control se emplea para delimitar el umbral de positividad por fluorescencia del canal 1 (FL1). La adquisición se realiza en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Para el análisis de los resultados se emplea el software CellQuest Pro (BD Biosciences).

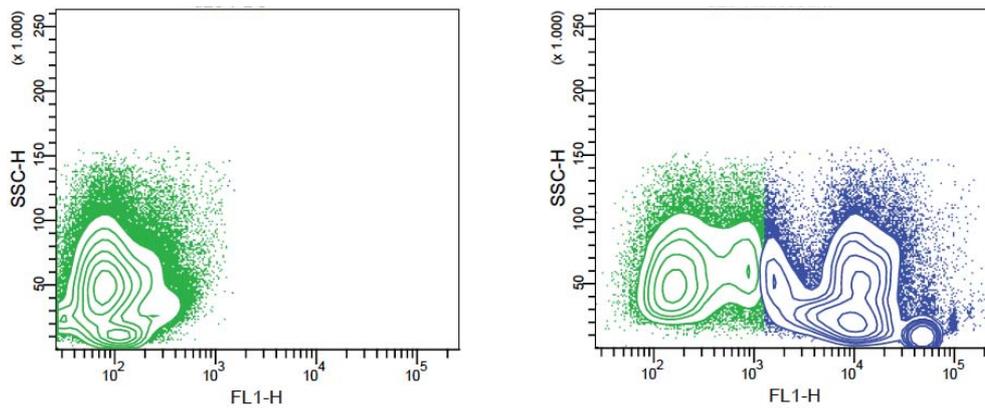


Figura 7-6 Ejemplo de análisis de enucleación por citometría de flujo. En la gráfica de la izquierda se observa el control (sin tinción) empleado para definir los límites, y en la gráfica de la derecha se discriminan las poblaciones nucleadas (azul) y enucleadas (verde).

7.4. Análisis de la concentración de glucosa y lactato

La concentración de glucosa y lactato en las muestras de sobrenadantes se determinan empleando un analizador bioquímico YSI modelo 2700 (YSI Incorporated, Ohio, EEUU). El analizador emplea un método enzimático para la determinación de los sustratos de interés. Las enzimas glucosa oxidasa y lactato oxidasa se encuentran inmovilizadas entre dos membranas sobre un electrodo de platino respectivamente. Los sustratos presentes en las muestras (D-glucosa y L-lactato) difunden a través de la membrana y reaccionan con la enzima respectiva produciendo peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es oxidado electroquímicamente en el ánodo de platino del electrodo generando una señal eléctrica. La intensidad de la señal resultante es proporcional a la concentración de cada uno de los sustrato.

El analizador requiere 50 μL de la muestra de interés para la determinación de los valores de concentración de glucosa y lactato en (g/L), con un error aproximado de $\pm 0,1$ g/L. Las muestras de sobrenadantes de cultivos son centrifugadas previamente (5 minutos a 340 G) para eliminar posibles agregados y/o restos celulares.

7.5. Tinción de May Grünwald-Giemsa

La tinción de May Grünwald-Giemsa (MGG) es una técnica de tinción que permite diferenciar cualitativamente y cuantitativamente células de la sangre.

La técnica se basa en el empleo de dos soluciones colorantes, la tinción de Giemsa (modificada), tiazina-eosinato 0,4 % p/v, en una solución tamponada de metanol, con estabilizantes (Sigma Aldrich, MO, Estados Unidos). Y la tinción de May-Grünwald, azul de metileno 0,25 % p/v, en metanol (Sigma Aldrich).

La muestra para la tinción debe contener al menos $1 \cdot 10^6$ células. La suspensión celular se diluye con 15 mL de PBS y se centrifuga (340 g, 5 min.). Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en un volumen de 5 a 20 μ L. Se coloca una gota de la suspensión en un portaobjetos y se realiza la extensión con ayuda de otro portaobjetos y se deja secar.

Las soluciones de Giemsa y May-Grünwald se suministran listas para su uso, pero se recomienda diluir la solución de Giemsa al 20% con tampón fosfato, una mezcla de fosfato sódico y fosfato potásico a pH 7,2 (Sigma Aldrich), el mismo día de su uso.

Se coloca el portaobjetos con la extensión seca en la tinción de May-Grünwald durante 5 minutos. Luego se enjuaga con abundante agua. Seguido, se coloca el portaobjetos en la solución de Giemsa diluida durante 8 minutos. Por último, se aclara brevemente el portaobjetos con agua y se deja secar al aire antes de evaluar al microscopio.

