

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA (B11.56.1)

**ESTUDIO DE LA HEMATOPOYESIS Y MEGACARIOPOYESIS
HUMANA A PARTIR DE CÉLULAS MADRE
PLURIPOTENTES HUMANAS.
GENERACIÓN DE MODELOS HUMANOS DE ENFERMEDAD
ASOCIADOS A TRASTORNOS PLAQUETARIOS RAROS**

STUDY OF HUMAN HEMATOPOIESIS AND MEGAKARYOPOIESIS
FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS. GENERATION OF
HUMAN DISEASE MODELS OF RARE PLATELET DISORDERS



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

**TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL
INTERNATIONAL PhD THESIS**

MARÍA DEL MAR BONILLO LAMOLDA

OCTUBRE 2019

GRANADA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María del Mar Bonillo Lamolda
ISBN: 978-84-1306-383-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/58252>

ÍNDICE

Resumen	13
Abstract	19
Abreviaturas.....	25
Introducción.....	33
1. Células madre pluripotentes humanas (hPSC)	35
1.1. Embriogénesis humana	35
1.2. Definición y características de las hPSC	38
1.3. Tipos de hPSC.....	41
1.3.1. hESC.....	41
1.3.2. hiPSC	43
1.4. Aplicaciones potenciales de las hPSC	45
1.5. Aspectos éticos relacionados con la investigación de hPSC	48
2. Hematopoyesis.....	51
2.1. Desarrollo hematopoyético embrionario	51
2.2. Desarrollo hematopoyético adulto.....	55
2.2.1. Homeóstasis y quiescencia de las HSC	55
2.2.2. Jerarquía de la hematopoyesis adulta	56
2.3. Regulación del desarrollo hematopoyético embrionario	59
2.3.1. Regulación transcripcional de la hematopoyesis primitiva	60
2.3.2. Regulación transcripcional de la hematopoyesis definitiva	60
2.4. RUNX1 la hematopoyesis.....	63
2.4.1. Organización genómica e isoformas de RUNX1	64
2.4.2. RUNX1 en la hematopoyesis embrionaria	66
2.4.3. RUNX1 en enfermedades hematológicas.....	70
2.5. Generación de HSC a partir de hPSC.....	71
3. Megacariopoyesis y Trombopoyesis.....	74
3.1. Megacariopoyesis	74
3.2. Trombopoyesis	74
3.2.1. Organización estructural de las plaquetas	75
3.2.2. Funciones de las plaquetas	75
3.3. El papel de la hipoxia en la megacariopoyesis.....	77
3.3.1. Regulación de la hipoxia.....	78
3.4. Jerarquía de la megacariopoyesis	79
3.5. Regulación molecular de la megacariopoyesis y la trombopoyesis	81
3.6. TAL1/SCL en la hematopoyesis y megacariopoyesis.....	84
3.6.1. Organización genómica de TAL1/SCL.....	85

3.6.2. Regulación del desarrollo hematopoyético embrionario.....	85
3.6.3. Regulación del linaje megacariocítico.....	86
3.7. Generación de megacariocitos y plaquetas a partir de hPSC	87
3.8. Trastornos plaquetarios hereditarios.....	88
3.8.1. Trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM)	95
3.8.2. Síndrome de Bernard-Soulier (BSS)	98
3.8.2.1. Estructura y función del complejo glicoproteico GPIb-IX-V	98
3.8.2.2. Fenotipo de BSS.....	100
3.8.2.3. Genotipo de BSS	100
Hipótesis	104
Objetivos	108
Materiales y métodos	112
1. Objetivo 1. Estudiar el papel de RUNX1 en el desarrollo de la hematopoyesis humana empleando hPSC como modelo de estudio.....	114
1.1. Cultivo de líneas hiPSC	114
1.2. Estrategia de clonaje, vectores lentivirales y transducción.....	114
1.3. Expresión de las isoformas de <i>RUNX1</i> por qPCR	115
1.4. Expresión de las isoformas de <i>RUNX1</i> por Western Blot.....	116
1.5. Análisis de pluripotencia	116
1.6. Diferenciación hematopoyética.....	117
1.7. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU)	120
1.8. Análisis estadístico	121
2. Objetivo 2. Optimizar la generación de células hematopoyéticas de linaje megacariocítico mimetizando el ambiente fisiológico de la médula ósea empleando hPSC.	122
2.1. Cultivo de líneas hESC.....	122
2.2. Análisis de pluripotencia	122
2.3. Diferenciación a megacariocitos mediante co-cultivo con células OP9 ...	122
2.4. Estudio combinado del papel de la hipoxia y SCL en la megacariopoyesis de hESC.....	125
2.4.1. Western Blot.....	125
2.5. Análisis estadístico	126

3. Objetivo 3. Generar y validar modelos humanos de enfermedades hematopoyéticas a partir de hPSC.....	127
3.1. Generar un modelo humano del Trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM).	127
3.1.1. Reprogramación celular de un paciente con FPDMM	127
3.1.2. Cultivo celular de las células reprogramadas.....	128
3.1.3. Caracterización celular de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73	128
3.1.3.1. Análisis mutacional	129
3.1.3.2. Análisis de polimorfismo (STR).....	130
3.1.3.3. Análisis de expresión de los factores de reprogramación .	130
3.1.3.4. Análisis de pluripotencia	131
3.1.3.5. Cariotipado	131
3.1.3.6. Análisis de fosfatasa alcalina	131
3.1.3.7. Ensayos de diferenciación <i>in vitro</i> (EBs)	132
3.1.3.8. Ensayos de diferenciación <i>in vivo</i> (Teratomas)	132
3.2. Validar el rescate génico del modelo humano del Síndrome de Bernard-Soulier (BSS) previamente generado por células primarias de pacientes de dicha enfermedad.....	133
3.2.1. Cultivo celular de las líneas hiPSC	133
3.2.2. Análisis de expresión de <i>GP9</i>	133
3.2.3. Análisis de pluripotencia	134
3.2.4. Diferenciación a células de linaje megacariocítico	134
3.2.5. Técnica ImageStream.....	135
3.2.6. Análisis estadístico	136
Resultados	138
Objetivo 1. Estudiar el papel de RUNX1 en el desarrollo de la hematopoyesis humana empleando hPSC como modelo de estudio.....	140
1. Analizar la función de las isoformas del gen <i>RUNX1</i> durante la diferenciación hematopoyética.....	140
1.1. Análisis de la expresión ectópica de las isoformas del gen RUNX1.....	140
1.2. Expresión proteica de las isoformas del gen <i>RUNX1</i>	141
1.3. Expresión de los genes de pluripotencia	143
1.4. Diferenciación hematopoyética.....	145
1.4.1. Obtención de progenitores endoteliales	145

1.4.2. Obtención de progenitores hemato-endoteliales (HEP)	146
1.4.3. Formación de progenitores hematopoyéticos.....	148
1.4.4. Ensayos de CFU hematopoyéticos	150
Objetivo 2. Optimizar la generación de células hematopoyéticas de linaje megacariocítico mimetizando el ambiente fisiológico de médula ósea empleando hPSC	152
2.1. Análisis de pluripotencia.....	152
2.2. Estudio del efecto de la hipoxia en la diferenciación megacariocítica de hPSC	153
2.2.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas CD34 ⁺	153
2.2.2. Formación de células CD41a ⁺ CD42b ⁺ de linaje megacariocítico ..	154
2.3. Estudio del efecto combinado de la hipoxia y la expresión de SCL en la diferenciación megacariocítica de hPSC.	157
2.3.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas CD34 ⁺	157
2.3.2. Formación de células megacariocíticas CD41a ⁺ CD42b ⁺	158
2.3.3. Análisis de la degradación de SCL por hipoxia	159
Objetivo 3. Generar y validar modelos humanos de enfermedades hematopoyéticas a partir de hPSC	162
3.1. Generación de un modelo humano del Trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM).....	162
3.1.1. Selección y expansión clonal post-transducción con SeV.....	162
3.1.2. Análisis mutacional del <i>locus RUNX1</i>	164
3.1.3. Análisis de STR	164
3.1.4. Silenciamiento de los factores de reprogramación.....	165
3.1.5. Estudio de pluripotencia.....	166
3.1.6. Análisis de la actividad enzimática fosfatasa alcalina.....	167
3.1.7. Estudio citogenético por bandeo GTG	167
3.1.8. Ensayos de diferenciación <i>in vitro</i>	168
3.1.9. Ensayos de diferenciación <i>in vivo</i>	169
3.2. Validar el rescate génico del modelo humano del Síndrome de Bernard-Soulier (BSS)	170
3.2.1. Expresión del gen GP9	170
3.2.2. Pluripotencia de las líneas BSS2	171
3.2.3. Diferenciación a células de linaje megacariocítico	173

3.2.3.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas CD34 ⁺	173
3.2.4.2. Obtención de progenitores megacariocíticos CD34 ⁺ CD41a ⁺	174
3.2.4.3. Formación de células CD41a ⁺ CD42a ⁺ de linaje megacariocítico	176
3.2.5. Expresión de la proteína GPIX.....	178
Discusión	181
Conclusiones	197
Conclusions	202
Bibliografía	207

RESUMEN

Históricamente, el estudio de la biología del desarrollo se ha efectuado en organismos modelos clásicos. Recientemente, las células madre pluripotentes humanas (hPSC), que incluyen tanto a las células madre embrionarias humanas (hESC) como a las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), han surgido como un nuevo modelo ofreciendo ventajas únicas para los estudios del desarrollo. Las hPSC pueden recapitular aspectos del desarrollo embrionario humano a la vez que mantienen la capacidad de diferenciarse a cualquier linaje celular del organismo humano. Además, las hPSC suponen un potente recurso en medicina regenerativa como fuente potencial de células maduras funcionales capaces de reconstituir órganos o tejidos en individuos con distintas patologías. Hasta ahora, los ensayos clínicos realizados con hPSC han mostrado resultados prometedores. El campo de la medicina regenerativa también aborda la terapia génica en hPSC como tratamiento de enfermedades genéticas mediante la edición génica de las células del paciente. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes es la falta de funcionalidad de algunos tipos celulares obtenidos a partir de hPSC, como las células madre hematopoyéticas (HSC). Por ello es necesario seguir avanzando en esta área de investigación.

La hematopoyesis es un proceso complejo que se inicia durante el desarrollo embrionario temprano y será responsable de originar todas las células hematopoyéticas del individuo a lo largo de su vida. La hematopoyesis embrionaria se divide en dos etapas: la hematopoyesis primitiva y definitiva. La primera etapa se compone de la oleada 1 originando eritrocitos, macrófagos y megacariocitos primitivos que permiten la oxigenación del embrión y su crecimiento. La segunda etapa está constituida por la oleada 2, que produce progenitores eritro-mieloides y linfoides multipotentes con características fetales y adultas, y por la oleada 3 que genera las HSC que migran al hígado fetal y posteriormente a la médula ósea donde permanecen de por vida sosteniendo al sistema hematopoyético adulto. La regulación espacio-temporal de la hematopoyesis está controlada por diversos factores de transcripción. Uno de los más importantes es RUNX1, cuya expresión está controlada por dos promotores y depende del *splicing* alternativo de sus exones que produce numerosas isoformas, de las cuales las 3 más estudiadas son RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c. La función de cada isoforma no está bien definida, especialmente en humanos. Nuestro primer objetivo es estudiar la función de las isoformas de RUNX1 en la hematopoyesis humana usando hPSC como modelo biológico. En primer lugar generamos líneas hiPSC que sobre-expresan las isoformas de RUNX1 y examinamos su efecto en la diferenciación hematopoyética *in vitro*. Observamos que RUNX1a incrementa la formación de progenitores hemato-endoteliales (HEP) y hematopoyéticos CD41a⁺CD45⁺ durante la diferenciación, mientras que la obtención de progenitores megacariocíticos-eritroides (MEP) CD41a⁺CD235a⁺ sólo se detectó a días tempranos de la diferenciación. En cambio, RUNX1b y RUNX1c aumentan la generación de HEP y progenitores CD41a⁺CD45⁺ a días tempranos de la diferenciación. Además, RUNX1b reduce la generación de progenitores MEP y RUNX1c promueve su formación a días tempranos de la diferenciación. A continuación, estudiamos la capacidad clonogénica de las diferentes isoformas y observamos que RUNX1a presenta un potencial clonogénico menor al control, mientras que RUNX1b no es capaz de originar colonias hematopoyéticas. Por el contrario, RUNX1c presenta un aumento de la capacidad clonogénica. Estos resultados indican que las isoformas de RUNX1 poseen diferentes funciones durante la hematopoyesis de hiPSC, siendo

RUNX1a y RUNX1c las isoformas de mayor relevancia durante la diferenciación hematopoyética.

Las transfusiones de plaquetas son esenciales para tratar a pacientes con trombocitopenias que muestran un descenso del número de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo. Actualmente, la sangre periférica de donantes sanos es la única fuente de plaquetas en clínica. Idealmente, podríamos usar plaquetas funcionales generadas *in vitro* a partir de HSC derivadas del paciente, pero el problema radica en que el cultivo y la expansión *ex vivo* de HSC es muy limitado. Una alternativa más eficiente, sería el uso de hPSC como fuente constante de plaquetas para uso clínico. Aunque se han logrado algunos avances en este campo, la producción de plaquetas a partir de hPSC sigue siendo ineficiente y se requieren protocolos más efectivos. Reproducir las condiciones fisiológicas del nicho de la médula ósea podría potenciar la generación de megacariocitos y plaquetas derivadas de hPSC. El crecimiento y la formación de los megacariocitos ocurren en el nicho osteoblástico a bajas concentraciones de O₂, mientras que la maduración de los megacariocitos ocurre en el nicho vascular a una mayor concentración de O₂, donde se liberan las plaquetas. Nuestro segundo objetivo consiste en analizar el papel de la hipoxia en la megacariopoyesis de hPSC. Para realizar estos estudios, llevamos a cabo la diferenciación a megacariocitos de hPSC, empleando diferentes condiciones de O₂ (2% O₂ y 5% O₂). Nuestros resultados demuestran que la hipoxia reduce la viabilidad celular de las hPSC seleccionando los progenitores hematopoyéticos CD34⁺ de mayor potencial megacariopoyético. Cabe destacar que la condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) incrementa el número de megacariocitos y de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺ derivados de hPSC. Además, nuestro grupo demostró que la expresión ectópica de SCL potenciaba la megacariopoyesis de hPSC. Por tanto, combinamos el efecto de la hipoxia y la sobre-expresión de SCL para estudiar la megacariopoyesis de hPSC. En contraste a nuestra hipótesis de partida, la hipoxia reduce la producción de megacariocitos en hPSC que sobre-expresan SCL. Análisis moleculares más detallados demostraron que las condiciones hipóxicas aceleran la degradación de SCL por el proteosoma mediado por su fosforilación a través de MAPK. Estos resultados nos permiten ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares que controlan la megacariopoyesis humana a partir de hPSC, así como la mejora de los protocolos actuales de diferenciación megacariocítica.

Históricamente, el empleo de hiPSC se ha basado en la generación *in vitro* de modelos humanos de enfermedad. Por tanto, disponemos de un modelo ideal para estudiar los aspectos moleculares y funcionales implicados en el desarrollo de enfermedades, además de poder desarrollar nuevos enfoques terapéuticos. El trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM) es una enfermedad plaquetaria rara, causada por mutaciones en el gen *RUNX1* y caracterizada por presentar trombocitopenia, función plaquetaria anormal y un mayor riesgo de desarrollar otros trastornos sanguíneos o cánceres. Proponemos generar un modelo humano de FPDMM con una mutación no reportada en el exón 6 de *RUNX1*. Generamos una línea hiPSC mediante la reprogramación celular de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de una paciente con FPDMM, empleando virus Sendai no integrativos que expresan los factores de reprogramación de

Yamanaka. Mediante análisis funcionales y genéticos completamos la caracterización de la nueva línea celular hiPSC. En primer lugar, se confirmó la presencia de la mutación en *RUNX1* por secuenciación Sanger. Análisis de polimorfismos (STR) demostraron la identidad genética entre las PBMC de la paciente y la línea celular hiPSC. Mediante RT-PCR se comprobó el silenciamiento de los genes exógenos de reprogramación y la activación de los genes endógenos de pluripotencia. Además, la expresión de marcadores de pluripotencia se demostró por citometría de flujo. La línea hiPSC mostró un cariotipo normal y actividad positiva para fosfatasa alcalina. Finalmente, para comprobar la capacidad de diferenciación a las tres capas germinales del embrión de la nueva línea hiPSC, se realizaron ensayos funcionales de formación de cuerpos embrionarios y formación de teratomas. En ambos casos, se demostraron estructuras específicas de endodermo (epitelio ciliado), mesodermo (cartílago) y ectodermo (rosetas neurales). Además, también detectamos la expresión de marcadores representativos de las tres capas germinales. La generación de esta línea representa una gran herramienta para estudiar la biología de esta enfermedad, y además nos permite aplicar nuevas terapias para el tratamiento de FPDMM, como la corrección fenotípica mediante terapia génica o ensayo de nuevos fármacos.

Finalmente, nuestro laboratorio había generado varios modelos celulares del Síndrome de Bernard-Soulier (BSS) deficientes en *GP9*. Esta enfermedad es un trastorno plaquetario monogénico poco frecuente, causado por la deficiencia congénita del complejo glicoproteico GPIb-IX-V debido a mutaciones en *GP1BA*, *GP1BB* o *GP9* y caracterizado por macrotrombocitopenia y sangrados severos. Nuestro último objetivo se centró en validar uno de estos modelos de enfermedad y su correspondiente línea hiPSC rescatada por terapia génica lentiviral mediante la expresión del gen silvestre *GP9*. Realizamos la diferenciación megacariocítica de las líneas hiPSC generadas. Observamos que ambas líneas producen progenitores hematopoyéticos $CD34^+$, progenitores megacariocíticos $CD34^+CD41a^+$ y células $CD41a^+$, de forma similar. Durante la evaluación de la diferenciación megacariocítica terminal de estos precursores, confirmamos que las células no rescatadas son incapaces de progresar y generar megacariocitos maduros $CD42a^+$ y $CD41a^+CD42a^+$. Sin embargo, y de forma destacada las células rescatadas son capaces de progresar y madurar hasta megacariocitos maduros $CD41a^+CD42a^+$. Estos resultados muestran que la terapia génica ha sido eficiente al restaurar la expresión de GPIX en la membrana de los megacariocitos y además puede convertirse en una aproximación terapéutica en un futuro próximo para pacientes con BSS que presentan mutaciones en *GP9*.

ABSTRACT

Developmental biology has long benefited from classical model organisms studies. Recently, human pluripotent stem cells (hPSC), including human embryonic stem cells (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPSC), have emerged as a new model system that offers unique advantages for developmental studies. hPSC are able to recapitulate aspects of embryonic development while maintaining the ability to become any cell lineage in the human body. In addition, hPSC are very useful in regenerative medicine as a potential source of functional mature cells to reconstitute organs or tissues in individuals with different pathologies. So far, hPSC have been included in clinical trials with promising results. The regenerative medicine field also includes gene therapy in hPSC as a treatment for genetic diseases based on gene editing of the patients' cells. However, one of the main problems is the lack of functionality of some cell types obtained from hPSC, such as hematopoietic stem cells (HSC). Therefore it is necessary to continue advancing in this research area.

Hematopoiesis is a complex process that begins during early embryonic development and will be responsible to originate all hematopoietic cells of the individual throughout his entire life. Embryonic hematopoiesis is divided into two stages: primitive and definitive hematopoiesis. The first stage contains "wave 1" that generates primitive erythrocytes, macrophages and megakaryocytes that allow embryo oxygenation and growth. The second stage constituted by "wave 2", which produces erythro-myeloid and multipotent lymphoid progenitors with fetal and adult characteristics, and by "wave 3" consisted on HSC migration to the fetal liver and subsequently to the bone marrow where they remain for life maintaining the whole adult hematopoietic system. The spatio-temporal regulation of hematopoiesis is controlled by several transcription factors. One of the most important is RUNX1, whose expression is regulated by two alternative promoters and depends on alternative splicing of its exons producing numerous isoforms. From them RUNX1a, RUNX1b and RUNX1c are the 3 most studied. The function of each isoform is not well defined yet, especially in humans. Our first objective is to study the function of RUNX1 isoforms in human hematopoiesis using hPSC as a biological model. First, we generated hiPSC lines overexpressing RUNX1 isoforms and examined their effect on hematopoietic differentiation *in vitro*. We observed that RUNX1a increases the production of hemato-endothelial progenitors (HEP) and CD41a⁺CD45⁺ hematopoietic progenitors during differentiation, while the generation of CD41a⁺CD235a⁺ megakaryocytic-erythroid progenitors (MEP) was only detected at early days of differentiation. In contrast, RUNX1b and RUNX1c isoforms increased the generation of HEP and CD41a⁺CD45⁺ progenitors at early days of differentiation. Besides, RUNX1b reduced the generation of MEP, while RUNX1c promoted MEP formation at early days of differentiation. Next, we studied the clonogenic capacity of the different isoforms and we observed that RUNX1a has a lower clonogenic potential compared to wild type cells, while RUNX1b was not capable to produce hematopoietic colonies. In contrast, RUNX1c presented an increase in the clonogenic capacity. These results indicate that RUNX1 isoforms have different functions during human embryonic hematopoiesis, being RUNX1a and RUNX1c the most relevant isoforms during hematopoietic differentiation.

Platelet transfusions are essential to treat patients with thrombocytopenias who show a decrease in the number of circulating platelets in the bloodstream. Nowadays, peripheral blood from healthy donors is the only source of platelets in clinic. Ideally, we

could use functional platelets generated *in vitro* from HSC derived from the patient, but the problem is that the *ex vivo* culture and expansion of HSC is very limited. hPSC become a more efficient alternative that could be used as a continuous source of platelets for clinical use. Although there have been some advances in this field, platelet production from hPSC remains inefficient and more effective protocols are required. Mimicking physiological conditions of the bone marrow niche can be a helpful improvement. The growth and formation of megakaryocytes occurs in the osteoblastic niche at low O₂ concentrations, while megakaryocytic maturation occurs in the vascular niche at a higher O₂ concentration, where platelets are released. Our second aim will be to study the role of hypoxia in megakaryopoiesis from hPSC. To complete these studies we performed megakaryocyte differentiation at different O₂ conditions (2% O₂ and 5% O₂). Our results demonstrated that hypoxia reduces the cellular viability of hPSC by selecting CD34⁺ hematopoietic progenitors with the highest megakaryopoietic potential. Importantly, the physiological condition (2% O₂- 5% O₂) increases the number of both CD41a⁺CD42b⁺ megakaryocytes and platelets derived from hPSC. Moreover, our group showed that SCL-overexpression potentiated megakaryopoiesis from hPSC. So, we combined the effects of hypoxia and SCL over-expression to study megakaryopoiesis of hPSC. In contrast to our original hypothesis, hypoxia reduced megakaryocyte production in SCL-overexpressing hPSC. A more detailed molecular analysis showed that SCL is degraded under hypoxic conditions by the proteasome in a MAPK-dependent manner. These results allow us to increase our understanding of the molecular mechanisms controlling human megakaryopoiesis from hPSC, as well as the improvement of current megakaryocyte differentiation protocols.

hiPSC have been historically used to generate human disease models in a dish. In that way, we will have an ideal model to study molecular and functional aspects of the diseases and also it will help us to develop new therapeutic approaches. Familial platelet disorder with associated myeloid malignancy (FPDMM) is a rare platelet disorder caused by mutations in *RUNX1* gene, characterized by thrombocytopenia, abnormal platelet function and an increased risk of developing other blood disorders or cancers. We propose to generate a human FPDMM model with a non-previously reported mutation in exon 6 of *RUNX1*. We generated a hiPSC line by cellular reprogramming of PBMC from a FPDMM patient using non-integrative Sendai viruses expressing Yamanaka reprogramming factors. Through functional and genetic analyses we completed the characterization of the new hiPSC cell line. First, the presence of the *RUNX1* mutation was confirmed by Sanger sequencing. STR analysis demonstrated the genetic identity between the original mononuclear cells from the patient and the hiPSC cell line. RT-PCR verified the silencing of exogenous reprogramming genes and the activation of endogenous pluripotency genes. Also, the expression of surface pluripotency markers was demonstrated by flow cytometry. The new hiPSC line showed a normal karyotype and positive activity for alkaline phosphatase. Finally, to demonstrate the capacity of hiPSC line to differentiate into the three germ layers *in vitro* and *in vivo*, embryoid bodies and teratoma formation assays were accomplished. In both cases, specific structures from endoderm (ciliated epithelium), mesoderm (cartilage) and ectoderm (neural rosettes) were demonstrated. Besides, we also detected the expression of representative markers of the three germ layers. The generation of this line represents a great tool to study the biology of this

disease, and also allows us to apply new therapies for the treatment of FPDMM, such as phenotypic correction by gene therapy or testing of new drugs.

Finally, our laboratory had generated several models of Bernard-Soulier syndrome (BSS) deficient in *GP9*. This disease is a rare monogenic platelet disorder caused by congenital deficiency of the GPIb-IX-V glycoprotein complex due to mutations in *GP1BA*, *GP1BB* or *GP9* and characterized by macrochrombocytopenia and severe bleeding. Our last aim was to validate one of this disease model and its corresponding rescued hiPSC cell line, in which *GP9* wildtype gene was introduced by lentiviral vectors. We performed the megakaryocytic differentiation in both hiPSC lines. We observed that both produced $CD34^+$ hematopoietic progenitors, $CD34^+CD41a^+$ megakaryocyte progenitors and $CD41a^+$ cells, in a similar way. Interestingly, during the evaluation of the terminal megakaryocytic differentiation of these precursors, we confirmed that the original non-rescued hiPSC cells were unable to progress and to generate $CD42a^+$ and $CD41a^+CD42a^+$ mature megakaryocytic cells. However, GP9-rescued cells were able to progress and produced mature megakaryocytes. These results show that gene therapy has been efficient to restore GPIX expression on megakaryocytes' surface and can also become a therapeutic approach for patients with BSS carrying *GP9* mutations in the next future.

.

ABREVIATURAS

7AAD: 7-aminoactinomicina D

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

AGM: Aorta-gonada-mesonefros

AGM: del inglés Aorta Gonad Mesonephros, región Aorta-Gónada-Mesonefros

ALL: del inglés Acute Lymphoblastic Leukemia, Leucemia Linfoblástica Aguda

AML: del inglés Acute Myeloid Leukemia, Leucemia Mieloide Aguda

AML1: del inglés Acute Myeloid Leukemia 1

AML1: del inglés Acute Myeloid Leukemia 1

APC: Aloficocianina

APC-Cy7: Aloficocianina-cianina 7.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BMP4: del inglés Bone Morphogenetic Protein 4, Proteína Morfogénica Ósea 4.

BNLC: Banco Nacional de Líneas Celulares

BSS: del inglés, Bernard-Soulier Syndrome, Síndrome de Bernard-Soulier.

CBF: del inglés Core binding factor

CBF: del inglés Core binding factor

CBF β : Core binding factor β

CBF β : del inglés, Core Binding Factor β

CD235a: GYPA, del inglés Glycophorin A, Glicoforina A.

CD31: PECAM1, del inglés Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1, Molécula de Adhesión Celular entre Plaquetas y Endotelio 1.

CD41a: ITGA2B, del inglés Integrin subunit alpha 2b, Integrina subunidad alfa 2b.

CD42a: Glicoproteína IX plaquetaria

CD42b: Glicoproteína GPIb α plaquetaria

CD43: SPN, del inglés Sialophorin o Leukosialin, Sialoforina o Leucosialina.

CD45: PTPRC, del inglés Protein Tyrosin Phosphatase receptor type C, Receptor tipo C de Protein Tirosin Fosfatasa.

CFU: del inglés Colony Forming Units, Unidades Formadoras De Colonias

CFU-E: unidades formadoras de colonias de eritrocitos.

CFU-G: unidades formadoras de colonias de granulocitos

CFU-GM: unidades formadoras de colonias de granulocitos y monocitos.

CFU-M: unidades formadoras de colonias de monocitos

CKAE1AE3: del inglés Cytokeratin AE1/AE3, Citoqueratina AE1/AE3

CKI p57: del inglés Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, Inhibidor de Quinasa dependiente de Ciclina

CLP: del inglés Common Lymphoid Progenitor, Progenitor Linfoide Común

CMML, del inglés Chronic Myelomonocytic Leukemia, Leucemia Mielomonocítica Crónica

CMP: del inglés Common Myeloid Progenitor, Progenitor Mieloide Común

EBs: del inglés Embryoid Bodies, cuerpos embrionarios.

EDTA: del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid, Acido etilendiaminotetraacetico

EF1 α : promotor del gen elongation factor 1 α

EGFP: Enhanced Green fluorescent protein

EHT: del inglés Endothelium-Hematopoiesis Transition, Transición Endotelio-Hematopoyesis

EKLF: del inglés, Erythroid Krüppel-Like Factor

EMP: del inglés Erythro-Myeloid Progenitor, Progenitor Eritro-Mieloide

EV: del inglés Empty Vector, Vector Vacío

FBS: del inglés Fetal Bovine Serum, Suero Bovino Fetal

FDA: del inglés, Food and Drug Administration, Administración de Alimentos y Medicamentos

FDP/AML: del inglés Familial Platelet Disorder with predisposition to Acute Myeloid Leukemia, Trastorno Plaquetario Familiar Con Predisposición A Leucemia Mieloide Aguda

FGF2: del inglés, Fibroblastic Growth Factor 2, Factor de Crecimiento Fibroblastico 2.

FISH: del inglés Fluorescence In Situ Hybridization, Hibridación In Situ Fluorescente

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FIV: Fertilización in vitro

FLNA: del inglés Filamin A, Filamina A

FPDMM: del inglés Familial Platelet Disorder with Associated Myeloid Malignancy, Trastorno Plaquetario Familiar Con Neoplasia Mieloide Asociada

Fw: del inglés Forward, oligonucleótido complementario a la cadena – del ADN en dirección 5'-3'.

GAPDH: del inglés Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: del inglés Green Fluorescent Protein, Proteína Verde Fluorescente

GMP: del inglés Granulocyte-Monocyte Progenitor, Progenitor Bipotente Granulocito-Monocito

HEC: del inglés Haemogenic Endothelial Cells, Células Endoteliales Hemogénicas

HEP: del inglés Hemato-Endothelial Progenitors, Progenitores Hemato-Endoteliales.

hESC: del inglés, human Embryonic Stem Cells, Células Madre Embrionarias Humanas

HIF: del inglés Hypoxia-Inducible Factor, Factor Inducible por Hipoxia

hiPSC: del inglés human induced Pluripotent Stem Cells, Células Madre Pluripotentes Inducidas Humanas

HLA: del inglés Human Leukocyte Antigen, Antígeno Leucocitario Humano.

HLH: del inglés Helix-Loop-Helix

hMSC: del inglés human Mesenchymal Stem Cells, Células Madre Mesenquimales Humanas

HOX: del inglés Homeobox Genes.

HPC: del inglés Hematopoietic Progenitor Cells, Células Progenitoras Hematopoyéticas

hPSC: del inglés human Pluripotent Stem Cells, Células Madre Pluripotentes Humanas

HSC: del inglés Hematopoietic Stem Cells, Células Madre Hematopoyéticas

ICM: del inglés Inner Cell Mass, Masa Celular Interna

IL3: del inglés Interleukin 3, Interleucina 3.

IL6: del inglés Interleukin 6, Interleucina 6.

ISSCR: del inglés International Society for Stem Cell Research, Sociedad Internacional para la Investigación de Células Madre

JAK: del inglés Janus kinase, quinasa Janus

LAD-III: del inglés Leukocyte Adhesion Deficiency, Síndrome de Deficiencia de Adhesión Leucocitaria III

LMPP: del inglés Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor, Progenitor Linfoide Multipotente

LT-HSC: del inglés Long Term HSC, Células Madre Hematopoyéticas a Largo Plazo

LTR: del inglés Long Terminal Repeat

MEP: del inglés Megakaryocyte-Erythroid Progenitor, Progenitor Megacariocito-Eritroide

mESC: del inglés mouse Embryonic Stem Cells, Células Madre Embrionarias De Ratón

miPSC: del inglés, mouse induced Pluripotent Stem Cells, Células Madre Pluripotentes Inducidas De Ratón

MLP: del inglés Multilymphoid Progenitor, Progenitor Multilinfoide

MOI: del inglés Multiplicity of Infection, Multiplicidad de infección. Número de partículas virales infectivas/célula

MPP: del inglés Multipotent Progenitors, Progenitores Multipotentes

MYH9: del inglés Myosin Heavy Chain 9, Miosina 9

Neo: gen que codifica para la proteína aminoglicósido 3' fosfotransferasa, que inactiva por fosforilación los antibióticos aminoglicósidos.

NK: del inglés, Natural Killers, células asesinas

OP9: línea celular establecida a partir del estroma de la medula ósea de ratones

PBS: del inglés Phosphate Buffered Saline, Tampon Fosfato Salino.

PE: Ficoeritrina

PE-Cy7: Ficoeritrina-Cianina 7

PVDF: del inglés Polyvinylidene Fluoride, Polifluoruro de Vinilideno

PvWD: del inglés, Platelet-type von Willebrand Disease, Enfermedad von Willebrand de tipo plaquetario.

qRT-PCR: del inglés quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. Reacción en cadena de polimerasa de cadenas de ADNc obtenidas mediante transcripción reversa de ARNm.

RHD: del inglés Runt Homology Domain, Dominio de Homología Runt

ROS: del inglés Reactive Oxygen Species, Especies Reactivas de Oxígeno

Rv: del inglés Reverse, oligonucleótido complementario a la cadena + del ADN en dirección 5'-3'.

SATB1: del inglés Special AT-rich sequence-Binding protein 1, proteína 1 de unión a secuencias ricas en AT

SCF: del inglés, Stem Cell Factor, Factor de Células Madre.

SCL: del inglés, Stem Cell Leukemia

SeV: del inglés Sendai virus, virus Sendai

Shh: del inglés, Sonic hedgehog, proteína de la familia hedgehog

SKY: del inglés Spectral Karyotype, Cariotipo Espectral

SNP: del inglés, Single Nucleotide Polimorfism, Polimorfismo de Nucleótido Único

SSPA: Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

STAT: del inglés Signal Transducer and Activator of Transcription, Transductor de señales y activador de la transcripción.

ST-HSC: del inglés Short Term HSC, Células Madre Hematopoyéticas a Corto Plazo

T25: Frasco de cultivo celular de 25 cm²

TAD: del inglés TransActivation Domain, Dominios Reguladores de la Transcripción

TAL1: del inglés T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1

TF: del inglés Transcription Factors, Factores de Transcripción

TGFβ: del inglés Transforming Growth Factor β, Factor de Crecimiento Transformante β

TNFα: del inglés Tumor Necrosis Factor A, Factor De Necrosis Tumoral α.

TPO: del inglés Thrombopoietin, Trombopoyetina.

UTR: del inglés Untranslated Region. Parte no traducida de un gen

VE-cadherin: del inglés, Vascular Endothelial-cadherin, molécula de adhesión endotelial

VEGF: del inglés Vascular Endothelial Growth Factor, Factor de Crecimiento Vascular Endotelial.

vWF: del inglés von Willebrand Factor, Factor von Willebrand

WNT: del inglés Wingless-related Integration Site.

α-MEM: del inglés α-Minimum Essential Medium, α-Medio Esencial Mínimo

INTRODUCCIÓN

1. Células madre pluripotentes humanas (hPSC)

1.1. Embriogénesis humana

La embriogénesis humana es el proceso biológico que se inicia con la formación y el desarrollo del embrión humano (Figura 1). Se caracteriza por un periodo de división y diferenciación celular del embrión que ocurre durante las primeras etapas de desarrollo. El estadio germinal comienza con la fertilización del embrión, proceso que ocurre cuando el espermatozoide se fusiona con el oocito para formar una sola célula llamada cigoto (célula diploide). El cigoto comienza a dividirse por mitosis mediante un proceso llamado escisión. Las células en división, llamadas blastómeras se mantienen indiferenciadas y se agregan formando una esfera dentro de la membrana del óvulo (zona pelúcida). Cuando se forman 8 blastómeras, estas desarrollan uniones gap que les permiten organizarse de forma integrada y coordinada.

Cuando el cigoto alcanza el estadio de unas 16-32 blastómeras, la esfera pasa a llamarse mórula. En esta etapa, las células comienzan a unirse firmemente en un proceso llamado compactación. Las células continúan dividiéndose en la etapa de blastulación que consiste en la formación del blastocisto. Las células de la capa externa se diferencian a una estructura llamada trofoblasto y las células de la capa interna forman la masa celular interna (ICM, del inglés *Inner Cell Mass*). Las células de la ICM se diferencian hasta formar el embrioblasto y la polarización origina una cavidad hueca llamada blastocelo. El aumento de tamaño del blastocisto provoca su eclosión a través de la zona pelúcida que acabará desintegrándose. La ICM dará lugar al pre-embrión formando el saco vitelino, el saco amniótico y el alantoides, mientras que la capa externa del trofoblasto formará la placenta. La zona pelúcida desaparece por completo y las células del trofoblasto permiten que el blastocisto se adhiera al endometrio, donde se producirá la implantación. Las células internas del trofoblasto se convertirán en el hipoblasto (endodermo primitivo), que se rodeará de una capa superior llamada epiblasto (ectodermo primitivo) y estas capas formarán el disco embrionario que se convertirá en el embrión.

Posteriormente, comienza el proceso de gastrulación por el cual el embrión se reorganiza y diferencia hasta originar la gástrula, un disco trilaminar con 3 capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Además, durante la gastrulación el embrión se orienta de forma específica, estableciéndose una simetría bilateral. A partir de las tres capas germinales se desarrollarán todas las estructuras y órganos del cuerpo mediante procesos de somitogénesis, histogénesis y organogénesis. El ectodermo desarrollará la epidermis, el sistema nervioso y los tejidos conectivos. El mesodermo originará las células sanguíneas, el corazón y el sistema circulatorio, el sistema óseo, la musculatura y los riñones. El endodermo dará lugar al sistema digestivo, el hígado, el páncreas y los pulmones¹⁻².

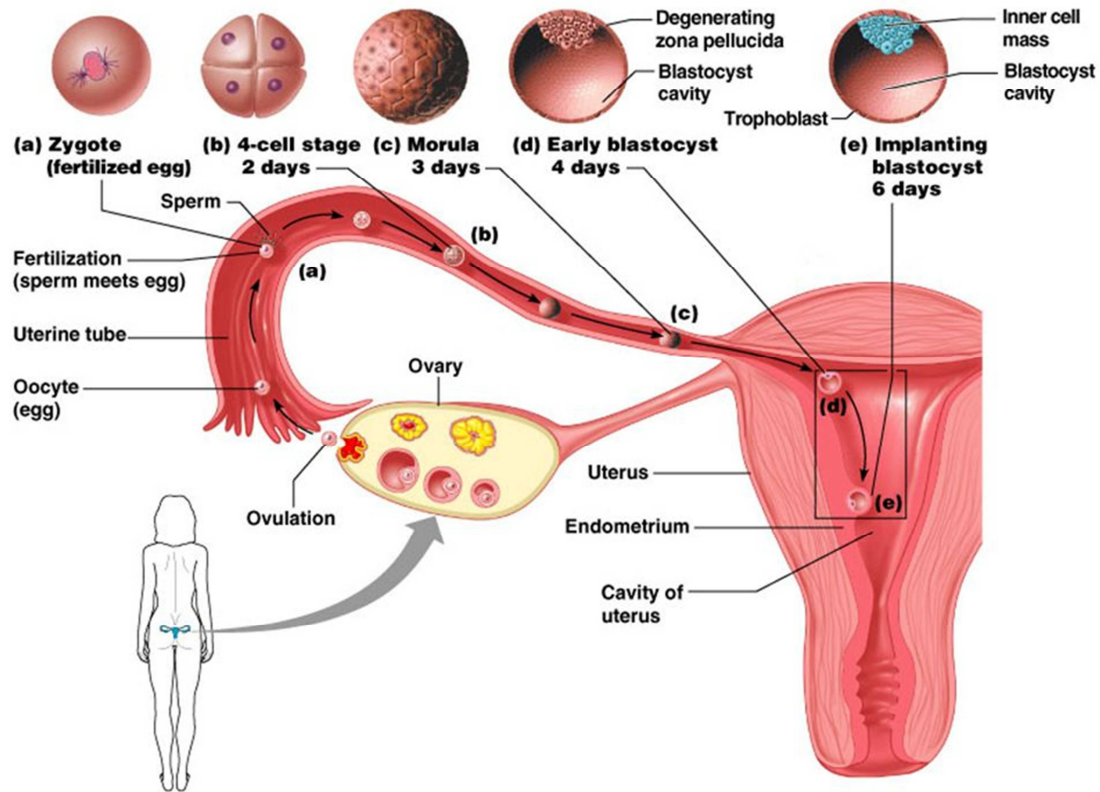


Figura 1. Desarrollo embrionario humano. Tras la fertilización entre el espermatozoide y el oocito se origina el cigoto que comienza a dividirse hasta formar la mórula y posteriormente el blastocisto durante la etapa de blastulación. El blastocisto está formado por el trofoblasto, una cavidad interna y la masa celular interna. Tras la implantación, el embrión se diferencia hasta originar la gástrula, compuesta por las 3 capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) que darán lugar a los tejidos y órganos del cuerpo humano³.

En la actualidad, se ha observado un incremento en los casos de infertilidad a causa de la creciente exposición a contaminantes ambientales y estilos de vida no saludables. A finales del siglo pasado, se desarrollaron diversas técnicas de reproducción asistida para dar la oportunidad de tener hijos a parejas infértiles. Estas tecnologías incluyen la administración de sustancias para inducir la ovulación, la inseminación artificial y los métodos de fertilización *in vitro* (FIV). En 1969, Edwards y Steptoe desarrollaron las primeras investigaciones sobre la FIV en humanos estableciendo las bases del procedimiento⁴⁻⁵. Años después, tras profundizar en el estudio de la reproducción asistida lograron concebir al primer ser humano mediante FIV⁶. Los últimos avances en reproducción asistida, así como la mejora en el manejo, cultivo y almacenamiento de los embriones han permitido crear un excedente de embriones humanos para ser utilizados con fines reproductivos y para investigación.

Los embriones humanos pre-implantación que se utilizan en investigación se obtienen generalmente de embriones descartados en el proceso de reproducción asistida al ser considerados de muy baja calidad o de embriones sobrantes tras los tratamientos de reproducción. En este último caso, cuando el parto se ha completado con éxito las parejas tienen varias opciones para los embriones almacenados⁷:

- Mantener a los embriones criopreservados para futuros embarazos de la pareja. Los embriones criopreservados en fase de blastocisto pueden conservarse durante cinco años, según lo reglamenta el R.D. 413/1996. Una vez transcurrido este tiempo deben ser destruidos o donados para investigación.
- Desechar a los embriones
- Donar a los embriones, con fines reproductivos para otras parejas o para investigación, siempre que haya un banco de embriones dispuesto a aceptarlos.

Sólo los embriones donados a la ciencia con el correspondiente consentimiento informado de las parejas y aprobación del comité ético correspondiente pueden usarse en investigación. La disponibilidad de embriones humanos para estudios de desarrollo en investigación implica una serie de problemas éticos y legales que restringen notablemente su uso. En un principio, sólo se podía acceder a embriones humanos en caso de abortos espontáneos. Recientemente, gracias al desarrollo de la FIV la mayoría de los países permiten cultivar embriones legalmente hasta el día 14 del desarrollo *in vitro*, lo que permite llevar a cabo estudios más detallados del desarrollo embrionario humano pre-implantacional. En cambio, el estudio del periodo post-implantación es muy complicado dado que la única manera es a través de embriones derivados de abortos consentidos mediante la obtención del consentimiento informado y la correspondiente aprobación de un comité ético para su uso en investigación⁷.

Por tanto, es necesario buscar modelos alternativos para el estudio del desarrollo embrionario humano. En 1981, los investigadores Evans, Kaufman y Martin consiguieron aislar y cultivar células de la ICM de embriones de ratón a las cuales denominaron células madre de ratón (mESC, del inglés *mouse Embryonic Stem Cells*)⁸⁻⁹. A partir de ese momento, se han llevado a cabo grandes avances en la obtención de células embrionarias de otras especies culminando con la generación de las primeras células madre embrionarias humanas (hESC, del inglés *human Embryonic Stem Cells*) en 1998 por el grupo del Dr. Thomson¹⁰. Años más tarde, en 2006 el grupo del Dr. Yamanaka logró revolucionar el campo de la investigación con células madre logrando generar las primeras células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos adultos o de embriones de ratón, denominadas miPSC (del inglés, *mouse induced Pluripotent Stem Cells*). Estas células presentaban la misma morfología y propiedades de crecimiento que las mESC¹¹. Posteriormente, en 2007 el mismo grupo de investigación generó células madre pluripotentes inducidas de humano (hiPSC, del inglés *human induced Pluripotent Stem Cells*) mediante la reprogramación de fibroblastos humanos adultos. Estas células poseían las mismas características que las hESC¹². En paralelo, el grupo del Dr. Thomson también generó hiPSC a partir de células somáticas humanas¹³.