Los núcleos se teñirán en diferentes tonos de púrpura. El citoplasma de las células maduras se teñirá en diferentes tonos de azul a rosa claro. El citoplasma de algunas células puede presentar gránulos finos de rojizos a lila. Los hematíes deben mostrar un color de rosa a naranja. Las células con alto contenido de RNA presentan un citoplasma de color azul intenso.

7.6. Inmunohistoquímica

La confirmación de identidad celular se realizó mediante marcajes inmunocitoquímicos de muestras de cultivo citocentrifugadas a distintos intervalos de tiempo. Los anticuerpos primarios empleados son anti-glicoforina A (GA-R2) (Cell Marque Corporation, CA, EEUU) y anti-CD3 (clon: PS-1) (Leica Biosystems, Newcastle Ltd, Reino Unido). Las muestras fueron procesadas y analizadas gentilmente por la Dra. Lourdes Florensa y colaboradores en el Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia del Hospital del Mar (Parc de Salut Mar, Barcelona).

7.7. Composición de hemoglobinas

La determinación del porcentaje relativo de hemoglobinas en células enucleadas generadas in vitro se realiza en el Laboratori de Referència de Catalunya (Barcelona, Catalunya). El método analítico empleado es el método integrado de referencia (Variant™ II, Bio-Rad, CA, EEUU), para la separación y determinación del porcentaje relativo de hemoglobinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de intercambio iónico.

CAPÍTULO 8

Referencias bibliográficas

8. Referencias bibliográficas

- Al-Rubeai, M. (2011). *Antibody Expression and Production* (Springer Science & Business Media).
- Al-Rubeai, M., and Naciri, M. (2014). *Stem Cells and Cell Therapy* (Springer).
- Altamirano, C., Berrios, J., Vergara, M., and Becerra, S. (2013). Advances in improving mammalian cells metabolism for recombinant protein production. *Electron. J. Biotechnol.* *16*.
- Alter, H.J., and Klein, H.G. (2008). The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood* *112*, 2617–2626.
- Baek, E.J., Kim, H.-S., Kim, J.-H., Kim, N.J., and Kim, H.O. (2009). Stroma-free mass production of clinical-grade red blood cells (RBCs) by using poloxamer 188 as an RBC survival enhancer. *Transfusion* *49*, 2285–2295.
- Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J., and Seligsohn, U. (2005). *Williams Hematology, 6th Ed* (Marbán).
- Bhanu, N.V. (2004). A signaling mechanism for growth-related expression of fetal hemoglobin. *Blood* *103*, 1929–1933.
- Boehm, D., Murphy, W.G., and Al-Rubeai, M. (2009). The potential of human peripheral blood derived CD34+ cells for ex vivo red blood cell production. *Journal of Biotechnology* 1–8.
- Boehm, D., Murphy, W.G., and Al-Rubeai, M. (2010). *Journal of Immunological Methods*. *Journal of Immunological Methods* *360*, 20–29.
- Bony, V., Gane, P., Bailly, P., and Cartron, J.P. (1999). Time-course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation. *Br. J. Haematol.* *107*, 263–274.
- Brown, G., and Ceredig, R. (2009). *Cell Determination During Hematopoiesis* (Nova Biomedical Books).

- Cabral, J. (2001). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells in bioreactors. *Biotechnology Letters*.
- Cabrita, G.J.M., Ferreira, B.S., da Silva, C.L., Gonçalves, R., Almeida-Porada, G., and Cabral, J.M.S. (2003). Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. *Trends Biotechnol.* *21*, 233–240.
- Carotta, S. (2004). Directed differentiation and mass cultivation of pure erythroid progenitors from mouse embryonic stem cells. *Blood* *104*, 1873–1880.
- Ceredig, R., Rolink, A.G., and Brown, G. (2009). Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 293–300.
- Chang, K.H. (2006). Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood* *108*, 1515–1523.
- Chasis, J.A., and Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* *112*, 470–478.
- Chen, K., Liu, Q., Xie, L., Sharp, P.A., and Wang, D.I. (2001). Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* *72*, 55–61.
- Chen, L., Gao, Z., Zhu, J., and Rodgers, G.P. (2007). Identification of CD13+CD36+ cells as a common progenitor for erythroid and myeloid lineages in human bone marrow. *Experimental Hematology* *35*, 1047–1055.
- Collins, P.C., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (1998a). Stirred culture of peripheral and cord blood hematopoietic cells offers advantages over traditional static systems for clinically relevant applications. *Biotechnology and ...*
- Collins, P.C., Nielsen, L.K., Patel, S.D., Papoutsakis, E.T., and Miller, W.M. (1998b). Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. *Biotechnol. Prog.* *14*, 466–472.
- Collins, P.C., Papoutsakis, E.T., and Miller, W.M. (1996). Ex vivo culture systems for hematopoietic cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* *7*, 223–230.
- Csaszar, E., Cohen, S., and Zandstra, P.W. (2013). Blood stem cell products: Toward sustainable benchmarks for clinical translation. *Bioessays* *35*, 201–210.
- Csaszar, E., Kirouac, D.C., Yu, M., Wang, W., Qiao, W., Cooke, M.P., Boitano, A.E., Ito, C., and Zandstra, P.W. (2012). Rapid Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells by Automated Control of Inhibitory Feedback Signaling. *Stem Cell* *10*, 218–229.