1.2. Definición y características de las hPSC

Las células madre pluripotentes humanas (hPSC, del inglés *human Pluripotent Stem Cells*) son células con capacidad de auto-renovación, crecimiento ilimitado *in vitro* y potencialidad para diferenciarse a cualquier linaje celular representativo de las tres capas germinales de un embrión en desarrollo (ectodermo, mesodermo y endodermo)¹⁴.

Las hPSC poseen mecanismos moleculares y rutas de señalización que controlan la capacidad de auto-renovación y diferenciación a cualquier linaje celular del organismo. Se han identificado tres factores de transcripción (TF, del inglés *Transcription Factors*) claves que controlan el mantenimiento del estado pluripotente y son OCT4, SOX2 y NANOG. OCT4, SOX2 y NANOG constituyen el núcleo transcripcional, ya que su expresión es fundamental para establecer la identidad celular de las células madre y para el desarrollo temprano del embrión. Estos tres factores se unen a sus propios promotores de forma cooperativa y forman un circuito interconectado de auto-regulación. De todos ellos, OCT4 es el más indispensable ya que presenta funciones activadoras que inducen y mantienen la pluripotencia, pero además tiene funciones represoras que inducen la diferenciación celular (Figura 2). Por tanto, OCT4 es considerado como el regulador esencial de la pluripotencia¹⁵⁻¹⁶.

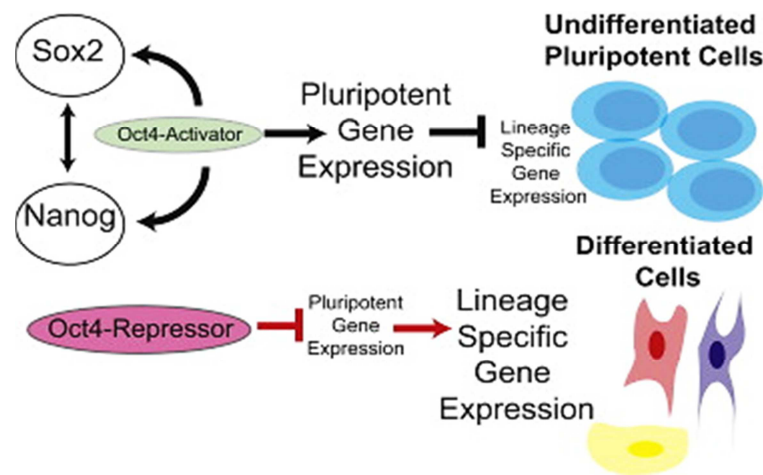


Figura 2. Regulación transcripcional de la pluripotencia de hPSC. OCT4, SOX2 y NANOG conforman el núcleo transcripcional que regula el mantenimiento de la auto-renovación de las hPSC y la capacidad de diferenciación a cualquier linaje celular. OCT4 es un activador de la capacidad de auto-renovación, mientras que cuando funciona como represor induce la diferenciación de las hPSC a linaje específico¹⁵.

Las hPSC deben ser caracterizadas para determinar su potencial real y poder ser empleadas tanto en investigación básica como para aplicaciones clínicas. Para la lograr una caracterización celular completa de las hPSC deben realizarse varios ensayos:

- Marcadores de pluripotencia. La expresión de marcadores de pluripotencia se lleva a cabo mediante el análisis de marcadores de superficie específicos de las hPSC, como son SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y SSEA-3, y además pueden detectarse los TF endógenos OCT-4, NANOG, SOX2 y REX1, característicos de las hPSC. El ensayo de pluripotencia puede llevarse a cabo por varios métodos complementarios: inmunofluorescencia, RT-PCR (del inglés, *Reverse transcription polymerase chain reaction*) y/o citometría de flujo¹⁷⁻¹⁸.
 - La inmunofluorescencia es un método rápido y fácil, pero es cualitativo y requiere de un cultivo negativo para sustraer la señal de fondo.
 - La RT-PCR permite cuantificar los niveles de expresión endógena a nivel de ARNm de los TF de pluripotencia. Aunque la técnica es informativa al mostrar el fenotipo de todo el cultivo celular, se pierde la información sobre la homogeneidad de la población celular.
 - La citometría de flujo complementa a la RT-PCR ya que provee información de diferentes poblaciones celulares de las hPSC. Puede emplearse para detectar tanto marcadores celulares de membrana (SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y SSEA-3) como intracelulares (OCT-4 y NANOG).
- Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra presente en la membrana celular de todos los tejidos corporales. En hPSC, esta enzima se encuentra altamente expresada y por ello, esta técnica es ampliamente usada como marcador o indicador clave de la pluripotencia de las hPSC. Además, es un método rápido y sencillo que permite que las células con actividad fosfatasa alcalina se tiñan de color rosado¹⁹⁻²⁰.
- Análisis citogenético. Para visualizar el patrón cromosómico de las hPSC se realiza un cariotipo por bandeo-G mediante tinción de Giemsa y/o técnicas de citogenética molecular como el FISH (del inglés, *Fluorescence in situ hybridization* o el SKY (del inglés *Spectral Karyotype*). En el cariotipo clásico se suele utilizar una solución de Giemsa como tinción (específica para los grupos fosfato del ADN) para colorear las bandas de los cromosomas (Bandas-G). Cada cromosoma tiene un patrón característico de banda que ayuda a identificarla (Figura 3). Como alternativas a la tinción Giemsa, se encuentran las técnicas moleculares FISH o SKY, ya que presentan una mayor precisión al bandeo-G al permitir el estudio y la visualización simultánea de los 23 pares de cromosomas mediante sondas fluorescentes que identifican cada cromosoma con un color diferente. Estas técnicas mejoran la identificación y el diagnóstico de alteraciones cromosómicas que no pueden verse por la tinción Giemsa²¹⁻²².



Figura 3. Análisis cromosómico por tinción de Giemsa. La imagen muestra un cariotipo normal, 46 XY realizado con la técnica de bandeo-G²².

- Arrays para la detección de SNPs. Los arrays para la detección de SNPs (del inglés, *Single Nucleotide Polimorfism*) son ampliamente usados para determinar diferentes polimorfismos en una población. Los chips de ADN pueden utilizarse para genotipar las secuencias de un genoma particular en determinadas posiciones. Los oligonucleótidos pequeños son capaces de identificar polimorfismos de un sólo nucleótido que podrían ser los responsables de variaciones genéticas dentro de una población. Esta técnica es mucho más susceptible y una alternativa más adecuada que el cariotipado que a veces no es suficiente para detectar ciertas alteraciones cromosómicas²³.
- Diferenciación *in vitro*. Se realizan ensayos de formación de cuerpos embrioides (EBs, del inglés *Embryoid Bodies*). Los EBs son agregados de células pluripotentes que inducen la diferenciación hacia las tres capas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo). Se utilizan técnicas de inmunocitoquímica para detectar marcadores celulares específicos de las tres capas germinales del embrión²⁴.
- Diferenciación *in vivo*. La *formación de teratomas* evalúa la generación espontánea de tejidos diferenciados pertenecientes a las tres capas germinales tras la inyección de hPSC en un ratón inmunodeprimido. Esta técnica determina el potencial de desarrollo a nivel poblacional ya que los teratomas no pueden formarse a partir de células individuales. Además, al no ser una técnica cuantitativa sólo puede realizarse un análisis histológico de los diferentes tejidos que se han diferenciado dentro de los teratomas. La formación de teratomas es el ensayo de referencia para evaluar el potencial de desarrollo de las hPSC²⁵. Una técnica más novedosa es la *formación de blastocistos quiméricos* que evalúa la contribución de las PSC introducidas en embriones, en estadio de mórula o blastocisto durante el desarrollo embrionario. Las PSC

de alta calidad dan lugar a un desarrollo normal generando quimeras de gran calidad que colonizan todos los tejidos embrionarios, incluida la línea germinal. Por el contrario, las PSC de menor calidad producen bajo quimerismo o embriones con viabilidad reducida. Este tipo de ensayos puede realizarse entre PSC y embriones de la misma especie o inter-especie (humano-ratón, humano-cerdo o humano-primate principalmente). Tanto los ensayos de formación de quimeras de hPSC en embriones de ratón como la formación de quimeras con embriones humanos están permitidos bajo unas normas estrictas y éticas rigurosamente evaluadas por la comunidad internacional de investigación con células madre²⁶.

Tras completar la caracterización celular de las líneas hPSC para poder ser usadas en investigación, estas deben depositarse en el Banco Nacional de Líneas Celulares (BNLC). El BNLC está adscrito a la Subdirección General de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto de Salud Carlos III (España). Su objetivo es garantizar la disponibilidad de las líneas celulares para la investigación biomédica, en todo el territorio nacional. El BNLC está formado por varios nodos establecidos en Barcelona, Valencia y Granada, siendo Granada el nodo central y ubicado en el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA)²⁷.

Por tanto, todas estas propiedades convierten a las hPSC en ideales como modelo de estudio del desarrollo normal y patológico del ser humano.

1.3. Tipos de hPSC

Las hPSC en función de su origen y métodos de derivación se clasifican en varios tipos celulares:

1.3.1 hESC

Las hESC fueron las primeras hPSC cultivadas *in vitro* de forma exitosa. Estas células se obtienen de la ICM del blastocisto de un embrión humano. Poseen la capacidad de auto-renovación y diferenciación a todos los tipos celulares que aparecen en el organismo adulto (Figura 4). Esta versatilidad permite que las hESC puedan ser usadas para medicina regenerativa y terapia celular¹⁰. Aunque, uno de los inconvenientes para su empleo en terapia celular es el problema de la alogenicidad cuando no existe histocompatibilidad entre individuos.

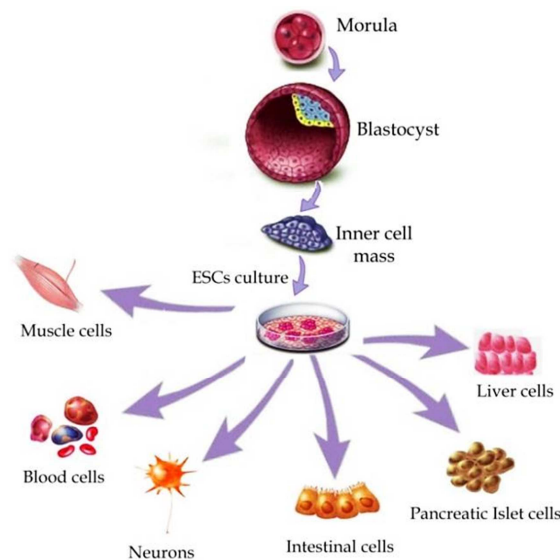


Figura 4. Aislamiento de hESC procedentes de la ICM del blastocito de un embrión humano²⁸.

Las hESC pueden obtenerse de varias fuentes celulares:

- Embriones crioconservados. Embriones humanos procedentes de los tratamientos de FIV que ha sido cedidos mediante consentimiento informado de las parejas para su uso en investigación²⁹.
- Blastómeros individuales. Se utilizan óvulos fecundados que se dejan crecer hasta formar unas 8-12 células (blastómeras), una de estas células se extrae y se cultiva. Cabe destacar que el embrión utilizado para esta técnica es completamente viable por lo que se puede implantar en útero y seguir un desarrollo normal³⁰⁻³¹.
- Blastocistos partenogenéticos. La partenogénesis es un método útil para obtener hESC por activación de oocitos humanos no fertilizados mediante técnicas físicas o químicas *in vitro*. Según el método de activación usado pueden obtenerse hESC partenogenéticas heterocigotas u homocigotas para el HLA. Las hESC partenogenéticas heterocigotas son muy útiles para trasplantes autologos. En cambio, las hESC partenogenéticas homocigotas pueden derivar a células y tejidos histocompatibles para terapia celular de trasplantes alogénicos, por lo que son muy valiosas para los bancos o depósitos de hPSC. Debemos destacar que una de las limitaciones de esta técnica es que la terapia celular empleada sólo podría aplicarse a mujeres³²⁻³⁴.
- Transferencia nuclear somática. La transferencia del núcleo de una célula somática a un oocito humano enucleado y su posterior activación permite obtener hESC. Estas células poseen el mismo HLA que las células somáticas donantes pero tienen mitocondrias alogénicas procedentes del oocito, lo que puede desencadenar un rechazo inmune debido al contenido mitocondrial. Por

tanto, debe tenerse en cuenta la alo-antigenicidad mitocondrial para el uso de estas células como fines terapéuticos y clonación³⁵⁻³⁶.

1.3.2. hiPSC

Las hiPSC son células somáticas derivadas de pacientes o donantes sanos que son reprogramadas mediante la expresión ectópica de ciertas moléculas de ADNc, ARNm o factores proteicos. Las técnicas de reprogramación han avanzado en gran medida desde los métodos iniciales que implicaban la integración al azar de los vectores virales en el genoma de la célula a reprogramar¹², hasta los métodos actuales que no precisan integrarse para llevar a cabo una reprogramación efectiva, lo cual facilita su potencial terapéutico³⁷⁻⁴². Los diferentes métodos de reprogramación abarcan la expresión ectópica de los cuatro factores de reprogramación (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) descritos por el Dr. Yamanaka. Estos factores juegan un papel esencial en el mantenimiento de la pluripotencia y diferenciación de las hPSC. OCT4 y SOX2 son imprescindibles en el mantenimiento de la pluripotencia, mientras que c-MYC y KLF4 son oncogenes que inducen la diferenciación celular y aumentan la eficiencia de reprogramación¹¹⁻¹². Alternativamente, el Dr. Thomson propone un método de reprogramación similar empleando los factores OCT4, SOX2, KLF4 y LIN28¹³.

Los factores de reprogramación pueden ser introducidos mediante virus integrativos (retrovirus o lentivirus)¹²⁻¹³, virus no integrativos (adenovirus, virus episomales, virus Sendai, plásmidos de expresión...)³⁷⁻⁴¹, medios físicos (nucleofección) o químicos (lipofección)⁴². Entre los métodos no integrativos, los virus Sendai (SeV, del inglés *Sendai virus*) son una técnica muy novedosa, ampliamente utilizada en los últimos años para reprogramar hiPSC. Los SeV son virus de ARN que pueden eliminarse fácilmente mediante selección negativa mediada por anticuerpos. Se replican en forma de ARN monocatenario en el citoplasma de las células infectadas, por lo que el ADN no se produciría ni se integraría en el genoma del huésped durante la transducción. Por tanto, son vectores seguros que pueden usarse en el campo de la terapia génica³⁹.

En un principio el proceso de reprogramación es iniciado por los factores exógenos, pero la transformación final a hiPSC madura se consigue gracias a la expresión de factores endógenos. Los pasos iniciales del proceso son reversibles hasta la transformación en intermediarios tardíos. A partir de éstos se generaran las hiPSC inmaduras, que han adquirido la pluripotencia pero aún conservan la memoria epigenética de la célula original, hasta que finalmente las células hiPSC maduras pierden dicha memoria cuando se completa el proceso de reprogramación⁴³⁻⁴⁴ (Figura 5).

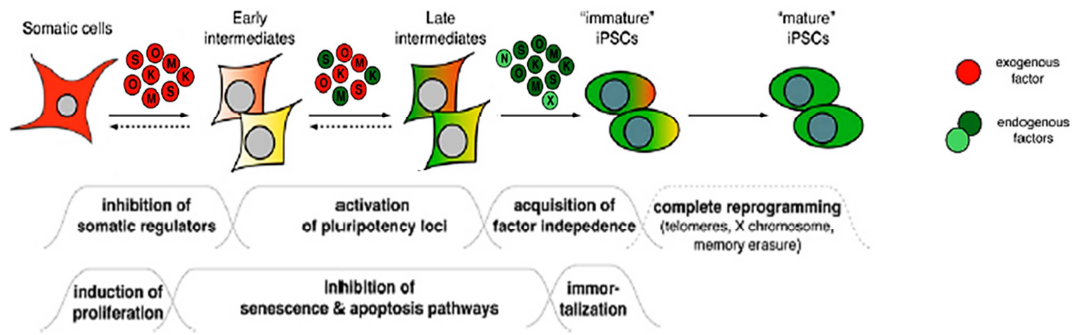


Figura 5. Esquema representativo de la reprogramación celular de células somáticas a hiPSC y los cambios que se producen en el proceso. Adaptada de Stadtfeld and Hochedlinger⁴⁴.

Tras la reprogramación, las células somáticas son dirigidas a un estado pluripotente, muy similar al de las hESC, por lo que adquieren la capacidad de auto-renovación y diferenciación a cualquier linaje celular del organismo adulto¹²⁻¹³ (Figura 6). La generación de hiPSC es un gran recurso para la obtención de células específicas de pacientes para llevar a cabo estudios celulares y moleculares de los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades. Una de sus principales ventajas es su uso para trasplantes autólogos⁴⁵.

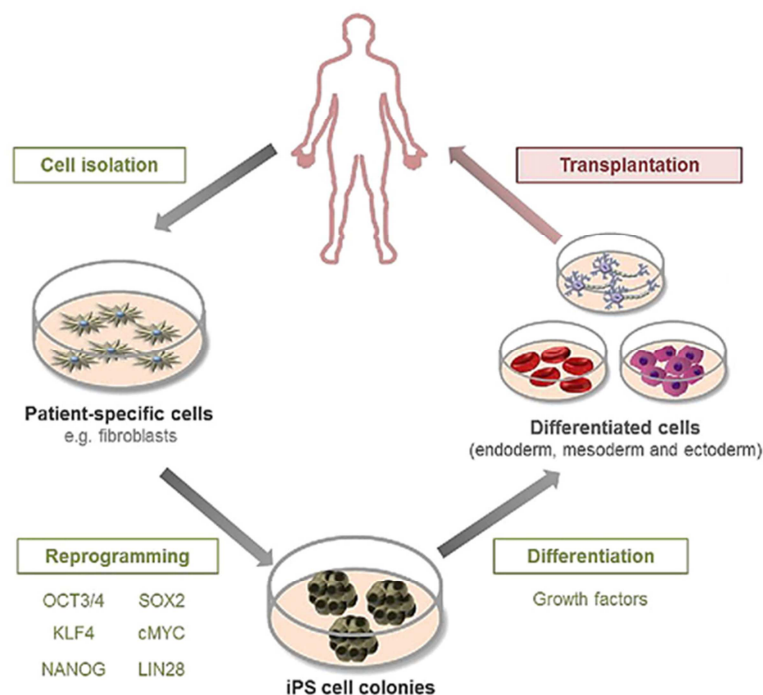


Figura 6. Generación de hiPSC por reprogramación celular de células somáticas del propio paciente. Adaptada de De Lázaro *et al*⁴⁵.

1.4. Aplicaciones potenciales de las hPSC

Las hPSC, debido a su capacidad de expansión ilimitada *in vitro* y diferenciación a cualquier linaje celular poseen diversas aplicaciones con potencial terapéutico tanto para investigación como para su uso en clínica e industria (Figura 7).

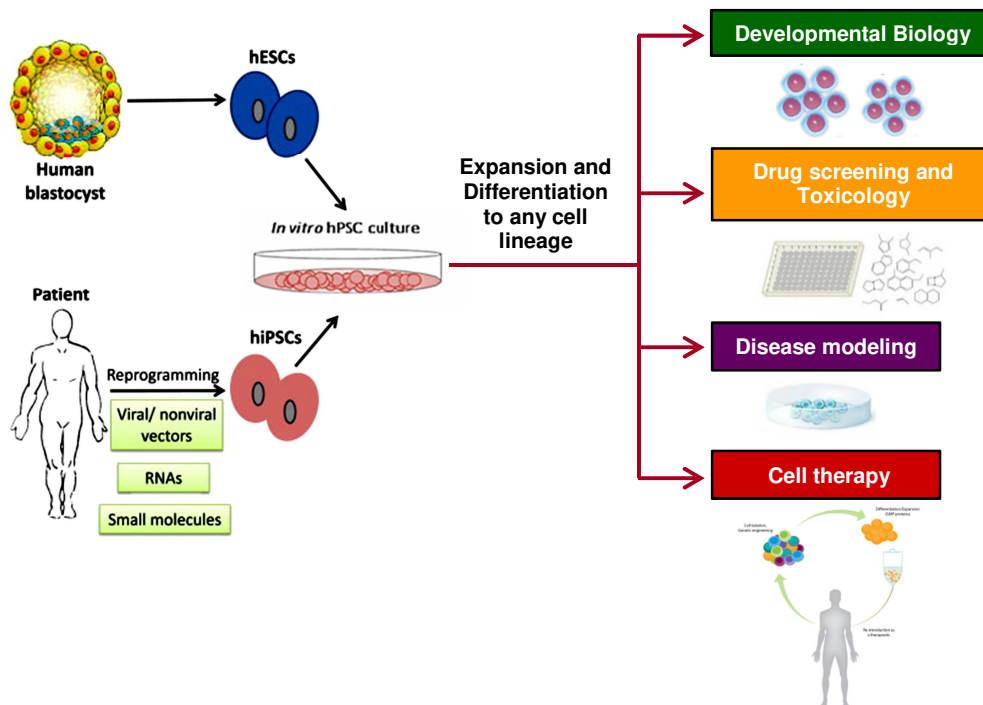


Figura 7. Esquema representativo de las aplicaciones de hPSC en investigación. Adaptada de Barad *et al*⁴⁶.

- Estudio del desarrollo biológico. En biología, uno de los principales retos es entender el funcionamiento del desarrollo humano y la evolución de enfermedades, la mayoría de ellas causadas por defectos en el desarrollo o por defectos génicos. La mayor parte del conocimiento sobre el desarrollo humano ha sido extrapolado de estudios con organismos modelo. El ratón ha sido el principal organismo experimental para modelar el desarrollo humano. Ratones y humanos presentan un tamaño genómico similar y comparten el 99% de sus genes, además de presentar grandes similitudes en desarrollo, anatomía y fisiología⁴⁷⁻⁴⁸. Sin embargo, a pesar de ser un potente organismo modelo, tiene notables limitaciones. Entre humanos y ratones existen diferencias obvias en el desarrollo embrionario, y también diferencias importantes en el desarrollo del sistema inmunológico, por lo que algunas investigaciones sobre enfermedades inmunológicas en ratones no son transferibles a los humanos⁴⁹. Por tanto, se precisan nuevos modelos que recapitulen de manera más exacta el desarrollo humano. Cada vez existen más evidencias que sugieren que la diferenciación *in vitro* de las hPSC recapitula aspectos del desarrollo humano, y que pueden ser usadas como modelo de estudio del desarrollo biológico⁵⁰. Uno de los objetivos más importantes de la investigación con hPSC es conocer mejor los controles genéticos y moleculares implicados tanto en el desarrollo humano como en el desarrollo de las enfermedades, y así poder establecer nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades.