- Daud, H., Browne, S., Al-Majmaie, R., Murphy, W., and Al-Rubeai, M. (2016). Metabolic profiling of hematopoietic stem and progenitor cells during proliferation and differentiation into red blood cells. *New BIOTECHNOLOGY* 33, 179–186.
- De Jesus, M.J., and Wurm, F.M. (2012). *Mammalian Cells in Biotech Production. Pharmaceutical Biotechnology: Drug ...*
- di Giacomo, V., Matteucci, A., Stellacci, E., Battistini, A., Di Baldassarre, A., Capitani, S., Alfani, E., Migliaccio, A.R., Cocco, L., and Migliaccio, G. (2004). Expression of signal transduction proteins during the differentiation of primary human erythroblasts. *J. Cell. Physiol.* 202, 831–838.
- Dirlam, A., Spike, B.T., and Macleod, K.F. (2007). Deregulated E2f-2 Underlies Cell Cycle and Maturation Defects in Retinoblastoma Null Erythroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 27, 8713–8728.
- Dorshkind, K. (2010). Not a split decision for human hematopoiesis. *Nature Publishing Group* 11, 569–570.
- DOUAY, L., and ANDREU, G. (2007). Ex vivo Production of Human Red Blood Cells From Hematopoietic Stem Cells: What Is the Future in Transfusion? *Transfusion Medicine Reviews* 21, 91–100.
- FDA, C. (2004). *Guidance for Industry.*
- Fujimi, A., Matsunaga, T., Kobune, M., Kawano, Y., Nagaya, T., Tanaka, I., Iyama, S., Hayashi, T., Sato, T., Miyanishi, K., et al. (2008). Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol* 87, 339–350.
- Giarratana, M.C., Rouard, H., Dumont, A., Kiger, L., Safeukui, I., Le Penec, P.Y., Francois, S., Trugnan, G., Peyrard, T., Marie, T., et al. (2011). Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 118, 5071–5079.
- Giarratana, M.-C., Kobari, L., Lapillonne, H., Chalmers, D., Kiger, L., Cynober, T., Marden, M.C., Wajcman, H., and Douay, L. (2004). Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 69–74.
- Hattangadi, S.M., Wong, P., Zhang, L., Flygare, J., and Lodish, H.F. (2011). From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* 118, 6258–6268.
- Hirose, S.-I., Takayama, N., Nakamura, S., Nagasawa, K., Ochi, K., Hirata, S., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Otsu, M., Sano, S., et al. (2013). *Stem Cell Reports. Stem Cell Reports* 1, 499–508.

Hiroiyama, T., Miharada, K., Sudo, K., Danjo, I., Aoki, N., and Nakamura, Y. (2008). Establishment of Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Functional Red Blood Cells. *PLoS ONE* 3, e1544.

Housler, G.J., Miki, T., Schmelzer, E., Pekor, C., Zhang, X., Kang, L., Voskinarian-Berse, V., Abbot, S., Zeilinger, K., and Gerlach, J.C. (2012). Compartmental hollow fiber capillary membrane-based bioreactor technology for in vitro studies on red blood cell lineage direction of hematopoietic stem cells. *Tissue Engineering Part C: Methods* 18, 133–142.

Ivanovic, Z. (2009a). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* 219, 271–275.

Ivanovic, Z. (2009b). Physiological, ex vivo cell oxygenation is necessary for a true insight into cytokine biology. *Eur. Cytokine Netw.* 20, 7–9.