- Ensayo de fármacos. El crecimiento ilimitado *in vitro* de las hiPSC las hace ideales para la identificación y el ensayo de nuevos fármacos para el diseño de tratamientos específicos, sobre todo para el tratamiento de las enfermedades degenerativas⁵¹. Los primeros ensayos de fármacos se llevaron a cabo con hepatocitos y cardiomiocitos derivados de hiPSC, ya que los resultados son más robustos y fáciles de evaluar⁵²⁻⁵³. En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, la implementación de ensayos de fármacos ha sido más lenta por la complejidad de la patología. El difícil acceso al tejido afectado y la dificultad para crecer estas células *in vitro* por largos periodos de tiempo supone un gran problema en el diseño de fármacos específicos. Por lo que la generación de células neurales derivadas de hiPSC de pacientes o donantes sanos supone un gran avance en la detección de compuestos y la evaluación de la eficacia del fármaco. Estas células mantienen los antecedentes genéticos de los pacientes, por lo que modelan con mayor precisión la fisiopatología y los fenotipos específicos de la enfermedad⁵⁴.

- Estudios de citotoxicidad. La exposición a diversos contaminantes ambientales, como solventes industriales, metales o pesticidas se ha visto incrementada en los últimos años y esto ha provocado un aumento de los defectos en nacimiento tanto en animales como en humanos, además de provocar enfermedades cardíacas, respiratorias, neurodegenerativas o ciertos tipos de cáncer⁵⁵. Regularmente, se han empleado modelos animales para realizar pruebas toxicológicas y establecer las pautas de exposición humana. Sin embargo, los ensayos *in vivo* son costosos y requieren mucho tiempo, por lo que se precisa desarrollar métodos *in vitro*, rápidos y de bajo coste que puedan usarse para detectar sustancias tóxicas para el desarrollo humano o estudiar los niveles toxicidad de ciertos contaminantes o fármacos. El empleo de las hPSC es la mejor alternativa a los ensayos *in vivo*, ya que proporcionan un entorno más similar a las condiciones fisiológicas humanas para los ensayos de citotoxicidad. De hecho, las células procedentes de hESC se utilizan en gran medida en estudios de detección de sustancias tóxicas para el desarrollo humano⁵⁶⁻⁵⁷. Además, el potencial que ofrecen las hiPSC en estudios de medicina personalizada ha revolucionado el campo de la toxicología. Las células derivadas de las hiPSC son muy utilizadas para ensayos de cardiotoxicidad, hepatotoxicidad y neurotoxicidad⁵⁸⁻⁶⁰.

- Generación de modelos humanos de enfermedad. La generación de hiPSC de pacientes para desarrollar modelos de enfermedad permite profundizar en el estudio de la enfermedad y el diseño de nuevos fármacos para su tratamiento, dado que las hiPSC pueden mantenerse de forma ilimitada en cultivo y diferenciarse a cualquier linaje celular. En 2009, Lee empleó hiPSC para modelar la patogénesis de la disautonomía familiar⁶¹. Desde entonces, se ha ampliado el uso de las hiPSC en la generación de modelos de enfermedad para estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de estas enfermedades. Hay muchos síndromes causados por la existencia de una o más copias extra de un cromosoma, como es el caso del Síndrome de Down, para el cual se han generado varias líneas hiPSC que permitan estudiar el

desarrollo de la enfermedad⁶²⁻⁶³. Además, el uso de las hiPSC está muy extendido en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad del Parkinson⁶⁴⁻⁶⁵. En especial, el diseño de modelos de hiPSC en enfermedades monogénicas permite un mejor estudio del desarrollo de la enfermedad y tratamiento por terapia génica, como es el caso del Síndrome de Bernard-Soulier⁶⁶⁻⁶⁸.

- Medicina regenerativa. El principal objetivo de la medicina regenerativa es el acceso a cualquier tipo celular de forma ilimitada, que permita la reconstitución de un tejido u órgano lesionado. La falta de donantes es uno de los principales problemas para estos pacientes⁶⁹. El uso de las hiPSC ofrece un gran enfoque para estos tratamientos, ya que las células que se usarán en el trasplante se diferenciarán de las hiPSC previamente reparadas y generadas a partir de las células somáticas del propio paciente. La degeneración macular relacionada con la edad ha sido la enfermedad más estudiada en el campo de la medicina regenerativa. En 2012, se llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos con pacientes que presentaban degeneración macular. Estos pacientes fueron trasplantados con células epiteliales de pigmento retiniano derivadas de hESC⁷⁰. El seguimiento de estos pacientes confirmó una correcta evolución y por consiguiente una terapia celular eficaz basada en hESC⁷¹. En 2017, comenzaron los primeros trasplantes de células de retina derivadas de hiPSC autólogas, siendo un gran éxito⁷². El gran desafío es la generación de células funcionales de linaje terminal para su uso adecuado en clínica. Este problema es particularmente grave para aquellos tipos celulares que adquieren su funcionalidad en estadios tardíos del desarrollo, como las células hematopoyéticas⁷³. Por tanto, es necesario desarrollar tecnologías que produzcan células maduras y funcionales derivadas de hPSC.

Otra de las tecnologías potenciales que implica la medicina regenerativa, es la terapia génica. La terapia génica ha supuesto una revolución en la manera de abordar el tratamiento de las enfermedades genéticas, puesto que ha abierto un nuevo horizonte para curar enfermedades para las que hasta el momento solo existían tratamientos orientados a paliar sus síntomas. La terapia génica implica el uso de técnicas que permiten editar o modificar la información genética del paciente para prevenir o curar enfermedades genéticas. A través de la terapia génica se puede conseguir restablecer la función del gen mutado causante de la enfermedad, y la estrategia más común es la introducción de una copia normal de éste en las células. También se puede inhibir o bloquear el funcionamiento de aquellos genes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad⁷⁴. Para llevar a cabo una terapia génica efectiva, es necesario el uso de vectores adecuados. De todos los vectores virales y no virales que pueden emplearse en terapia génica, los lentivirus son los vectores más utilizados. Son virus de ARN que tienen la capacidad de infectar células independientemente de que estén o no en división, y por tanto poseen una gama más amplia de aplicaciones terapéuticas. Se han realizado esfuerzos considerables para aumentar la seguridad y la eficacia de los lentivirus en el campo de la terapia génica. Son muy utilizados en estudios diseñados para

mejorar los trasplantes de células endoteliales vasculares en pacientes con enfermedad cardiovascular⁷⁵. Además, muchos grupos de investigación los emplean en modelos animales como posible tratamiento para tratar la β -Talasemia o la hemofilia B⁷⁶⁻⁷⁷. También, se han reportado mejoras en otros trastornos genéticos como la enfermedad del Parkinson, la fibrosis quística o la atrofia muscular espinal⁷⁸⁻⁸⁰. Cabe destacar, que se han desarrollado y puesto a punto numerosos ensayos clínicos de diversas patologías mediante el uso de vectores lentivirales⁸¹.

1.5. Aspectos éticos relacionados con la investigación de hPSC

El uso de embriones humanos para la obtención de hESC conlleva un cuidadoso examen de las cuestiones éticas relacionados con la investigación biomédica. El uso de hESC en investigación a veces se ve reducido a causa de estas implicaciones legales. Por el contrario, investigadores y científicos opinan sobre la necesidad de su uso en investigación y el gran potencial médico que ofrecen como terapia génica y su traslado a investigación clínica. Actualmente, se dispone de un mayor acceso a determinados tipos de células madre (mesenquimales, del líquido amniótico, de cordón umbilical, de tejido adiposo o de orina) gracias a la existencia de biobancos que contienen células madre para su uso en clínica o investigación. Actualmente, la generación de hiPSC derivadas de células somáticas de pacientes o donantes sanos minimiza el uso de hESC, pero aun así continua habiendo problemas con el uso de hiPSC en investigación y ensayos clínicos. Para minimizar el riesgo de su uso en investigación, se debe obtener el correspondiente consentimiento informado de los donantes y la aprobación del comité ético. No obstante, todos los ensayos clínicos deben ser cuidadosamente diseñados, justificados rigurosamente y llevados a cabo de forma adecuada para proteger los derechos, los intereses y el bienestar de los sujetos del ensayo clínico.

Los ensayos clínicos predominantes con hPSC son para tratar degeneración de la retina, enfermedades neurales, cardíacas y pancreáticas^{70-71,82-85}. A finales de enero de 2009, la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) aprobó el primer ensayo clínico de una intervención experimental basada en hESC para lesión de la médula espinal. Las células progenitoras de oligodendrocitos derivadas de hESC remielinizarían los axones de la médula espinal de sujetos con recientes lesiones severas de médula espinal, pero tras intervenir a cuatro pacientes el ensayo fue cancelado por razones de coste. Actualmente, hay una gran variedad de ensayos clínicos que usan hPSC para tratar la degeneración macular, y todos ellos consiguen resultados prometedores con el uso de hESC para el tratamiento de esta enfermedad^{70-72,86-87}. En 2014, se llevó a cabo el primer ensayo clínico para probar un tratamiento contra la Diabetes Mellitus tipo I basado en hPSC. Tras la realización de varios ensayos clínicos en los últimos años se ha determinado que la terapia celular basada en hPSC es bastante prometedora para el tratamiento de esta enfermedad^{82-83, 88}. Son varios los ensayos clínicos llevados a cabo hasta la fecha con hPSC.

La tabla 1.5.1 muestra datos actualizados de los ensayos clínicos aprobados hasta la fecha de 2018, de los cuales se han reportado 29 ensayos clínicos que implican el uso de hESC y 3 basados en el uso de hiPSC⁸⁹.

Tabla 1.5.1 Ensayos clínicos realizados con hPSC. Adaptada de Guhr *et al.*⁸⁹

Sponsor	Disease(s) (as Indicated)	Study ID	Country
Clinical Trials Based on hESCs			
Assistance Publique – Hôpitaux de Paris	ischemic heart disease	NCT02057900	France
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT01345006	United States
Astellas Pharma	advanced dry AMD	NCT02463344	United States
Astellas Pharma	AMD	NCT03178149	not specified
Astellas Pharma	AMD	NCT01344993	United States
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT02941991	UK
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT01469832	UK
Astellas Pharma	Stargardt macular dystrophy	NCT02445612	United States
Astellas Pharma	macular degenerative disease	NCT03167203	not specified
Asterias Biotherapeutics	spinal cord injury	NCT02302157	United States
Asterias Biotherapeutics	spinal cord injury	NCT01217008	United States
Cell Cure Neurosciences	AMD	NCT02286089	Israel, United States
CHA Biotech	dry AMD	NCT01674829	Korea
CHA Biotech	Stargardt macular dystrophy	NCT01625559	Korea
Chinese Academy of Sciences	dry AMD	NCT03046407	China
Chinese Academy of Sciences	nonexudative AMD	NCT02755428	China
Chinese Academy of Sciences	Parkinson's disease	NCT03119636	China
Chinese Academy of Sciences, Institute of Zoology	dry AMD	ChiCTR-OCB-15007054	China
Chinese Academy of Sciences, Institute of Zoology	retinitis pigmentosa	ChiCTR-OCB-15007055	China
Eye Institute of Xiamen University	severe ocular surface diseases	ChiCTR-OCB-15005968	China
Federal University of São Paulo	AMD, Stargardt disease, exudative AMD	NCT02903576	Brazil
Pfizer	AMD	NCT03102138	UK
Pfizer	AMD	NCT01691261	UK
Regenerative Patch Technologies	dry AMD	NCT02590692	United States
Southwest Hospital, China	macular degeneration diseases, not specified	NCT02749734	China
Viacyte	diabetes mellitus type 1	NCT03162926	Canada
Viacyte	diabetes mellitus type 1	NCT02239354	United States, Canada
Viacyte	diabetes mellitus type 1	NCT02939118	United States, Canada
Viacyte	diabetes mellitus type 1 with hypoglycemia	NCT03163511	United States
Clinical Trials Based on hiPSCs			
RIKEN	exudative AMD	UMIN000011929 (based on autologous iPSCs)	Japan
Cynata Therapeutics	graft-versus-host disease	NCT02923375 (based on allogenic iPSCs)	Australia, UK

En la actualidad, todos los ensayos clínicos se registran en la web *clinicaltrials.gov*, una práctica común para transmitir legitimidad. La Sociedad Internacional para la Investigación de Células Madre (ISSCR, del inglés *The International Society for Stem Cell Research*) presenta una guía sobre las pautas a seguir en el uso de hPSC en investigación y su traslado a clínica. Estas pautas exigen rigor, supervisión y transparencia en todos los aspectos de la práctica⁹⁰.

Por tanto, debe haber un compromiso entre la ética y la finalidad del uso de hPSC para investigación, ya que el progreso técnico-científico debe basarse en la defensa y protección del ser humano.

2. Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso de generación de las células sanguíneas, un proceso complejo por el cual las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) proliferan y se diferencian hacia los distintos tipos de células sanguíneas maduras circulantes (granulocitos, linfocitos, monocitos, eritrocitos, plaquetas, etc.). La hematopoyesis tiene lugar principalmente en la médula ósea, donde una intrincada red de células estromales y diversos factores regulan cada una de las etapas que conducen a la formación de células primitivas, intermedias y maduras. Las células hematopoyéticas son las primeras en formarse durante el desarrollo embrionario, apareciendo a distintos tiempos de desarrollo y originando diversos tipos celulares en distintas localizaciones anatómicas. Alteraciones en el sistema hematopoyético pueden ocasionar tanto la sobreproducción como la producción deficiente de las células hematopoyéticas maduras, con importantes consecuencias que ponen en riesgo la supervivencia del individuo. El estudio de la hematopoyesis tiene implicaciones en el estudio del desarrollo biológico, y además en el campo de la hematología clínica y la medicina regenerativa⁹¹.

Desde un punto de vista ontológico, la hematopoyesis se divide en dos grandes etapas con sus propias características y propiedades, la hematopoyesis embrionaria y adulta.

2.1. Desarrollo hematopoyético embrionario

El desarrollo hematopoyético embrionario ha sido estudiado durante décadas empleando diferentes organismos modelo, incluyendo el pollo, la rana, el pez cebra y el ratón. Desde 1970, el modelo de ratón ha sido el más estudiado dada la disponibilidad de ensayos de formación de colonias, los cuales definen funcionalmente la presencia de HSC y progenitores hematopoyéticos, respectivamente⁹²⁻⁹⁴. Además, el ratón se aproxima más evolutivamente al humano.

La hematopoyesis comprende distintas etapas, también denominadas oleadas, con diferentes patrones espaciales y temporales durante el desarrollo. Diferenciamos dos oleadas principales: la hematopoyesis primitiva y la hematopoyesis definitiva^{91, 95}.

- Hematopoyesis primitiva. En el ratón, la hematopoyesis comienza entre los días embrionarios 7.0-7.5 (E7.0-7.5) en una estructura extraembrionaria denominada saco vitelino, donde las células hematopoyéticas se encuentran rodeadas de células endoteliales dentro de unas estructuras llamadas islas sanguíneas⁹⁶. En el embrión humano, la hematopoyesis se inicia durante las primeras tres semanas de gestación⁹⁷. La primera oleada genera células primitivas de linaje eritroide y mieloide (macrófagos y megacariocitos) identificadas a día E8.0. Los eritroblastos primitivos son de gran tamaño, retienen sus núcleos al ingresar a la circulación y expresan hemoglobina embrionaria. Su principal función será proveer de oxígeno a todos los tejidos durante el rápido crecimiento del embrión⁹⁴. Los macrófagos primitivos maduran rápidamente sin progresar a monocitos y llevarán a cabo la fagocitosis de células procedentes de la remodelación de los tejidos. Los

megacariocitos primitivos presentan una ploidía reducida y producen menos plaquetas que los megacariocitos maduros. A continuación, aparece el hemangioblasto (progenitor hematopoyético primitivo), constituido por células formadoras de colonias de blastos que darán lugar a las células endoteliales hemogénicas (HEC, del inglés *Haemogenic Endothelial Cells*) que se encuentran en lugares concretos de la vasculatura arterial del embrión⁹⁶.

Por otro lado, en embriones humanos, los eritrocitos primitivos son las células mayoritarias que conforman la primera oleada de la hematopoyesis primitiva, con la presencia minoritaria de macrófagos y megacariocitos. Estos eritroblastos pueden observarse dentro de la cavidad cardíaca, marcando el inicio de la circulación sanguínea⁹⁷.

- Hematopoyesis definitiva. La hematopoyesis definitiva se inicia después de la hematopoyesis primitiva en diferentes sitios de la vasculatura del embrión de ratón. La segunda oleada se produce en el saco vitelino a día E8.25, mediante la formación de progenitores altamente proliferativos con la capacidad de formar colonias que darán lugar a múltiples linajes mieloides. Estos progenitores son el progenitor eritro-mieloide (EMP, del inglés *Erythro-Myeloid Progenitor*) que migrará al hígado fetal formando eritrocitos y células mieloides que colonizarán tejidos como el hígado, el cerebro, la epidermis y los pulmones permaneciendo hasta la edad adulta⁹⁸, y el progenitor linfoide multipotente (LMPP, del inglés *Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor*) que origina progenitores de linfocitos B y T⁹¹. Los eritrocitos derivados de los EMP expresan bajos niveles de globina β H1 embrionaria respecto a la globina β H1 que expresan los eritrocitos maduros⁹⁹. Los LMPP también originan células linfoides independientes de las generadas por las HSC definitivas⁹¹.

A día E9.0, tanto en el saco vitelino como en la región para-aorta-esplanopleura (pre-AGM) se forman las HSC inmaduras que requieren de un entorno fetal para su maduración. A día E10.0 se identificó una región con actividad hematopoyética, denominada región aorta-gónada-mesonefros (AGM, del inglés *Aorta Gonad Mesonephros*). El lugar específico donde se establece la hematopoyesis dentro de la AGM es la aorta dorsal. A partir de las células endoteliales de la pared ventral de la aorta dorsal aparecen pequeños clústeres de células que expresan marcadores vasculares y hematopoyéticos^{92, 100}. A partir de día E10.5 se inicia la formación de las HSC definitivas. La población temprana de HSC que aparece en la AGM se divide en tres tipos de precursores de HSC conocidos como pro-HSC, pre-HSC tipo I y pre-HSC de II que representan las diferentes etapas de maduración. El proceso de maduración de las HSC derivado de una población única de células endoteliales de la pared ventral de la aorta dorsal, denominada endotelio hemogénico, se le denomina transición endotelio-hematopoyesis (EHT, del inglés *Endothelium-Hematopoiesis Transition*) (Figura 8). La formación de las HSC definitivas se enmarca en el desarrollo de la tercera oleada¹⁰¹. Las distintas poblaciones de HSC que se originan a partir de la AGM se identifican mediante la expresión de diferentes marcadores de superficie. Las pro-HSC

expresan VE-Cadherina, c-KIT, CD41 y RUNX1, las pre-HSC tipo I expresan VE-Cadherina, c-KIT, CD41^{low}, CD43 y RUNX1, las pre-HSC tipo II expresan VE-Cadherina, c-KIT, CD41^{low}, CD43^{high}, CD45 y RUNX1 y por último, las HSC definitivas presentan los marcadores VE-Cadherina, Kit, CD41^{low}, CD43^{high}, CD45 y RUNX1¹⁰²⁻¹⁰³.

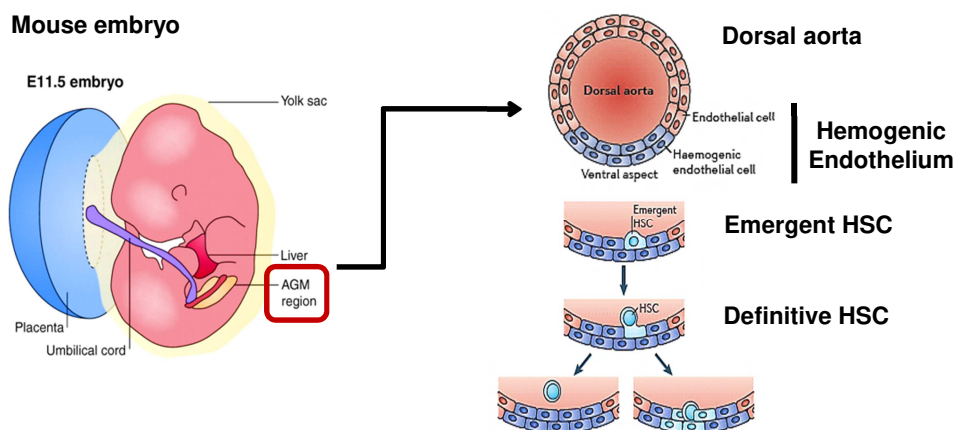


Figura 8. Transición endotelio-hematopoyesis en el embrión de ratón. Formación de HSC definitivas derivadas de células endoteliales de la pared ventral de la aorta dorsal en la zona AGM del embrión. Adaptada de Medvinsky *et al.*¹⁰⁴

En ratón, las HSC definitivas se detectan a la misma edad de desarrollo en la placenta que en la región AGM. Por esta razón, la placenta se considera una de las fuentes primordiales de HSC en el embrión de ratón¹⁰⁵. Tras la aparición de las HSC en la AGM, éstas migran al hígado fetal y sufren un proceso de expansión, colonizando finalmente la médula ósea justo antes del nacimiento. Las HSC maduras permanecerán en la médula ósea durante el resto de la vida adulta del individuo¹⁰².

En embriones humanos, la formación de las primeras HSC comienza a día 21 de gestación. A partir de día 23 de gestación, comienza la colonización de las HSC a los diferentes lugares del organismo del embrión, siendo el hígado fetal el primer lugar donde se inicia la expansión de las HSC. A partir de día 27 de gestación comienza la formación del clúster arterial y a partir del día 30 se inicia la segunda colonización en hígado fetal. El hígado es un nicho muy importante para la diferenciación hematopoyética y la expansión de las HSC hasta el momento del nacimiento. A partir de la semana 9 se pueden detectar las primeras HSC definitivas, hasta que a las 10.5 semanas de gestación comienza la colonización de la médula ósea por parte de las HSC maduras⁹⁷. En el caso de los humanos, la sucesión de etapas del desarrollo hematopoyético embrionario no se ha estudiado con tanto detalle como en el ratón. Además, existen diferencias entre los marcadores celulares que expresan las HSC provenientes de embriones humanos con respecto a las HSC de ratón. En embriones humanos, las HSC derivadas de la AGM expresan CD34, CD43 y CD45. En cambio, CD41 no se expresa en estas

etapas del desarrollo, a diferencia del ratón¹⁰⁶. Se ha observado que la expresión de CD43 es importante, ya que define a los progenitores hematopoyéticos durante la diferenciación hematopoyética de las hPSC¹⁰⁷.

La figura 9 muestra un esquema representativo y comparativo del desarrollo hematopoyético en embriones de ratón y embriones humanos.