Ivanovic, Z., Duchez, P., Dazey, B., Hermitte, F., Lamrissi-Garcia, I., Mazurier, F., Praloran, V., Reiffers, J., Vezon, G., and Boiron, J.-M. (2006). A clinical-scale expansion of mobilized CD 34+ hematopoietic stem and progenitor cells by use of a new serum-free medium. *Transfusion* 46, 126–131.

Keerthivasan, G., Wickrema, A., and Crispino, J.D. (2011). Erythroblast Enucleation. *Stem Cells Int* 2011, 1–9.

Kirouac, D.C., and Zandstra, P.W. (2006). Understanding cellular networks to improve hematopoietic stem cell expansion cultures. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 538–547.

Kirouac, D.C., and Zandstra, P.W. (2008). The Systematic Production of Cells for Cell Therapies. *Cell Stem Cell* 3, 369–381.

Kirouac, D.C., Madlambayan, G.J., Yu, M., Sykes, E.A., Ito, C., and Zandstra, P.W. (2009). Cell–cell interaction networks regulate blood stem and progenitor cell fate. *Molecular Systems Biology* 5, 1–20.

Kolbus, A. (2003). Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling. *Blood* 102, 3136–3146.

Köhler, T., Plettig, R., Wetzstein, W., and Schaffer, B. (1999). Defining optimum conditions for the ex vivo expansion of human umbilical cord blood cells. Influences of progenitor enrichment, interference with feeder Cells.

Kurita, R., Suda, N., Sudo, K., Miharada, K., Hiroyama, T., Miyoshi, H., Tani, K., and Nakamura, Y. (2013). Establishment of Immortalized Human Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Enucleated Red Blood Cells. *PLoS ONE* 8, e59890.

Lansdorp, P.M., Sutherland, H.J., and Eaves, C.J. (1990). Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. *J. Exp. Med.* 172, 363–366.

Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M.C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donze, M., Puccio, H., Hebert, N., et al. (2010). Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95, 1651–1659.

Lavelle, D., Molokie, R., Ducksworth, J., and DeSimone, J. (2001). Effects of hydroxurea, stem cell factor, and erythropoietin in combination on fetal hemoglobin in the baboon. *Experimental Hematology* 29, 156–162.

Leberbauer, C. (2005). Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood* 105, 85–94.

Lindern, von, M., Zauner, W., Mellitzer, G., Steinlein, P., Fritsch, G., Huber, K., Löwenberg, B., and Beug, H. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood* 94, 550–559.

Liu, N., Zang, R., Yang, S.-T., and Li, Y. (2013). Stem cell engineering in bioreactors for large-scale bioprocessing. *Eng. Life Sci.* 14, 4–15.

Liu, Y., Liu, T., Fan, X., Ma, X., and Cui, Z. (2006). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. *Journal of Biotechnology* 124, 592–601.

Lodish, H., Flygare, J., and Chou, S. (2010). From stem cell to erythroblast: Regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life* 62, 492–496.

Loken, M.R., Shah, V.O., Dattilio, K.L., and Civin, C.I. (1987). Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 69, 255–263.

Lu, S.J., Feng, Q., Park, J.S., Vida, L., Lee, B.S., Strausbauch, M., Wettstein, P.J., Honig, G.R., and Lanza, R. (2008). Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 112, 4475–4484.

Luc Douay MD, P., HEIENE Lapillonne MD, P., and Ali G Turhan MD, P. (2009). Stem Cells-A Source of Adult Red Blood Cells for Transfusion Purposes: Present and Future. *Critical Care Clinics* 25, 383–398.

Mabaera, R., West, R.J., Conine, S.J., Macari, E.R., Boyd, C.D., Engman, C.A., and Lowrey, C.H. (2008). A cell stress signaling model of fetal hemoglobin induction: what doesn't kill red blood cells may make them stronger. *Experimental Hematology* 36, 1057–1072.

Machherndl-Spandl, S., Suessner, S., Danzer, M., Proell, J., Gabriel, C., Lauf, J., Sylie, R., Klein, H.-U., acute, M.C.B.E.N., Weltermann, A., et al. (2013). Molecular pathways of early CD105-positive erythroid cells as compared with CD34-positive common precursor cells by flow cytometric cell-sorting and gene expression profiling. *Blood Cancer Journal* 3, e100–e113.

Maggakis-Kelemen, C., Bork, M., Kayser, P., Biselli, M., and Artmann, G.M. (2003). Biological and mechanical quality of red blood cells cultured from human umbilical cord blood stem cells. *Med Biol Eng Comput* 41, 350–356.