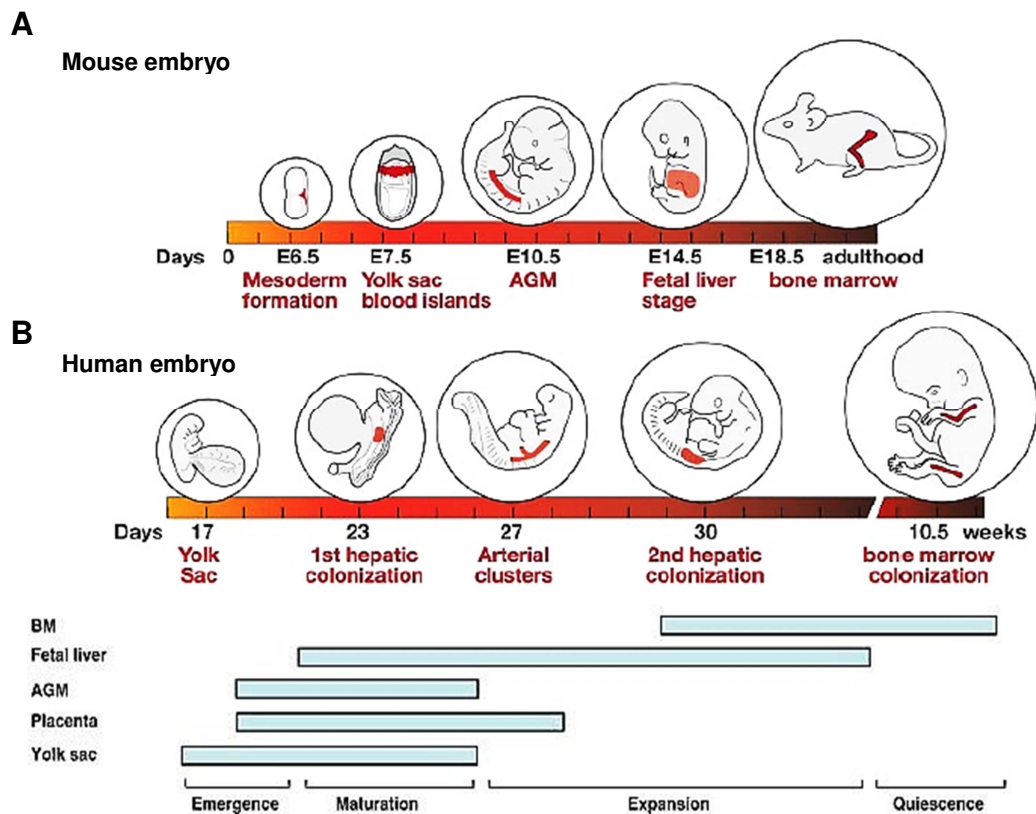


Figura 9. Desarrollo de la hematopoyesis embrionaria en ratón y humano. A. Estadios de la hematopoyesis embrionaria en ratón. Comienza a día E7.0-7.5 en el saco vitelino, continua en la AGM y en la placenta y finaliza en el hígado fetal y la médula ósea. B. Etapas de la hematopoyesis embrionaria en humano. Comienza en torno al día 17 de gestación en el saco vitelino, continuando en la AGM y en la placenta con la formación de las HSC primitivas que completan su maduración en el hígado fetal y en la médula ósea. Adaptada de Luis *et al.*¹⁰⁸ y Baron *et al.*¹⁰⁹

2.2. Desarrollo hematopoyético adulto

2.2.1 Homeóstasis y quiescencia de las HSC

Las HSC producidas durante el desarrollo embrionario colonizan la médula ósea y se encargan de mantener la homeostasis del sistema hematopoyético a lo largo de la vida del individuo. La homeostasis del tejido requiere de la presencia de las HSC con capacidad de auto-renovación y diferenciación, pero algunas de ellas permanecen en un estado durmiente o de quiescencia. El estado de quiescencia es fundamental para el desarrollo de las células hematopoyéticas definitivas, además de proteger a las HSC de adquirir mutaciones que provoquen su conversión a células malignas^{97, 110}. Estudios recientes han demostrado que la quiescencia de las HSC está regulada por una compleja red de factores celulares intrínsecos y extrínsecos que responden a determinadas situaciones de estrés. Además se ha identificado una heterogeneidad funcional dentro de las poblaciones de HSC inactivas^{97, 111} (Figura 10).

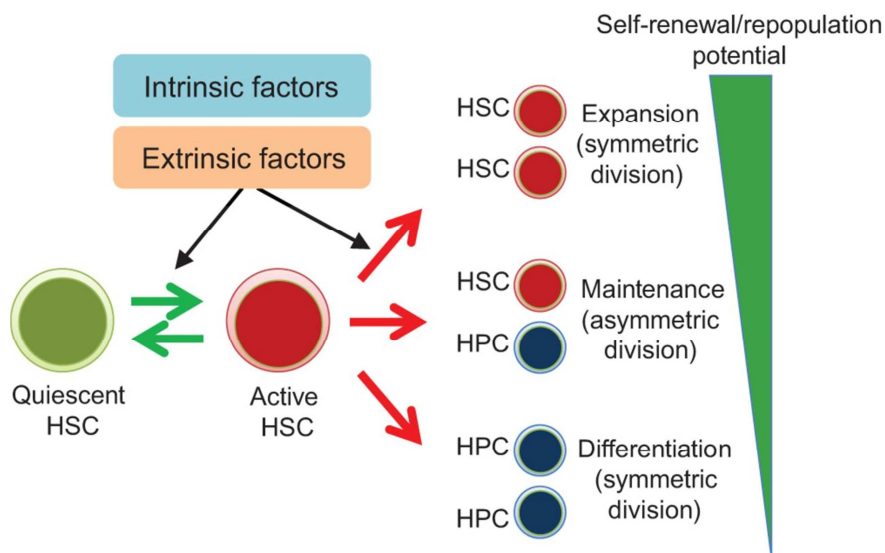


Figura 10. Estado de quiescencia y activación de las HSC. Factores intrínsecos y extrínsecos controlan el estado de quiescencia y activación de las HSC para su auto-renovación y diferenciación a células hematopoyéticas maduras¹¹¹.

Los factores intrínsecos que regulan la quiescencia son reguladores moleculares de la progresión del ciclo celular y diversos factores transcripcionales. El remodelador de la cromatina SATB1 (del inglés, *Special AT-rich sequence-Binding protein 1*) y PU.1 se encargan de regular diversos genes del ciclo celular¹¹²⁻¹¹³. La entrada en quiescencia de las HSC en el desarrollo postnatal temprano está controlada por el factor de transcripción C/EBPα. Estudios en ratón, han determinado que una alta expresión de C/EBPα regula la transición de las HSC primitivas en proliferación al estado de quiescencia de las HSC definitivas durante el desarrollo¹¹⁴.

Los factores extrínsecos que controlan el estado durmiente de las HSC se encuentran en el nicho. El nicho es el microambiente especializado dónde residen las HSC y está constituido por componentes celulares y humorales que regulan el destino de las HSC. Varios estudios de imagen sugieren que la localización de las HSC dentro de la médula ósea no es aleatoria. Éstas se ubican en la proximidad del hueso y están asociadas con las arteriolas circundantes y las células del estroma perivascular¹¹⁵. Estos datos sugieren que las HSC con diferentes capacidades proliferativas pueden crear compartimentos que permitan una asociación eficiente con sus respectivos nichos en la médula ósea¹¹⁶. Otros factores extrínsecos a considerar son el TGFβ (del inglés, *Transforming Growth Factor* beta) que regula la quiescencia de las HSC durante la hematopoyesis y el CKI p57 (del inglés, *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*), mediador de TGFβ y responsable de la reversión del ciclo celular¹¹⁷.

2.2.2. Jerarquía de la hematopoyesis adulta

Durante décadas, la hematopoyesis adulta ha sido descrita como una jerarquía celular mantenida por las HSC que se auto-renuevan y residen en el ápice de su estructura piramidal. Por debajo de las HSC, se encuentran las LT-HSC (del inglés, *Long Term HSC*), las ST-HSC (del inglés, *Short Term HSC*) y los progenitores multipotentes (MPP, del inglés *Multipotent Progenitors*). A continuación, encontramos los progenitores oligopotentes y unipotentes, con una vida media más corta y quedando restringidos a más de 10 tipos celulares sanguíneos. A partir de la generación de los MPP, surgen dos linajes, el linaje mieloide llevado a cabo por el progenitor mieloide común (CMP, del inglés *Common Myeloid Progenitor*) y el linaje linfoide marcado por el progenitor linfoide común (CLP, del inglés *Common Lymphoid Progenitor*)^{91, 118}.

En la diferenciación mieloide, destacan el progenitor bipotente granulocito-monocito (GMP, del inglés *Granulocyte-Monocyte Progenitor*) que generará granulocitos (basófilos, neutrófilos y eosinófilos) y monocitos, y el progenitor bivalente megacariocito-eritroide (MEP, del inglés *Megakaryocyte-Erythroid Progenitor*) que producirá plaquetas y glóbulos rojos, siendo éstas las células predominantes del sistema hematopoyético. En la diferenciación linfoide, el progenitor multilinfoide (MLP, del inglés *Multilymphoid Progenitor*) genera las células T, B y NK (del inglés, *Natural Killers*). Además, hay un linaje que surge de los progenitores CMP y CLP que originará las células dendríticas^{91, 118}.

La figura 11 muestra un esquema de la jerarquía clásica del desarrollo de las HSC¹¹⁸

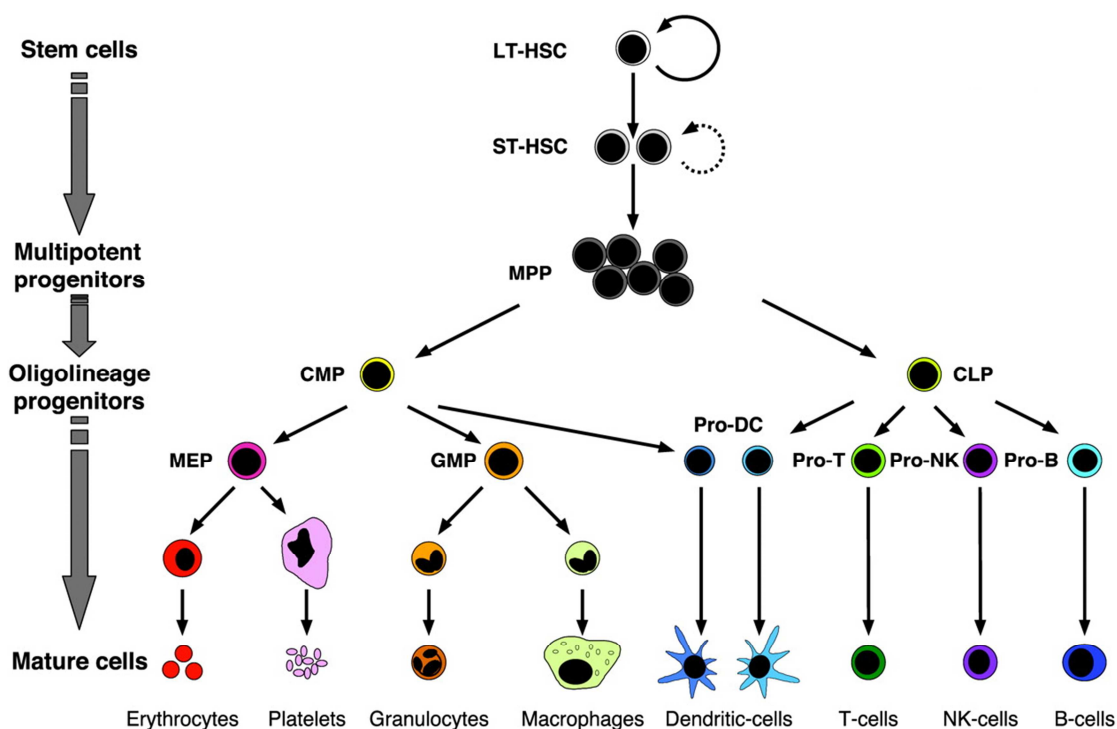


Figura 11. Modelo clásico de la jerarquía del sistema hematopoyético adulto. Adaptada de Passegué *et al.*¹¹⁸

Diversos estudios en los últimos años desafían la jerarquía clásica de diferenciación de las HSC¹¹⁹⁻¹²¹. Estos datos sugirieron un modelo de consorcio de HSC con ligeras variaciones en la diferenciación a sus linajes definitivos. En este modelo, todas las HSC se usarían para la producción de células sanguíneas, generando todos los tipos de células en la progenie diferenciada pero con un sesgo hacia linaje mieloide o linfoide^{120, 122}. Alternativamente, se ha propuesto un nuevo modelo especulativo que agrupa varias observaciones entre los modelos anteriores. En este modelo se propone que las HSC se establecen temprano durante el desarrollo embrionario y podría haber varias poblaciones de HSC en diferentes nichos. Estas células podrían generar progenitores de vida media larga que formarían uno o pocos linajes de células. Algunos de estos progenitores, de gran flexibilidad, podrían revertir a un estado más primitivo en condiciones de estrés o diferenciarse hacia linaje específico. Este modelo es consistente con la existencia de HSC con tendencia megacariocítica y progenitores multipotentes de tendencia linfoide, además de con el sesgo de diferenciación causado con el envejecimiento¹²²⁻¹²³. Para probar la posible existencia de este modelo se requieren más experimentos.

La figura 12 agrupa los diferentes modelos que se han propuesto para describir el desarrollo hematopoyético.

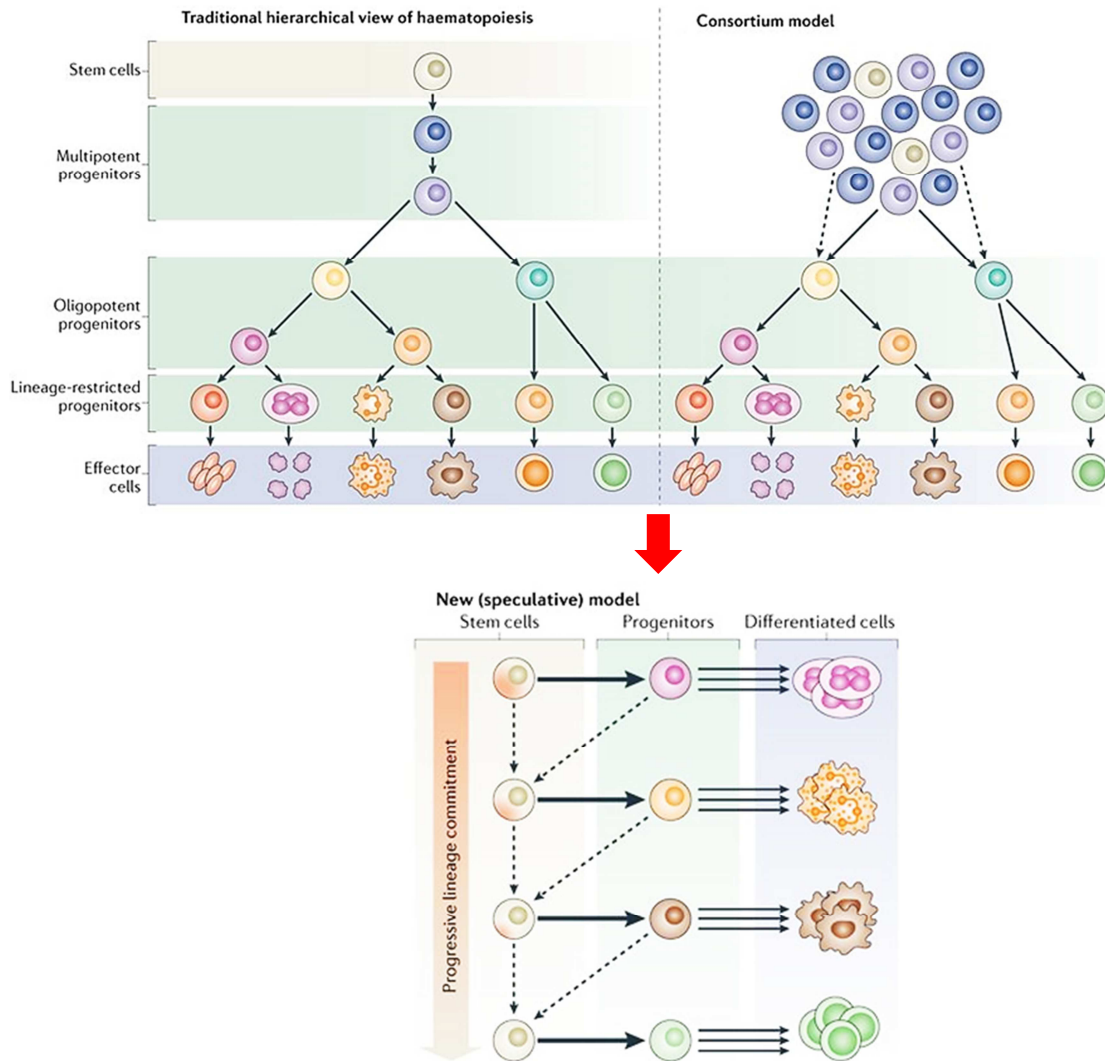


Figura 12. Modelos propuestos de hematopoyesis humana. En la jerarquía tradicional, las HSC originan progenitores oligopotentes que mediante la formación de progenitores de linaje específico se generan las células hematopoyéticas definitivas. En el modelo consorcio, un conjunto de HSC con propiedades diferentes generan progenitores con un potencial restringido. En el modelo especulativo, las células madre son células de reserva que ocasionalmente generan progenitores con restricción de linaje. Adaptada de Goodell *et al.*¹²⁴

Posteriormente a estos modelos, surgió un estudio más actual que apoya la visión compleja del sistema hematopoyético humano. Mediante aislamiento celular y ensayos funcionales del cultivo de HSC purificadas de hígado fetal, sangre de cordón umbilical y medula ósea de adultos, se demuestra que la jerarquía hematopoyética cambia a lo largo del desarrollo del individuo. En hígado fetal la mayoría de los progenitores son oligopotentes mientras que en medula ósea son unipotentes. El modelo redefinido que surge tras este estudio se compone de dos niveles: el nivel superior, compuesto por HSC y progenitores multipotentes que formarán megacariocitos y el nivel inferior, compuesto por progenitores unipotentes comprometidos a la formación de eritrocitos, células mieloides y linfoides¹²² (Figura 13). Además, la aparición del linaje

megacariocítico en hígado fetal se lleva a cabo en el compartimento formado por las HSC, mientras que en medula ósea se producen casi exclusivamente a partir del compartimento multipotente^{122,125}. Esta visión refuerza datos anteriores que indicaban que las HSC más primitivas están pre-dirigidas al linaje megacariocítico en medula ósea en ratones¹²⁶.

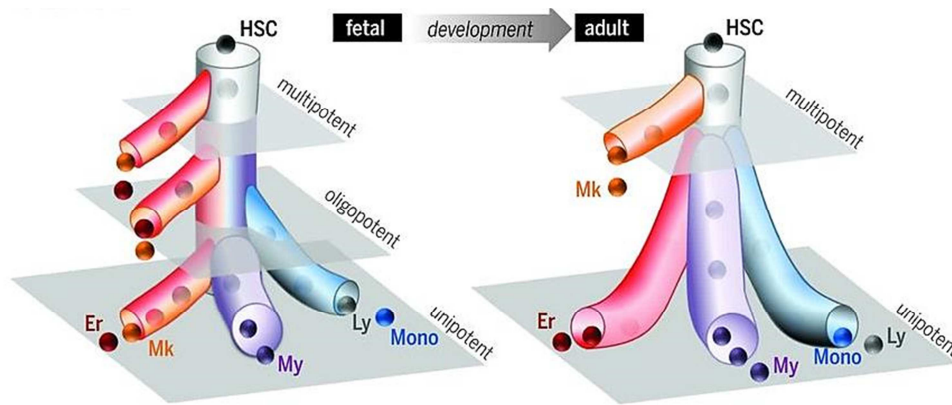


Figura 13. Modelo redefinido del sistema hematopoyético adulto. Este modelo prevé un cambio en la jerarquía celular clásica, originando un nivel multipotente con la formación del linaje megacariocítico y un nivel oligopotente con la formación de los linajes eritroides, mieloides y linfoides. Adaptada de Notta *et al.*¹²²

2.3. Regulación del desarrollo hematopoyético embrionario

El desarrollo del sistema hematopoyético embrionario está controlado a nivel transcripcional por una red compleja de TF y efectores de diversas rutas de señalización. Estos factores se encargan de regular el mantenimiento y la expansión de las HSC, además de su especificación a los diferentes linajes celulares que componen el organismo^{97, 127}.

Tanto la especificación de las HSC durante el desarrollo embrionario como su posterior compromiso hematopoyético están controlados a nivel molecular por diferentes TF. La correcta determinación de los ejes corporales, las capas germinales primarias y la compartimentalización del mesodermo en órganos y tejidos son requisitos necesarios para la especificación hematopoyética. Tanto la hematopoyesis primitiva como la definitiva están controladas por diversos TF¹²⁷. La regulación del sistema hematopoyético embrionario ha sido más estudiada en el modelo de ratón, lo que nos ha permitido extrapolar y ampliar nuestro conocimiento sobre el control molecular de la hematopoyesis en humanos.

2.3.1. Regulación transcripcional de la hematopoyesis primitiva.

La hematopoyesis primitiva está regulada en gran medida por Gata1 y Pu.1. Estas proteínas se antagonizan entre sí a través de una interacción física directa que reprime programas de linaje alternativos, como son el linaje primitivo eritroide y mieloide. Gata1 es un regulador clave del desarrollo eritroide promoviendo su diferenciación e inhibiendo la formación del linaje mieloide. En cambio, Pu.1 es un regulador esencial del linaje mieloide, originando macrófagos y granulocitos¹²⁸⁻¹²⁹ (Figura 14).

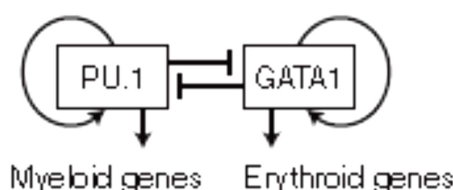


Figura 14. Esquema representativo de la regulación transcripcional ejercida por Gata1 y Pu.1 en la hematopoyesis primitiva embrionaria. Adaptada de Rieger and Schroede¹³⁰.

2.3.2. Regulación transcripcional de la hematopoyesis definitiva. En el desarrollo de la hematopoyesis definitiva están implicados un gran número de factores intrínsecos y extrínsecos que regulan el desarrollo y mantenimiento de las HSC. La formación del mesodermo precisa de la señalización conjunta de Nodal, Bmp4, Notch y Wnt. La especificación del mesodermo y de las otras capas germinales se integra en el diseño dorso-ventral y antero-posterior¹³¹. La especificación de las HSC depende de este diseño, ya que la aorta dorsal se desarrolla a partir de la placa mesodérmica lateral ventro-posterior. En la especificación antero-posterior la señalización por Wnt es activamente suprimida en la región anterior mediante la secreción de antagonistas, mientras que ligandos de Wnt y Bmp4 cooperan para especificar el mesodermo ventro-posterior¹³¹⁻¹³³. La fase previa a la formación de las HSC es el desarrollo del endotelio hemogénico que yace en la parte ventral de la aorta dorsal primitiva, la cual expresa el receptor de VEGF (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*), KDR (también conocido como FLK1 o VEGFR2). Tanto VEGF como su receptor KDR regulan la vasculogénesis (desarrollo de los vasos sanguíneos a partir de células endoteliales progenitoras durante la embriogénesis temprana) y la angiogénesis (formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos pre-existentes en una etapa posterior)^{131, 134}. Una vez que se establece el ambiente estromal, se requiere de las vías de Shh (del inglés, *Sonic hedgehog*) y VEGFa para la especificación arterio-venosa y de las HSC. Ambas señales regulan la convergencia del hemangioblasto en la placa lateral del mesodermo, además de controlar la activación de Notch en el endotelio¹³⁵.

La vía de Notch está involucrada en la formación temprana del tronco vascular de los vertebrados, incluyendo la aorta dorsal que contiene el endotelio hemogénico. La señalización de Notch es esencial para la maduración del endotelio arterial del cual derivan las HSC. Además, es clave en la especificación de linaje de las HSC¹³⁶⁻¹³⁷.

Notch1, receptor de Notch, es crítico para el desarrollo hematopoyético definitivo y se encuentra situado por encima de Runx1¹³⁸. Tanto Runx1 como su compañero CBF β son necesarios para el establecimiento del programa hematopoyético definitivo¹³⁹⁻¹⁴¹. La delección condicionada de Runx1 en células endoteliales de ratón ha demostrado que el requerimiento de Runx1 en la vasculatura es fundamental para la generación de las HSC¹⁴². Su expresión está muy relacionada con el proto-oncogen *c-Myb*, ya que ambos comienzan a expresarse en la pared ventral de la aorta dorsal, a día E8.5 en embriones de ratón¹⁴¹.

Por otro lado, se ha identificado un gran número de TF que juegan un rol crucial en la especificación de las HSC durante el desarrollo hematopoyético embrionario. En el desarrollo del hemangioblasto intervienen un conjunto de TF que coordinan tanto la diferenciación endotelial como hematopoyética. En la formación del hemangioblasto a partir del mesodermo destaca Etv2. Etv2 actúa por debajo de la señalización de Bmp4, Wnt y Notch. Comienza a expresarse en el desarrollo del mesodermo y marca una subpoblación de células mesodérmicas Flk1⁺ con un potencial endotelial y hematopoyético^{131, 143}.

A continuación, la expresión de Tal1/Scl marca el compromiso del hemangioblasto hacia el endotelio hemogénico. Scl es un regulador clave, ya que empieza a expresarse en el hemangioblasto y mantiene su expresión durante el desarrollo del endotelio hemogénico y de las HSC¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. La expresión de Scl está regulada por varios factores que potencian la hematopoyesis. Scl forma un complejo transcripcional con Gata2 y Lmo2 que se encuentra estabilizado por la acción de Ldb1. Durante la diferenciación hematopoyética, este complejo induce la expresión de Runx1¹⁴⁶. Gata2 se expresa antes de que aparezcan las primeras HSC y parece ser que ejerce un papel esencial en la especificación hematopoyética¹⁴⁷. Gata2 tiene un rol que solapa con Runx1 en la hematopoyesis definitiva, ya que ratones heterocigotos *Gata2*^{+/-} *Runx1*^{+/-} no son viables presentando defectos en la hematopoyesis en mitad de la etapa de gestación, mientras que los heterocigotos simples son viables con un fenotipo hematopoyético menor¹⁴⁸. El factor de transcripción Erg es crítico para el mantenimiento temprano pero no para la especificación de las HSC definitivas ya que su delección resulta en una pérdida rápida de las HSC. Se piensa que actúa como un regulador por encima de Scl, Gata2 y Runx1¹⁴⁸⁻¹⁴⁹.

En la especificación del endotelio hemogénico también están implicados varios TF. Entre estos factores clave, se encuentran HoxA3 y Runx1 que regulan el balance entre la diferenciación endotelial y hematopoyética. HoxA3 es un regulador positivo de la especificación endotelial del endotelio hemogénico. Se encarga de mantener la expresión de los genes endoteliales durante el desarrollo hematopoyético embrionario. Por otro lado, Runx1 ejerce una acción represiva directa sobre HoxA3. Runx1 induce la expresión de una cascada de TF hematopoyéticos, mediante la represión de los genes endoteliales¹⁵⁰.

La figura 15 representa un esquema de la especificación de las HSC definitivas a partir del mesodermo durante el desarrollo hematopoyético embrionario.

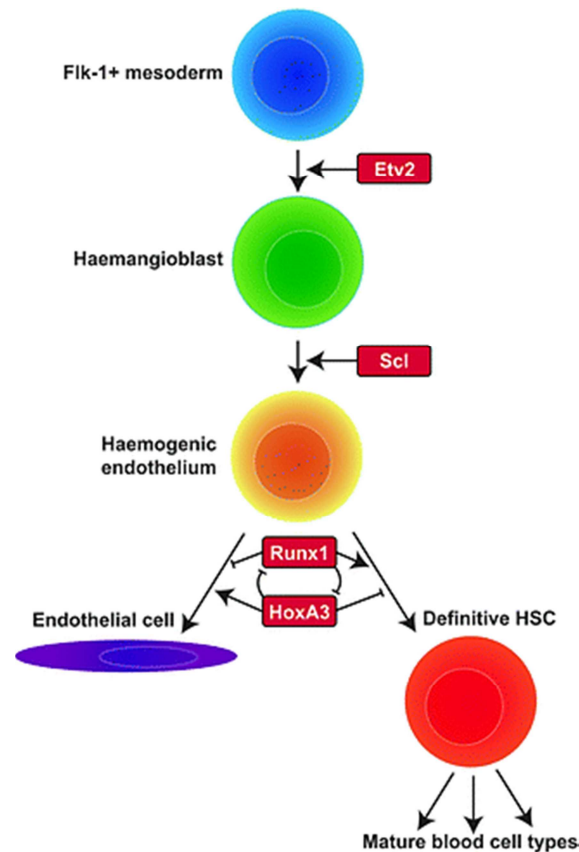


Figura 15. Genes implicados en la especificación de las HSC definitivas a partir del mesodermo durante la hematopoyesis embrionaria. Las HSC definitivas derivan del mesodermo Flk1⁺. Etv2 media la formación del hemangioblasto a partir del mesodermo, mientras que Scl regula el desarrollo del endotelio hemogénico. La especificación del endotelio hemogénico a células hematopoyéticas o endoteliales es dependiente de la expresión antagonista de Runx1 y HoxA3. HoxA3 induce la formación de células endoteliales, mientras que Runx1 activa la diferenciación a células hematopoyéticas. Adaptada de Wilkinson *et al.*¹⁵¹

Una vez generado el endotelio hemogénico, de él se originarán las primeras HSC como comentamos anteriormente en un proceso denominado EHT. Se estima que en torno al día E11.5 existe únicamente una HSC por AGM. La expansión de las HSC tempranas es una fase crítica para la formación de una población lo suficientemente grande como para mantener la hematopoyesis a lo largo de la vida de un organismo. Esta capacidad de proliferación es característica de las HSC fetales a diferencia de las adultas, que mantienen el tamaño de la población. Sox17 es un TF que se expresa exclusivamente durante la hematopoyesis fetal y neonatal, y desaparece en las HSC adultas¹⁵². En los últimos años, se ha observado que Sox17 es necesario para la especificación del endotelio hemogénico pero se requiere que su expresión disminuya para la EHT, ya que reprime la activación de Runx1 y Gata2 necesaria para la formación de las HSC¹⁵³. De manera similar, se ha demostrado que Sox7 marca la especificación del endotelio hemogénico al bloquear la etapa EHT y promover la formación endotelial¹⁵⁴⁻¹⁵⁵. Sox7 interactúa físicamente con Runx1 impidiendo la activación de la diferenciación a células hematopoyéticas por parte de Runx1¹⁵⁶.

La figura 16 muestra un esquema representativo de la regulación de los TF más importantes durante el desarrollo de la hematopoyesis embrionaria definitiva.

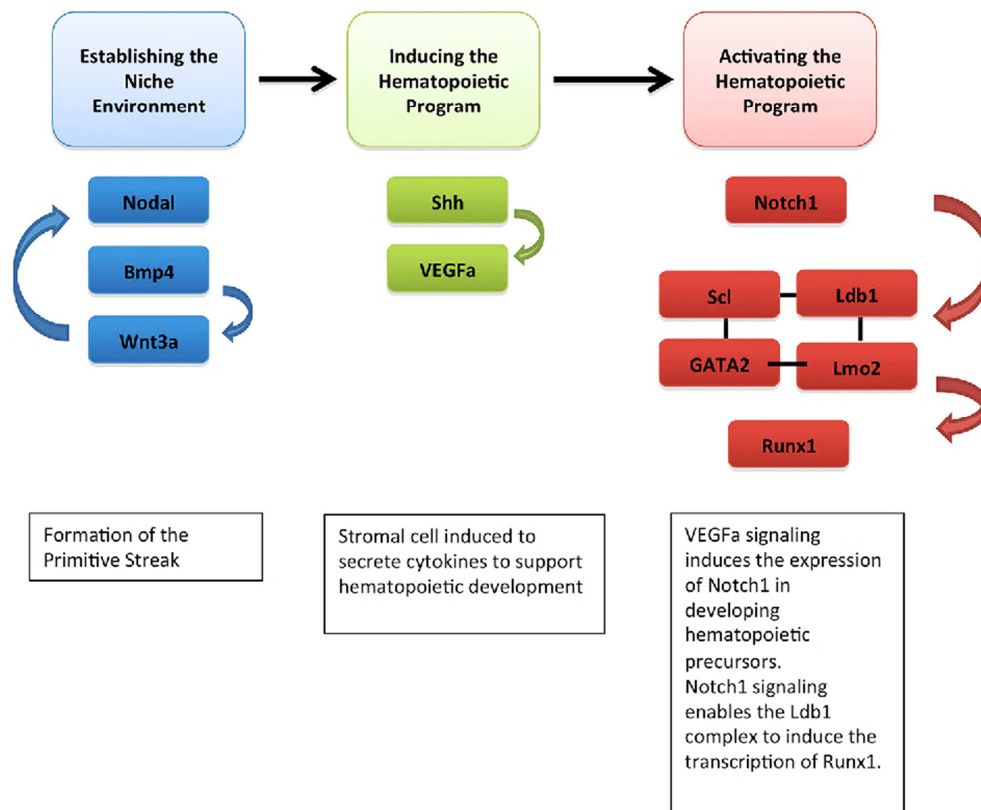


Figura 16. Regulación del desarrollo hematopoyético embrionario. Establecimiento del nicho estromal por la señalización de Nodal, Bmp y Wnt. Una vez establecido el ambiente estromal, Shh induce la expresión de Vegf por las células estromales. Esta señalización activa la vía de Notch1 en los precursores hematopoyéticos. Posteriormente, Nocth1 induce la transcripción del complejo formado por Scl-Gata2-Lmo2-Ldb1 que a su vez activa la expresión de Runx1, imprescindible para la formación de las células hematopoyéticas¹⁵⁷.

2.4. RUNX1 en la hematopoyesis

De todos los TF implicados en el desarrollo de la hematopoyesis descritos anteriormente, RUNX1 destaca por encima del resto ya que posee una función crítica durante la etapa EHT y posteriormente también es esencial para completar el desarrollo hematopoyético.

RUNX1, también conocido como AML1 (del inglés, *Acute Myeloid Leukemia 1*), CBF α 2 (del inglés *Core Binding Factor α 2*) o PEPBP2 α B (del inglés *Polyomavirus enhancer binding protein 2 α B*) pertenece a la familia de factores de transcripción Runt (CBF). La proteína Runt fue descubierta por primera vez en 1985 por el Dr. Gergen en embriones de *Drosophila*, está codificada por el gen *runt* y se requiere para la segmentación normal, determinación sexual y neurogénesis durante la embriogénesis de *Drosophila*¹⁵⁸⁻¹⁵⁹. La denominación de AML1 se debe al descubrimiento de su secuencia génica en un paciente humano con leucemia mieloide aguda (AML, del inglés *Acute Myeloid Leukemia*) positiva para t(8;21)¹⁶⁰.

Además de *RUNX1*, existen otros dos genes *RUNX* en ratones y humanos: *RUNX2* y *RUNX3*. *RUNX2* es necesario para el desarrollo óseo¹⁶¹⁻¹⁶² y *RUNX3* es esencial para el desarrollo gastrointestinal y neural¹⁶³⁻¹⁶⁵.

2.4.1. Organización genómica e isoformas de RUNX1

En humanos, el *locus RUNX1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 21 en la posición 22.12, se expande en torno a 261 kb y está compuesto por 12 exones. Su expresión está regulada por dos promotores, el promotor distal o P1 y el promotor proximal o P2 separados por 160 kb (Figura 17A). Mediante el uso diferencial de estos dos promotores además del *splicing alternativo* se producen numerosos transcritos a partir del gen, que difieren en sus regiones 5'UTR, 3'UTR y en los exones que los componen¹⁶⁶⁻¹⁶⁷. Todas las isoformas presentan el dominio Runt localizado en el extremo N-terminal. Este dominio de 128 aminoácidos, también conocido como RHD (del inglés, *Runt Homology Domain*) está presente en todos los miembros de la familia CBF y es necesario para la unión al ADN, en concreto a la secuencia consenso YGYGGT, y a ciertas proteínas, especialmente al complejo CBF β (del inglés, *Core Binding Factor β*) que incrementa 10 veces su afinidad por el ADN¹⁴¹.

De los múltiples transcritos o isoformas que se generan a partir del *locus RUNX1*, las 3 isoformas proteicas más estudiadas son RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c. Estas isoformas se expresan de forma diferencial durante el desarrollo embrionario y en la hematopoyesis adulta (Figura 17B). RUNX1a con 250 aminoácidos y RUNX1b con 453 aminoácidos son transcritas desde el promotor P2, presentan 5 y 6 exones respectivamente. Ambas isoformas proteicas comparten el extremo N-terminal pero difieren en su extremo C-terminal. RUNX1a carece de dominios reguladores de la transcripción (TAD, del inglés *TransActivation Domain*) presentes en el extremo C-terminal común en RUNX1b y RUNX1c¹⁶⁸⁻¹⁶⁹. El TAD se une a un gran número de proteínas de activación y represión que modulan la compleja actividad transcripcional de estas isoformas proteicas. Además, contiene un motivo evolutivamente conservado, el motivo VWRPY que interacciona con una familia de genes co-represores de unión al ADN implicados en diferenciación hematopoyética, el homólogo en mamíferos Groucho o TLE1¹⁷⁰. RUNX1c presenta 480 aminoácidos y es transcrita por el promotor P1, contiene 8 exones y produce una proteína que es idéntica a RUNX1b, excepto por los primeros 32 aminoácidos de su extremo N-terminal, codificados por los exones 1 y 2¹⁶⁸⁻¹⁶⁹ (Figura 17C).

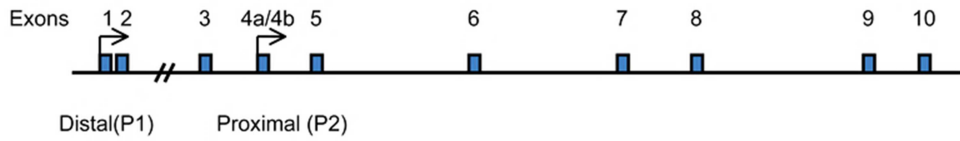
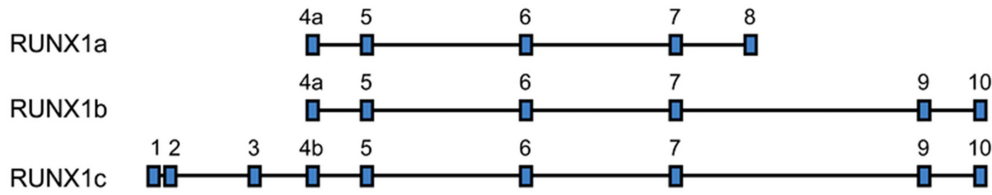
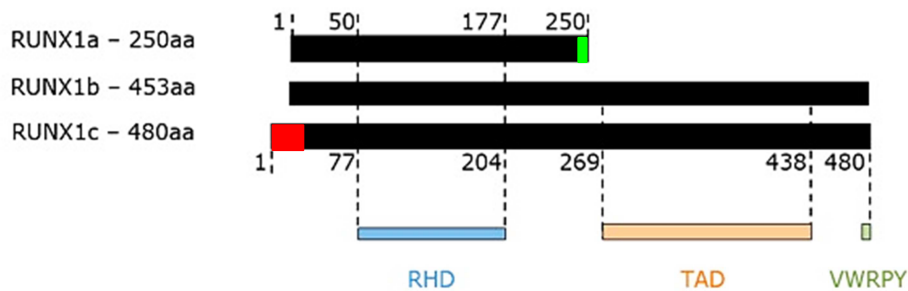
A**B****C**

Figura 17. Estructura génica e isoformas del locus *RUNX1*. A. Locus genómico de *RUNX1* en el cromosoma 21 con la localización de los promotores proximal y distal y los exones basados en la base de datos del NCBI Nucleotide¹⁷¹. B. Composición exónica de las tres isoformas principales de *RUNX1*¹⁷¹. C. Diagrama de las tres principales variantes proteicas de *RUNX1* y su número de aminoácidos. En verde la porción única de *RUNX1a* y en rojo la porción única de *RUNX1c*. Adaptada de Van der Kouwe and Staber¹⁷².

RUNX1 posee otros dominios proteicos que permiten su interacción con otras proteínas nucleares para regular la transcripción de sus genes diana. *RUNX1* contiene una señal de localización nuclear en su extremo C-terminal que ayuda en la activación transcripcional¹⁷³. Al final del extremo C-terminal se encuentra el motivo VWRPY que media la actividad represora de *RUNX1* dependiente de Groucho/TLE¹⁷⁰. *RUNX1*, además de interactuar con el complejo CBF β , interacciona con numerosos TF y co-reguladores transcripcionales mediante el dominio Runt. *RUNX1* y Ets1, mediante su interacción, coordinan la actividad transcripcional del receptor de células T¹⁷⁴. Se ha reportado que *RUNX1* interacciona con GATA1¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ y con FLI1¹⁷⁷ para llevar a cabo la diferenciación a megacariocitos y con PU.1¹⁷⁸⁻¹⁷⁹ y con CEBP α ^{178, 180} para activar genes de diferenciación mieloide, entre otros¹⁸¹⁻¹⁸³ (Figura 18).

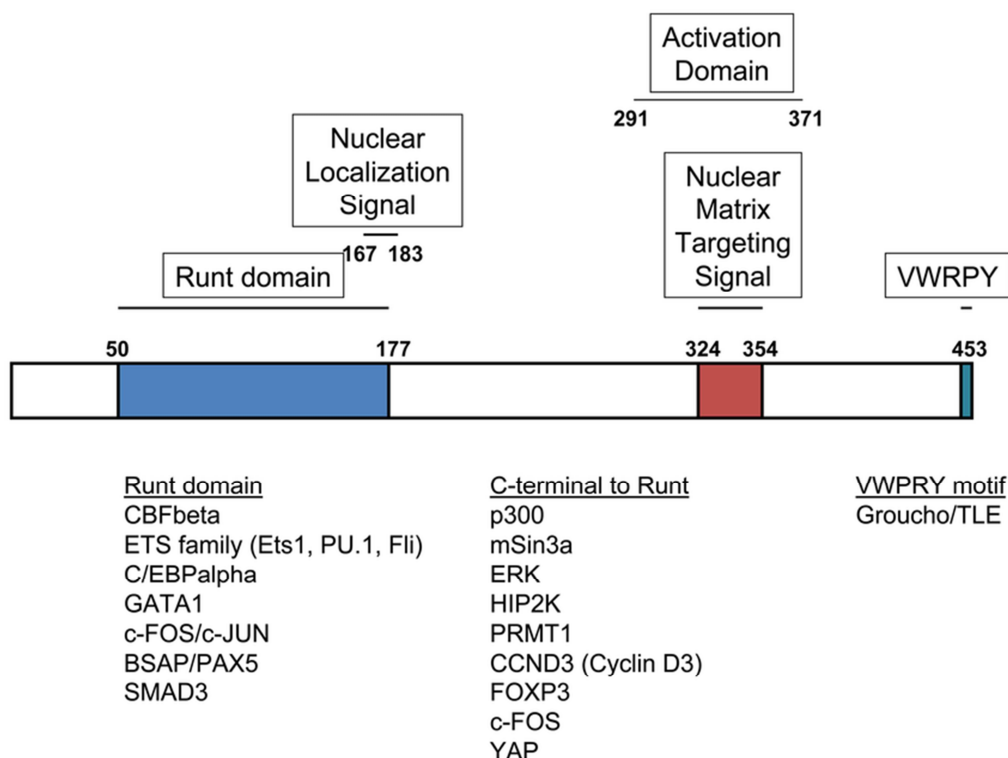


Figura 18. Dominios proteicos de RUNX1 y sus compañeros de interacción. Se muestra la isoforma RUNX1b con los dominios principales en la parte superior y los compañeros de interacción en la parte inferior¹⁷¹.

Además de todos estos niveles de regulación e interacciones proteína-proteína, existen una serie de modificaciones post-transduccionales, como fosforilación¹⁸⁴, ubiquitinación¹⁸⁵ y metilación¹⁸⁶ que también regulan la función de RUNX1.

2.4.2. RUNX1 en la hematopoyesis embrionaria

Como hemos explicado anteriormente, la hematopoyesis embrionaria se divide en dos fases: hematopoyesis primitiva y definitiva. En ratón, la hematopoyesis primitiva comienza en el saco vitelino a E7.25 produciendo eritrocitos y megacariocitos primitivos. La hematopoyesis definitiva empieza a E8.25 con la producción transitoria de los EMP, seguida de los progenitores linfoides en el saco vitelino, la placenta a E9.0 y las HSC a E10.5 en la AGM y arterias vitelina y umbilical^{92, 95, 100, 187}. Runx1 se expresa en el mesodermo del saco vitelino y en el endotelio hemogénico desde E7.5 hasta poco después de E11.5, por lo que participa en ambas fases. Su expresión se encuentra en todos los sitios de hematopoyesis del embrión y precede la aparición de los progenitores hematopoyéticos definitivos y las HSC.