Majka, M., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., Ehrenman, K., Pietrzakowski, Z., Kowalska, M.A., Gewirtz, A.M., Emerson, S.G., and Ratajczak, M.Z. (2001). Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97, 3075–3085.

Marshak, D.R., Gardner, R.L., and Gottlieb, D. (2001). *Stem cell biology* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

McGrath, K.E., Kingsley, P.D., Koniski, A.D., Porter, R.L., Bushnell, T.P., and Palis, J. (2008). Enucleation of primitive erythroid cells generates a transient population of “pyrenocytes” in the mammalian fetus. *Blood* 111, 2409–2417.

Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485–491.

Migliaccio, A.R., Grazzini, G., and Hillyer, C.D. (2012a). Ex vivo generated Red Cells as Transfusion Products. *Stem Cells Int* 2012, 615412.

Migliaccio, A.R., Masselli, E., Varricchio, L., and Whitsett, C. (2012b). Ex-vivo expansion of red blood cells: How real for transfusion in humans? *Yblre* 26, 81–95.

Migliaccio, G., Sanchez, M., Masiello, F., Tirelli, V., Varricchio, L., Whitsett, C., and Migliaccio, A.R. (2010). Humanized Culture Medium for Clinical Expansion of Human Erythroblasts. *Cell Transplant* 19, 453–469.

- Miharada, K., Hiroyama, T., Sudo, K., Nagasawa, T., and Nakamura, Y. (2006). Efficient enucleation of erythroblasts differentiated in vitro from hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* *24*, 1255–1256.
- Nagel, R.L. (2003). *Hemoglobin Disorders* (Springer).
- Natanson, C., Kern, S.J., Lurie, P., Banks, S.M., and Wolfe, S.M. (2008). Cell-Free Hemoglobin-Based Blood Substitutes and Risk of Myocardial Infarction and Death. *Jama* *299*, 2304.
- Neildez-Nguyen, T.M.A., Wajcman, H., Marden, M.C., Bensidhoum, M., Moncollin, V., Giarratana, M.-C., Kobari, L., Thierry, D., and Douay, L. (2002). Human erythroid cells produced ex vivo at large scale differentiate into red blood cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* *20*, 467–472.
- Nguyen, D.T., Diamond, L.W., and Braylan, R.C. (2007). *Flow cytometry in hematopathology* (Humana Pr Inc).
- Nielsen, L.K. (1999). Bioreactors for Hematopoietic Cell Culture. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *1*, 129–152.
- Oburoglu, L., Tardito, S., Fritz, V., de Barros, S.C., Merida, P., Craveiro, M., Mamede, J., Cretenet, G., Mongellaz, C., An, X., et al. (2014). Glucose and Glutamine Metabolism Regulate Human Hematopoietic Stem Cell Lineage Specification. *Stem Cell* *15*, 169–184.
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* *81*, 2844–2853.
- OLIVIER, E., QIU, C., VELHO, M., HIRSCH, R., and BOUHASSIRA, E. (2006). Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells. *Experimental Hematology* *34*, 1635–1642.
- Olsen, A.L. (2006). Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. *Blood* *107*, 1265–1275.
- Ozturk, S., and Hu, W.-S. (2005). *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies* (CRC Press).
- Panzenböck, B., Bartunek, P., Mapara, M.Y., and Zenke, M. (1998). Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* *92*, 3658–3668.
- Patel, S.D., Papoutsakis, E.T., Winter, J.N., and Miller, W.M. (2000). The Lactate Issue Revisited: Novel Feeding Protocols To Examine Inhibition of Cell Proliferation and Glucose Metabolism in Hematopoietic Cell Cultures. *Biotechnol. Prog.* *16*, 885–892.

Perry, J.M., Harandi, O.F., and Paulson, R.F. (2007). BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* 109, 4494–4502.

Peschle, C., Gabbianelli, M., Testa, U., Pelosi, E., Barberi, T., Fossati, C., Valtieri, M., and Leone, L. (1993). c-kit ligand reactivates fetal hemoglobin synthesis in serum-free culture of stringently purified normal adult burst-forming unit-erythroid. *Blood* 81, 328–336.

Ratcliffe, E., Glen, K.E., Workman, V.L., Stacey, A.J., and Thomas, R.J. (2012). *Journal of Biotechnology*. *Journal of Biotechnology* 161, 387–390.

Rodrigues, C.A.V., Fernandes, T.G., Diogo, M.M., da Silva, C.L., and Cabral, J.M.S. (2011). *Biotechnology Advances*. *Biotechnology Advances* 29, 815–829.

Rogers, H.M., Yu, X., Wen, J., Smith, R., Fibach, E., and Noguchi, C.T. (2008). Hypoxia alters progression of the erythroid program. *Experimental Hematology* 36, 17–27.

Rousseau, G.F., Giarratana, M.-C., and Douay, L. (2013). Large-scale production of red blood cells from stem cells: What are the technical challenges ahead? *Biotechnology Journal* n/a–n/a.

Schechter, A.N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 112, 3927–3938.

Singh, V.K. (2014). Manufacturing blood ex vivo: a futuristic approach to deal with the supply and safety concerns. 1–18.

Stellacci, E., Di Noia, A., Di Baldassarre, A., Migliaccio, G., Battistini, A., and Migliaccio, A.R. (2009). Interaction between the glucocorticoid and erythropoietin receptors in human erythroid cells. *Experimental Hematology* 37, 559–572.

Sutherland, D.R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R., and Chin-Yee, I. (1996). The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 5, 213–226.

Thomson, A.W., and Lotze, M.T. (2003). *The Cytokine Handbook* 4e.

Timmins, N.E., and Nielsen, L.K. (2011). Manufactured RBC — Rivers of blood, or an oasis in the desert? *Biotechnology Advances* 29, 661–666.

Timmins, N.E., and Nielsen, L.K. (2009). Blood cell manufacture: current methods and future challenges. *Trends Biotechnol.* 27, 415–422.

- Timmins, N.E., Athanasas, S., Günther, M., Buntine, P., and Nielsen, L.K. (2011). Ultra-High-Yield Manufacture of Red Blood Cells from Hematopoietic Stem Cells. *Tissue Engineering Part C: Methods* 17, 1131–1137.
- Tirelli, V., Ghinassi, B., Migliaccio, A.R., Whitsett, C., Masiello, F., Sanchez, M., and Migliaccio, G. (2011). Phenotypic Definition of the Progenitor Cells with Erythroid Differentiation Potential Present in Human Adult Blood. *Stem Cells Int* 2011, 1–9.
- Tsiftoglou, A.S., Vizirianakis, I.S., and Strouboulis, J. (2009). Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* 61, 800–830.
- van Veen, T., and Hunt, J.A. (2014). Tissue engineering red blood cells: a therapeutic. *J Tissue Eng Regen Med* n/a–n/a.
- Vlaski, M., Lafarge, X., Chevaleyre, J., Duchez, P., Boiron, J.-M., and Ivanovic, Z. (2009). Low oxygen concentration as a general physiologic regulator of erythropoiesis beyond the EPO-related downstream tuning and a tool for the optimization of red blood cell production ex vivo. *Experimental Hematology* 37, 573–584.
- Whitsett, C., Vaglio, S., and Grazzini, G. (2012). Alternative Blood Products and Clinical Needs in Transfusion Medicine. *Stem Cells Int* 2012, 1–14.
- Wickrema, A., and Kee, B. (2009). *Molecular basis of hematopoiesis* (Springer Verlag).
- Wojda, U., Noel, P., and Miller, J.L. (2002). Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood* 99, 3005–3013.
- World Health Organization (2012). *Global Database on Blood Safety* (World Health Organization).
- Xi, J., Li, Y., Wang, R., Wang, Y., Nan, X., He, L., Zhang, P., Chen, L., Yue, W., and Pei, X. (2013). In Vitro Large Scale Production of Human Mature Red Blood Cells from Hematopoietic Stem Cells by Coculturing with Human Fetal Liver Stromal Cells. *BioMed Research International* 2013, 1–12.
- Xu, R., Medchill, M., and Reems, J.A. (2000). Serum supplement, inoculum cell density, and accessory cell effects are dependent on the cytokine combination selected to expand human HPCs ex vivo. *Transfusion* 40, 1299–1307.
- Yoshida, H., Kawane, K., Koike, M., Mori, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2005). Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 437, 754–758.

Zeuner, A., Francescangeli, F., Signore, M., Venneri, M.A., Pedini, F., Felli, N., Pagliuca, A., Conticello, C., and De Maria, R. (2010). The Notch2–Jagged1 interaction mediates stem cell factor signaling in erythropoiesis. *Cell Death and Differentiation* *18*, 371–380.

Zhang, C.C., and Lodish, H.F. (2008). Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Current Opinion in Hematology* *15*, 307–311.