- Runx1 en la hematopoyesis primitiva. Durante la hematopoyesis primitiva, ratones deficientes en *Runx1* no producen macrófagos ni sus progenitores *in vivo*, al igual que ocurre con la diferenciación hematopoyética *in vitro* a partir de mESC¹⁸⁸⁻¹⁸⁹. En cambio, los megacariocitos y eritrocitos primitivos pueden formarse en ausencia de *Runx1*, aunque su desarrollo normal se ve afectado por la ausencia de *Runx1*. Embriones deficientes en *Runx1* producen un número de colonias eritroides primitivas comparables a los controles de la camada y no parecen anémicos¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Por otra parte, análisis más detallados muestran que una proporción de eritrocitos primitivos presentan morfología anormal y una reducida expresión del marcador eritroide Ter119 y los TF eritroides Klf1 y Gata1, además de una maduración defectuosa de estos eritrocitos. A pesar de estas anomalías, los eritrocitos primitivos deficientes en *Runx1* muestran una función normal, con niveles normales de hemoglobinización¹⁹⁰. *Runx1* tampoco se requiere para la formación de megacariocitos diploides primitivos, aunque su número de producción y de formación de plaquetas es más bajo en embriones deficientes en *Runx1*¹⁹¹.
- Runx1 en la hematopoyesis definitiva. Durante la hematopoyesis definitiva los EMP, los progenitores linfoides y las HSC se diferencian a partir del endotelio hemogénico y su formación depende estrictamente de *Runx1* y de su heterodímero CBF β ^{100-103, 141-142}. Como ya se ha reportado anteriormente, *Runx1* tiene un papel crítico en la etapa EHT, suprimiendo el programa transcripcional endotelial y activando la formación de las HSC definitivas a partir del endotelio hemogénico^{142, 189}. *Runx1* se encuentra expresado en todas las células hematopoyéticas adultas de ratón, a excepción de los eritrocitos maduros¹⁹². La necesidad de *Runx1* para la hematopoyesis definitiva queda reflejada en el hecho de que ratones deficientes en *Runx1* mueren en torno a E11.5-12.5 debido a la ausencia de todas las células hematopoyéticas definitivas¹⁹³⁻¹⁹⁴.

Además, las células hematopoyéticas están involucradas en la remodelación vascular durante la embriogénesis y expresan Vefg y Angiopoyetina-1 (Ang-1), factores de crecimiento vascular que promueven el desarrollo y la maduración de los vasos sanguíneos¹⁹⁵. El análisis de la vasculatura en embriones deficientes en *Runx1* reveló una disminución de la vasculatura en la cabeza, en el pericardio y en la arteria vitelina del saco vitelino. Por tanto, estos resultados sugieren que los defectos vasculares en embriones de ratón deficientes en *Runx1* se deben a la pérdida de células hematopoyéticas definitivas que expresan Ang-1¹⁹⁶. Modelos más refinados de delección condicional demuestran que la delección de *Runx1* en células endoteliales VE-cadherin⁺ (del inglés, *Vascular Endothelial-cadherin*) bloquea por completo la formación de EMP y HSC, confirmándose que *Runx1* es necesario para la EHT¹⁴². Sin embargo, la delección de *Runx1* en células hematopoyéticas que expresan Vav1 no interrumpe la formación de los EMP ni las HSC, aunque sí se detectan defectos en linajes específicos como el linfocito o el megacariocítico^{142,197}. Por tanto, *Runx1* es necesario para la etapa EHT pero no después.

Estudios posteriores demuestran que *Runx1* es requerido en distintos momentos del desarrollo embrionario y en el endotelio hemogénico para la formación de los EMP y las HSC. A día E10.5 la mayoría de los EMP ya se han diferenciado a partir del endotelio hemogénico y la delección de *Runx1* hasta ese momento, no después, afecta negativamente al número de EMP.

En cambio, la delección de *Runx1* entre los días E10.5-11.5 no tiene consecuencias en los EMP aunque elimina completamente las HSC en la AGM y en la arteria umbilical y vitelina¹⁹⁸.

El requerimiento temporal y separado de *Runx1* para la formación de los EMP y de las HSC es consistente con el hecho de que estas poblaciones celulares son detectadas por primera vez en distintos momentos del desarrollo hematopoyético embrionario¹⁹⁹.

Por otra parte, una haploinsuficiencia en *Runx1* resulta en un cambio dramático en la distribución espacial y temporal de las HSC, apareciendo más temprano de lo habitual en el saco vitelino (E10.0) y con una terminación prematura a partir de la AGM²⁰⁰.

A partir de día E14.5 la expresión de *Runx1* desaparece en las células endoteliales y termina de disiparse en los clústeres hematopoyéticos de las arterias principales. Las células que nacieron en las arterias se liberan a la circulación y colonizan el hígado fetal y el timo²⁰⁰⁻²⁰¹.

Al contrario de lo que ocurre con un déficit en *Runx1*, la hematopoyesis definitiva no queda completamente bloqueada en ausencia de CBF β .

Varios estudios sugieren que la unión de baja afinidad al ADN por parte de *Runx1* en ausencia de CBF β es suficiente para iniciar la hematopoyesis definitiva, pero no para completarla y evitar la letalidad del embrión entre los días E.11.5-13.5²⁰³⁻²⁰⁴.

La figura 19 muestra las diferentes oleadas de la hematopoyesis embrionaria y los lugares de expresión de *Runx1*, además de los progenitores hematopoyéticos que dependen de la expresión de *Runx1*.

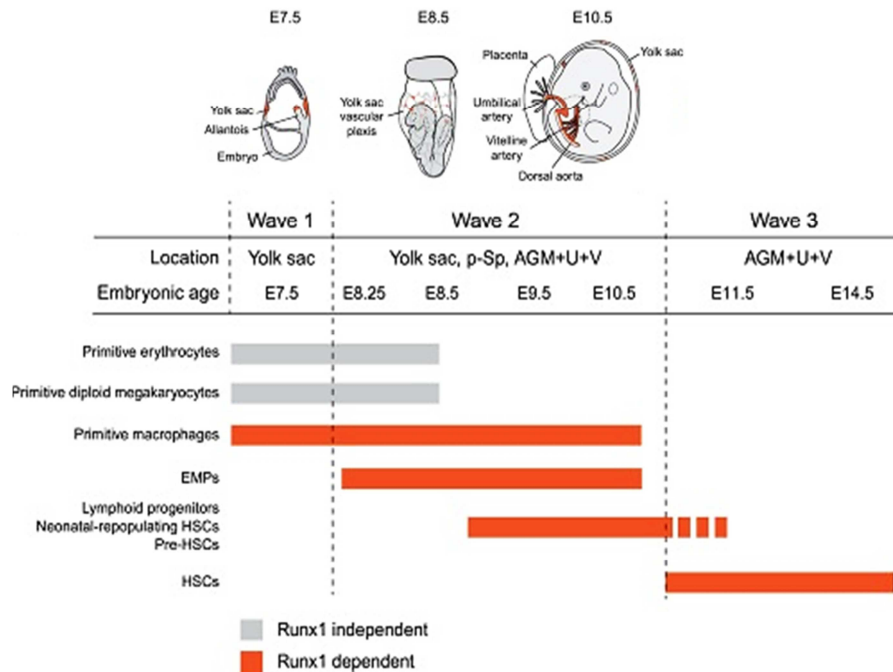


Figura 19. Oleadas de aparición de las células hematopoyéticas y los sitios de expresión de Runx1. El diagrama muestra las diferentes etapas/oleadas durante la hematopoyesis embrionaria de ratón. La línea naranja muestra las células de las diferentes oleadas con expresión dependiente de RUNX1 y la línea gris las células que no dependen de la expresión de RUNX1 para su formación. U: arteria umbilical y V: arteria vitelina. Adaptada de Tober *et al.*¹⁹⁸

También se ha investigado la implicación de las isoformas principales durante el desarrollo embrionario del sistema hematopoyético. Se han creado ratones transgénicos con genes reporteros bajo el control del promotor P1 (principalmente isoforma *Runx1c*) o P2 (isoformas *Runx1a* y *Runx1b*) y se ha analizado su expresión a lo largo del desarrollo embrionario. Ambos modelos muestran la activación del promotor P2 en etapas tempranas del desarrollo, expresándose en primer lugar en eritrocitos primitivos, antes que la activación del promotor P1. Este promotor se activa transcripcionalmente en torno a la formación de las primeras HSC y va ganando importancia relativa con respecto a P2, que comienza a reprimirse hasta que finalmente solo se detecta P1 en las HSC adultas²⁰⁵⁻²⁰⁶. Sin embargo, en pez cebra los patrones de expresión son contrarios, siendo P1 el primer promotor en activarse en los EMP, mientras que P2 se activa más tarde y está localizado en HSC²⁰⁷. Por otro lado, en estudios de diferenciación a células hematopoyéticas a partir de hESC las isoformas proteicas RUNX1a y RUNX1b se expresaron consistentemente a lo largo de la diferenciación hematopoyética, mientras que la isoforma RUNX1c solo se expresó en el momento de la aparición de las HSC definitivas. Estos resultados sugirieron que la isoforma RUNX1c puede ser importante para la especificación o función de las HSC definitivas¹⁶⁹. Estos resultados reflejan diferencias inherentes en la regulación de los promotores entre distintas especies.

2.4.3. RUNX1 en enfermedades hematológicas

En humanos, el *locus RUNX1* está involucrado en varias translocaciones cromosómicas desencadenantes de leucemias mieloides. En 1991, se identificó la primera translocación cromosómica que afectaba a *RUNX1* derivando en AML, *RUNX1-ETO* (también conocida como *RUNX1-RUNX1T1*, *AML1-MTG8* o *RUNX1-CBFA2T1*) mediante la fusión de los cromosomas 8 y 21 $t(8;21)^{208}$. Además de la $t(8;21)$, podemos encontrar más de 50 translocaciones que afectan a *RUNX1*, pero las más comunes son *TEL-RUNX1* (conocida también como *ETV6-RUNX1*) involucrando a los cromosomas 12 y 21 $t(12;21)$ y *RUNX1-EVI1* (también conocida como *RUNX1-MECOM*) que afecta a los cromosomas 3 y 21 $t(3;21)^{209-210}$ (Figura 20). *TEL-RUNX1* es la anomalía cromosómica más común en niños con leucemia linfoblástica aguda (ALL, del inglés *Acute Lymphoblastic Leukemia*), ocurre durante la diferenciación de las células B originando blastos leucémicos que bloquean el desarrollo de células B²⁰⁹. *RUNX1-ETO* y *RUNX1-EVI1* consisten en la pérdida de función de *RUNX1*, por lo que reprimen genes específicos del linaje mieloide y terminan originando leucemias^{208, 210}.

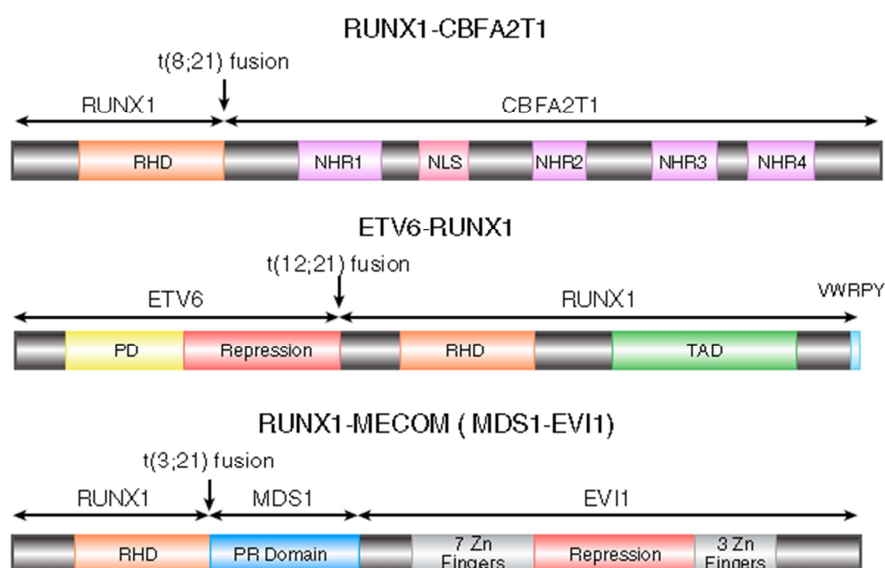


Figura 20. Esquema de las translocaciones más frecuentes de *RUNX1* que implican fusión de proteínas. *RUNX1-CBFA2T1* implica la fusión del RHD de *RUNX1* y las cuatro regiones de homología (NHR1-4) de *CBFA2T1*. *ETV6-RUNX1* implica la fusión del N-terminal de *ETV6* con casi toda la proteína *RUNX1*. *RUNX1-MECOM* implica la fusión del RHD de *RUNX1* con una o ambas proteínas, *MDS1* y *EVI1*. Adaptada de Sood *et al.*²¹¹

Además, se han identificado mutaciones somáticas y germinales que afectan a *RUNX1* y desencadenan en leucemias mieloides. La primera mutación puntual en *RUNX1* que ocasiona leucemia se identificó en 1999²¹². A partir de ese momento, diversos estudios posteriores documentaron mutaciones somáticas frecuentes en *RUNX1* involucradas en MDS, AML, ALL y leucemia mielomonocítica crónica (CMML, del inglés *Chronic Myelomonocytic Leukemia*)²¹³⁻²¹⁵. Mutaciones de *RUNX1* en la línea

germinal causan trastornos plaquetarios familiares con neoplasia mieloide asociada (FPDMM, del inglés *Familial Platelet Disorder with Associated Myeloid Malignancy*)²¹⁶.

Todos estos estudios sugieren que RUNX1 juega un papel muy importante en el desarrollo de células leucémicas, incluso en la supervivencia de estas células²¹⁷.

2.5. Generación de HSC a partir de hPSC

El trasplante de HSC es la terapia celular más utilizada en la clínica para tratar las enfermedades hematológicas. Sin embargo, las limitaciones para la obtención de HSC de diferentes fuentes (médula ósea, sangre periférica o cordón umbilical) y la incapacidad para expandir eficientemente HSC *ex vivo* restringen su aplicación clínica. La investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías para la generación, expansión y mantenimiento de HSC trasplantables *in vitro* son esenciales para las futuras aplicaciones clínicas²¹⁸⁻²²⁰. El empleo de hPSC para generar células sanguíneas de forma ilimitada con fines terapéuticos suscitó un gran interés en el ámbito de la investigación y la medicina desde su descubrimiento. Desde el primer estudio de diferenciación de hESC a células hematopoyéticas por el Dr. Kaufman en 2001²²¹, se han desarrollado numerosos estudios basados en hPSC para generar células hematopoyéticas humanas funcionales.

Para llevar a cabo diferenciaciones hematopoyéticas derivadas de hPSC hay que recordar el proceso de embriogénesis para intentar mimetizar todas las etapas del desarrollo hematopoyético *in vitro*. Para generar células hematopoyéticas a partir de hPSC se han llevado a cabo dos estrategias de diferenciación, una primera que consiste en el co-cultivo de hPSC con células estromales en medios de cultivo en presencia de suero²²²⁻²²⁴ y una segunda que se basa en el cultivo y diferenciación de hPSC en condiciones definidas²²⁵⁻²²⁷. La primera estrategia presenta algunas limitaciones que impiden controlar el proceso de diferenciación al completo, debido a los factores que se liberan al medio de cultivo, procedentes de las células estromales o del suero. En cambio, la segunda metodología es más reproducible y permite un mejor control del proceso de diferenciación. Aun así, ambas estrategias se han usado ampliamente para generar células hematopoyéticas derivadas de hPSC.

Otra técnica ampliamente desarrollada en las diferenciaciones hematopoyéticas *in vitro* derivadas de hPSC es la formación de EBs que mimetizan el desarrollo de las tres capas germinales del embrión, su formación varía desde su generación espontánea²²⁸ hasta la técnica de spin-EB²²⁹⁻²³⁰ y la formación de EBs colgantes/*hanging-drop EB*²³¹.

Las células estromales más empleadas en co-cultivo con las hPSC a lo largo de los estudios de diferenciación hematopoyética han sido las células OP9 de médula ósea de ratón²²⁵⁻²²⁷, células estromales derivadas de la AGM²³², de hígado fetal²³² y células S17 de médula ósea²³³.

Por otra parte, la exposición de hPSC a factores de crecimiento y citoquinas reguladoras durante el proceso de diferenciación promueve la generación de células hematopoyéticas. Los factores de crecimiento VEGF, FGF2, TGFβ y RA regulan la

transición de células endoteliales $CD31^+$ derivadas de hESC a células hematopoyéticas $CD43^+$ ²³⁴⁻²³⁵. Una inhibición de la señal $TGF\beta$ promueve la producción de células progenitoras hematopoyéticas (HPC, del inglés *Hematopoietic Progenitor Cells*) $CD43^+$ derivadas de HEC durante la diferenciación de hESC ²³⁶. La manipulación de las vías Activina y Nodal altera el desarrollo embrionario *in vitro* de las hPSC. La inhibición de estas vías de señalización promueve la formación de linfocitos T derivada de progenitores $CD34^+$ de hPSC ²³⁷. La presencia de BMP4, FGF2 y VEGF junto con la inhibición de la señalización de $TGF\beta$ promueve el desarrollo de HEC a partir de hPSC ^{231, 238}. $TGF\beta$ tiene un doble papel en la diferenciación hematopoyética y endotelial de hPSC. Por un lado, mejora el desarrollo del mesodermo temprano, pero por otro lado tras la inducción del mesodermo exhibe un efecto negativo sobre la generación de progenitores hematopoyéticos y endoteliales $CD34^+CD31^+CD144^+$ derivados de hPSC ²³¹. Varios estudios demuestran que la sobre-expresión del ligando DLL4 de la vía de NOTCH en células *feeders* mejora la diferenciación mieloide de hESCs ²³⁸, mientras que la sobreexpresión en células OP9 mejora la diferenciación de linfocitos T en hPSC ²³⁷. Además, la estimulación de DLL4 potencia la diferenciación hematopoyética de los HEP derivados de hESC ²³⁹.

Otra de las estrategias a seguir para mejorar la obtención de células hematopoyéticas a partir de hPSC es la expresión forzada de TF implicados en el proceso de generación de las HSC y especificación de linaje. HOXA9 se expresa en células progenitoras y hematopoyéticas, y su expresión ectópica en hESC promueve la diferenciación hematopoyética, especialmente al inducir la formación de células primitivas y maduras $CD45^+$ derivadas de los HEP de hESC ²⁴⁰. Alternativamente, la adición de HOXA9, ERG, RORA, SOX4 y MYB en hPSC favorece la diferenciación a progenitores mieloides $CD34^+CD45^+$ con potencial multilinaje ²⁴¹. Un estudio de la función de *RUNX1* en hPSC ha demostrado que, aunque las tres isoformas de *RUNX1* están sobre-expresadas durante la diferenciación de los EBs, la expresión forzada de *RUNX1a* mejora la diferenciación hematopoyética derivada de hPSC ²⁴². Nuestro grupo ha demostrado que *RUNX1c* induce la formación de HEP derivados de hESC, promoviendo su diferenciación a células hematopoyéticas ²⁴³⁻²⁴⁴.

Igualmente también hemos demostrado que la sobre-expresión de SCL en hESC acelera la formación de HEP y su consiguiente diferenciación a células hematopoyéticas ²⁴⁵. Además, hemos reportado que la expresión ectópica de SCL regula la especificación de linaje hematopoyético, induciendo la formación de células de linaje megacariocítico a partir de hESC ²⁴⁶⁻²⁴⁷.

Estudios recientes demuestran que la expresión ectópica de GATA2 potencia el desarrollo y mantenimiento de las células hematopoyéticas derivadas de hESC ²⁴⁸.

La figura 21 muestra un esquema de los TF implicados en la regulación del proceso de diferenciación de hPSC a células hematopoyéticas.

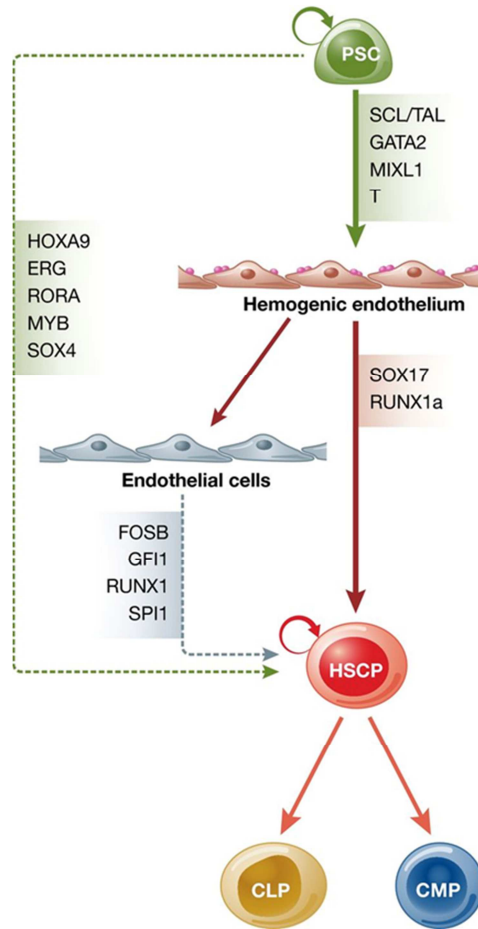


Figura 21. Estrategias de generación de células hematopoyéticas a partir de hPSC. Durante la diferenciación hematopoyética *in vitro*, las hPSC se diferencian a HEC capaces de formar células endoteliales o HSC que posteriormente darán lugar a células hematopoyéticas. El proceso de diferenciación de hPSC a células hematopoyéticas está regulado por varios TF. Adaptada de Ackermann *et al.*²⁴⁹

3. Megacariopoyesis y Trombopoyesis

3.1. Megacariopoyesis

La formación de los megacariocitos es un proceso complejo y orquestado conocido como megacariopoyesis que ocurre en la médula ósea. Dentro de este tejido podemos encontrar dos grandes ambientes o nichos con componentes celulares, composición y funcionalidad bien diferenciadas: el nicho osteoblástico (cercano al hueso) y el nicho vascular (próximo a la zona sinusoidal). Los megacariocitos son originados en el nicho osteoblástico a partir de las HSC. Éstas forman progenitores que se comprometen a linaje megacariocítico generando megacariocitos inmaduros que posteriormente migran al nicho vascular para completar su maduración. El proceso de maduración de los megacariocitos implica un incremento de su contenido de ADN por endomitosis (replicación del ADN sin división celular), hasta $128N$, acompañado de un aumento del contenido citoplasmático y desaparición del núcleo polilobulado^{91, 250-252} (Figura 22).

3.2. Trombopoyesis

Tras una remodelación completa del citoesqueleto, los megacariocitos maduros extienden sus proyecciones citoplasmáticas conocidas como pro-plaquetas que finalmente se convertirán en plaquetas y serán liberadas al torrente sanguíneo, con una vida media de 7-10 días en humanos y de 4-5 días en ratón (Figura 22). Cada megacariocito libera miles de plaquetas al sistema circulatorio. El proceso de formación de las plaquetas se denomina trombopoyesis y tarda en completarse unos 5 días en humanos y 2-3 días en ratón^{91, 250, 253}. Se generan unas 10^{11} plaquetas/día para mantener un promedio de 3×10^{11} plaquetas/L en el humano²⁵⁴. Todo este proceso está regulado por una serie de hormonas, citoquinas, componentes de la matriz extracelular y TF ^{91, 250}. El número constante de plaquetas en circulación es una consecuencia del equilibrio homeostático entre su producción y su destrucción en el bazo por células fagocíticas como los macrófagos²⁵⁵.

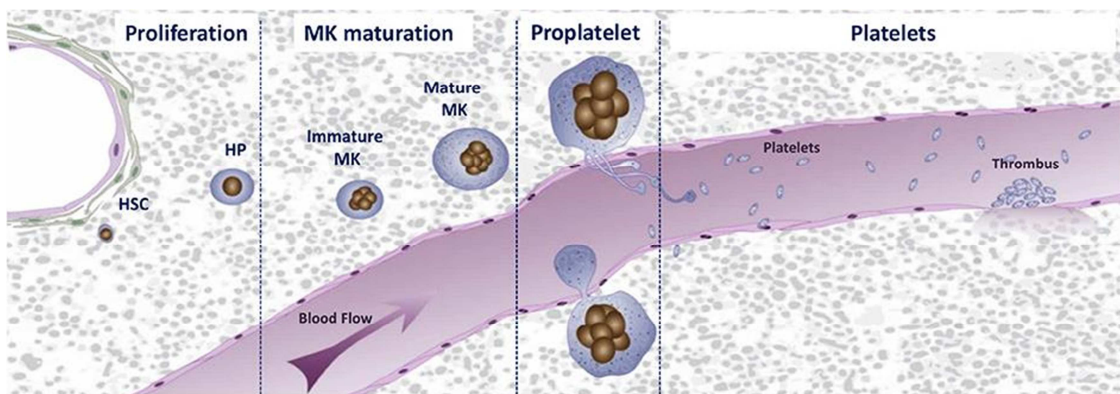


Figura 22. Biogénesis de los megacariocitos y las plaquetas en la médula ósea. Los megacariocitos se originan por las HSC mediante un proceso de endomitosis en el nicho osteoblástico de la médula ósea, migran al nicho vascular en su etapa de maduración y mediante la remodelación de su citoesqueleto originan las plaquetas que se liberan a la circulación sanguínea. Adaptada de Strassel *et al.*²⁵⁶

3.2.1. Organización estructural de las plaquetas

El Dr. Bizzozzero describió por primera vez las plaquetas como pequeños fragmentos celulares que se agrupaban en un tejido lesionado y demostró que carecían de núcleo²⁵⁷. Actualmente, se describen como células dinámicas y especializadas que derivan de sus células precursoras, los megacariocitos. El tamaño de una plaqueta madura es aproximadamente de 2-4 μm de diámetro, lo que las convierte en las células más pequeñas del sistema circulatorio²⁵⁸⁻²⁵⁹. Las plaquetas, también conocidas como trombocitos, se caracterizan por presentar un elaborado citoesqueleto interno, constituido por múltiples receptores de superficie, un sistema canalicular, microtúbulos, mitocondrias, tres tipos de gránulos (densos, lisosomales y α) y depósitos de glucógeno²⁵⁹ (Figura 23).

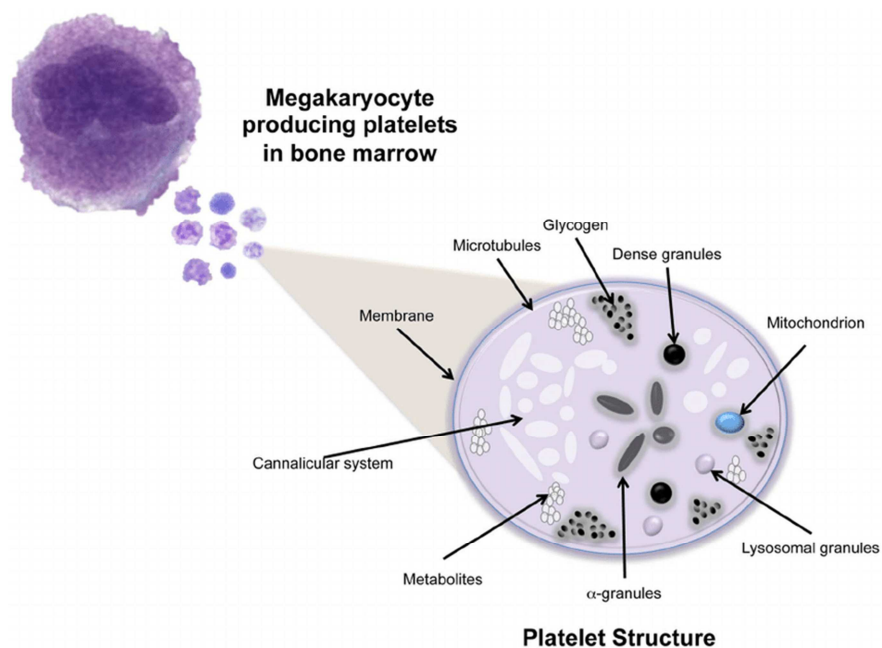


Figura 23. Organización estructural de una plaqueta. Las plaquetas son fragmentos anucleados formados por gránulos densos, lisosomales y α , depósitos de glucógeno, mitocondrias, metabolitos, microtúbulos y un sistema canalicular²⁶⁰.

3.2.2. Funciones de las plaquetas

Las principales funciones de las plaquetas son el mantenimiento de la hemostasis, trombosis, inflamación e integridad vascular. Los gránulos densos contienen factores que potencian la activación plaquetaria, mientras que los gránulos α contienen factores de crecimiento y proteínas de coagulación que contribuyen a la hemostasis^{259, 261}. Bajo un estímulo específico, como un daño vascular, se produce la activación de las plaquetas por proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y el factor von Willebrand (vWF, del inglés *von Willebrand Factor*). Su morfología esférica y compacta se convierte en irregular presentando receptores glicoproteicos en su membrana (complejos GPIb-IX-V, GPIIb-IIIa y GPVI, entre otros) que ayudan a las plaquetas a agruparse en la zona de la herida (Figura 24).

El complejo GPIb-IX-V se une al vWF que interacciona con el colágeno²⁶⁰, al que también se une GPVI²⁶¹ y el complejo GPIIb-IIIa se une al fibrinógeno²⁶⁰. Todas estas uniones, además de la unión a los componentes de la matriz extracelular promueven la activación, la adhesión y la agregación de las plaquetas²⁵⁹⁻²⁶¹.

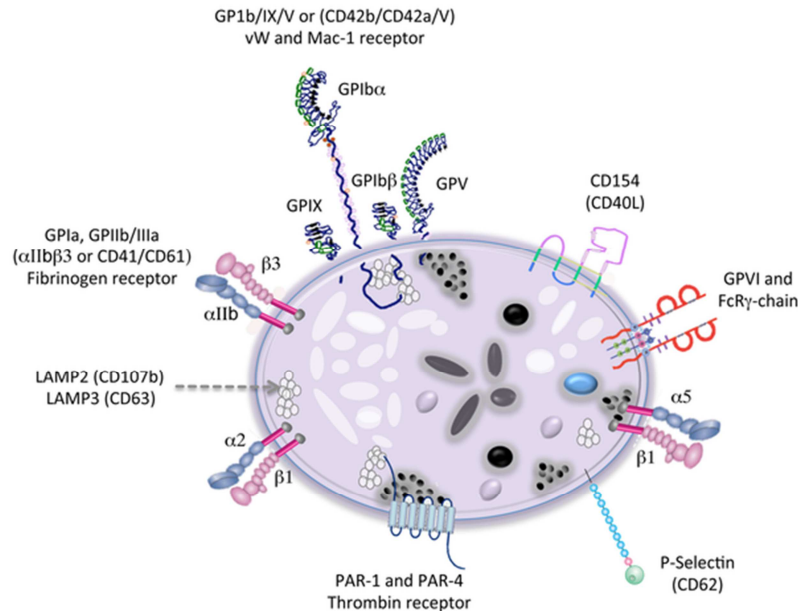


Figura 24. Glicoproteínas y receptores de la membrana plaquetaria. En la membrana de las plaquetas encontramos el complejo GPIb-IX-V que se une al factor vW, el complejo GPIa y GPIIb-IIIa de unión al fibrinógeno, el receptor de trombina y GPVI²⁶².

Tras la activación, las plaquetas liberan su contenido granular y los factores de coagulación que mejoran su activación y adhesión celular²⁶³. Los gránulos densos se fusionan con la membrana plaquetaria liberando ATP, ADP, 5-HT, calcio, serotonina y epinefrina al espacio extracelular²⁶³⁻²⁶⁴. Los α gránulos son las organelas secretoras más grandes de las plaquetas, actúan liberando una gran cantidad de quimioquinas como el factor plaquetario IV (PF4), glicoproteínas solubles como fibrinógeno y vWF y proteínas como la proteína básica plaquetaria y la P-selectina que ayuda a la adhesión plaquetaria, entre otros^{263, 265}. Los lisosomas contienen enzimas digestivas que actúan degradando proteínas y biomoléculas de todo tipo²⁶³.

Tras la activación plaquetaria se lleva a cabo el proceso de coagulación, por el cual se originará un coágulo o trombo por acción de la trombina, que además induce el paso de fibrinógeno a fibrina para recubrir la zona de la herida y detener el sangrado^{263, 267-268}.

La figura 25 muestra un esquema del proceso de adhesión, activación y agregación plaquetaria ante una lesión vascular.

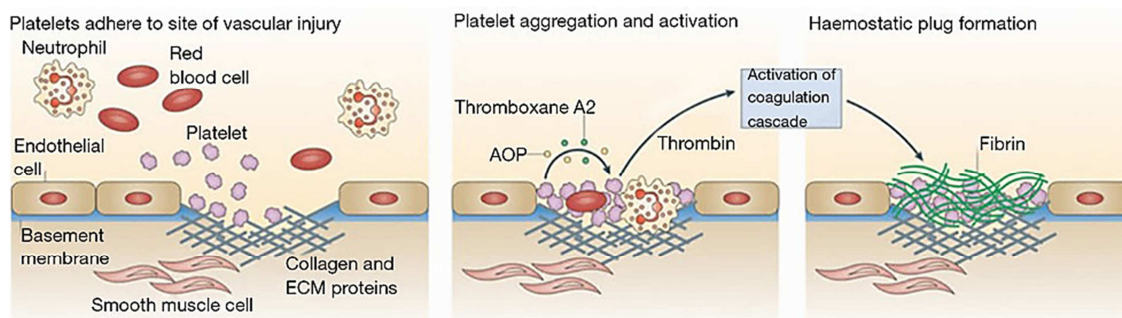


Figura 25. Representación esquemática de la adhesión, activación y agregación de las plaquetas ante un daño vascular. Las plaquetas se activan cuando ocurre un daño vascular, se adhieren y se agregan a la zona de la lesión, liberan su contenido granular junto con los factores de coagulación que inician la formación del trombo que recubrirá la herida junto con una red de fibrina²⁶⁶.

3.3. El papel de la hipoxia en la megacariopoyesis

En 1978, el concepto del microambiente especial o nicho de las HSC en médula ósea fue introducido por el Dr. Schofield²⁶⁹. El nicho de la médula ósea es un sistema regulador que controla la quiescencia, mantenimiento, auto-renovación y diferenciación de las HSC a células hematopoyéticas mediante la producción de factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular que activan una señalización interna para regular las funciones de las HSC²⁷⁰⁻²⁷¹. Se han identificado dos componentes del nicho importantes para la actividad de las HSC: el nicho osteoblástico y el nicho vascular. El revestimiento de la superficie por los osteoblastos y la adhesión de las HSC al nicho osteoblástico son mecanismos moleculares críticos para el mantenimiento de la quiescencia de las HSC²⁷². El nicho vascular está formado por las células hematopoyéticas y endoteliales y es el lugar dónde se lleva a cabo la proliferación y diferenciación o maduración de las HSC en circulación²⁷³⁻²⁷⁴.

La distribución de las HSC en el nicho está estrechamente asociada con la tensión de O₂, pero también la diferenciación a linaje megacariocítico²⁷⁵. La superficie del nicho osteoblástico presenta bajos niveles de O₂, permitiendo que las HSC primitivas se mantengan en estado de reposo o quiescencia²⁷⁶. El 0.1% de O₂ evita que las células CD34⁺ entren en el ciclo celular²⁷⁷. Además, la hipoxia aumenta el potencial de formación de colonias de las HPC y su potencial para diferenciarse a megacariocitos, el 1% de O₂ promueve la proliferación de las células CD34⁺ y la adquisición de la expresión de CD41⁺ para la formación de megacariocitos inmaduros²⁷⁸. La etapa de maduración de los megacariocitos se desarrolla en el nicho vascular acompañada de un aumento de la tensión de O₂, en torno a un 6% en el espacio sinusoidal dónde se producen las pro-plaquetas y en torno a un 8% en el vaso sinusoidal dónde serán liberadas las plaquetas^{253, 276, 279} (Figura 26).

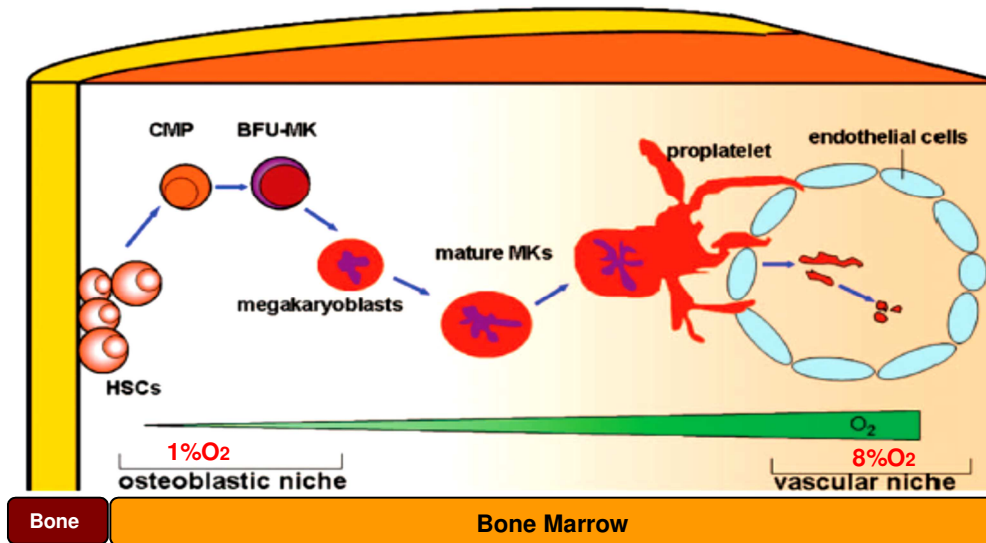


Figura 26. Formación del linaje megacariocítico en el nicho de la médula ósea. La formación de los megacariocitos por las HSC ocurre en el nicho osteoblástico a bajas condiciones de O_2 , mientras que la maduración de estos ocurre en el nicho vascular con un aumento de las tensiones de O_2 . Adaptada de Chen *et al.*²⁸⁰

3.3.1. Regulación de la hipoxia

El factor inducible por hipoxia (HIF, del inglés *Hypoxia-Inducible Factor*) es un regulador clave de la hipoxia durante el mantenimiento y diferenciación de las HSC en el nicho de la médula ósea. HIF1, es el principal regulador del metabolismo de las HSC en el nicho hipóxico de la médula ósea y forma un complejo heterodimérico α/β de unión al ADN²⁸¹. La subunidad β (HIF-1 β) no es sensible a la hipoxia, en cambio la subunidad α (HIF-1 α) sí se ve afectada. HIF-1 α es degradada por el proteosoma en condiciones de normoxia al ser hidroxilada²⁸². En cambio, en condiciones de hipoxia se incrementa su actividad, se inhibe su hidroxilación y se produce la dimerización con la subunidad β ^{281, 283}.

Además, existe otro regulador de la hipoxia en el nicho de la médula ósea, HIF-2 α ²⁸⁴. La actividad de HIF-1 α e HIF-2 α está regulada por Meis1 que induce la activación transcripcional de ambos en el ambiente hipóxico de la médula ósea, permitiendo así el mantenimiento y auto-renovación de las HSC y su supervivencia durante las bajas condiciones de O_2 ²⁸¹ (Figura 27). La regulación transcripcional de HIF-1 α por Meis1 sugiere que el metabolismo anaeróbico y el aumento de la expresión de HIF-1 α en las HSC es una característica intrínseca de las células madre. Un estudio demuestra que la delección condicionada de Meis1 provoca una baja regulación por parte de HIF-1 α y HIF-2 α y una pérdida de la quiescencia y la actividad de las HSC a causa de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*)²⁸⁶.

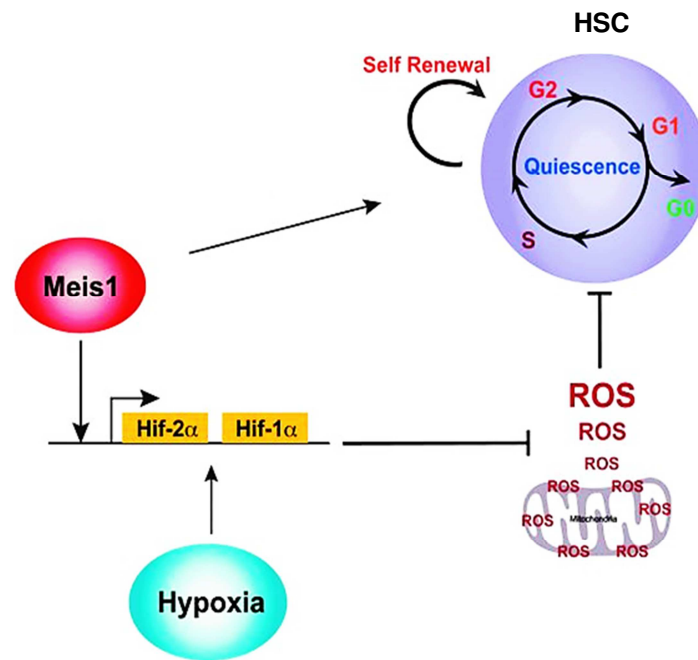


Figura 27. Regulación transcripcional de la hipoxia por HIF y Meis1. HIF-1 α y HIF-2 α activan su ruta de transcripción por Meis1 en condiciones de hipoxia, necesaria para el mantenimiento y diferenciación de las HSC en médula ósea. La activación de ROS en ausencia de Meis1 inhibe el mantenimiento de las HSC. Adaptada de Zhang and Sadek²⁸⁶.

3.4. Jerarquía de la megacariopoyesis

El modelo de jerarquía clásica del desarrollo megacariocítico implica la formación de los megacariocitos a partir de las HSC que originan los progenitores CLP y CMP. El CMP se diferencia al progenitor granulocito/monocito y al MEP, responsable de la generación de los megacariocitos y eritrocitos⁹¹. El proceso de diferenciación de las HSC hasta la generación de los megacariocitos ha sido caracterizado por la presencia de diversos marcadores celulares, algunos específicos de linaje. Las HSC (CD34⁺CD90⁺CD45RA⁻CD38⁻) originan los HPC identificados como CD34⁺CD38⁺ que formarán el MEP (CD34⁺CD38⁺CD235a⁺IL3R α ⁻CD45RA⁻) que dará lugar al desarrollo del linaje eritroide y megacariocítico. El linaje megacariocítico se caracteriza por el desarrollo de los progenitores megacariocíticos identificados como CD34⁺CD41⁺, el marcador CD34⁺ se pierde durante la generación de los megacariocitos. Los megacariocitos inmaduros adquieren el marcador CD61⁺ además de presentar CD41⁺ (CD34⁻CD41⁺CD61⁺CD42⁻) y una vez que maduran adquieren CD42⁺ (CD41⁺CD61⁺CD42⁺), hasta que finalmente originan y liberan las plaquetas identificadas con los marcadores de superficie celular CD41⁺CD42⁺²⁸⁷⁻²⁸⁸ (Figura 28).

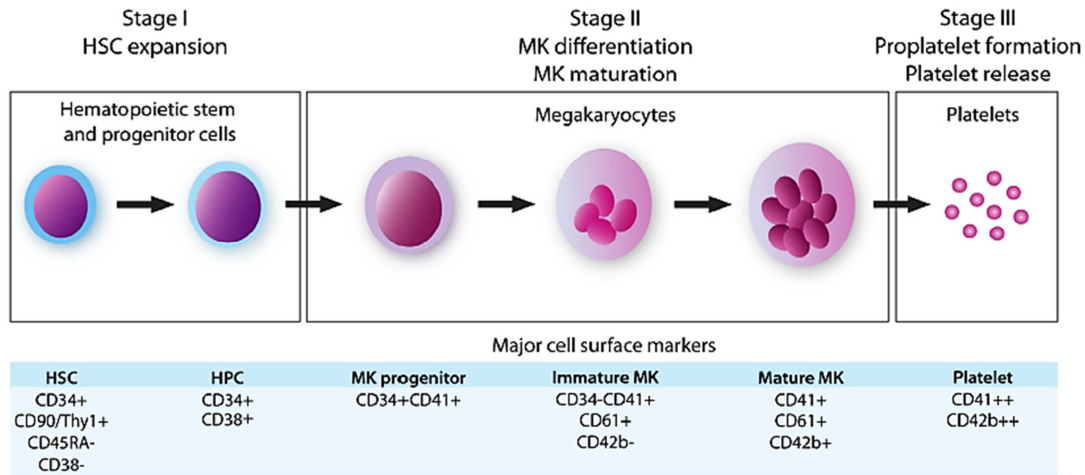


Figura 28. Marcadores celulares característicos del linaje megacariocítico desde la formación de las HSC. Las HSC originan los HPC CD34⁺CD38⁺ que generarán el linaje megacariocítico tras formar el MEP que originará megacariocitos y eritrocitos. El progenitor megacariocítico CD34⁺CD41⁺ dará lugar a los megacariocitos inmaduros CD41⁺CD61⁺ que tras madurar adquieren CD42⁺ y finalmente, formarán las pro-plaquetas y plaquetas CD41⁺CD42⁺ que serán liberadas al torrente sanguíneo. Adaptada de Lee *et al.*²⁸⁹

Recientemente, se ha propuesto un modelo redefinido del desarrollo megacariocítico humano, donde aparece un progenitor megacariocítico unipotente CD41⁺ que se origina a partir del CMP y desencadenará la formación de megacariocitos independientemente de los generados por el MEP (Figura 29)²⁹⁰.

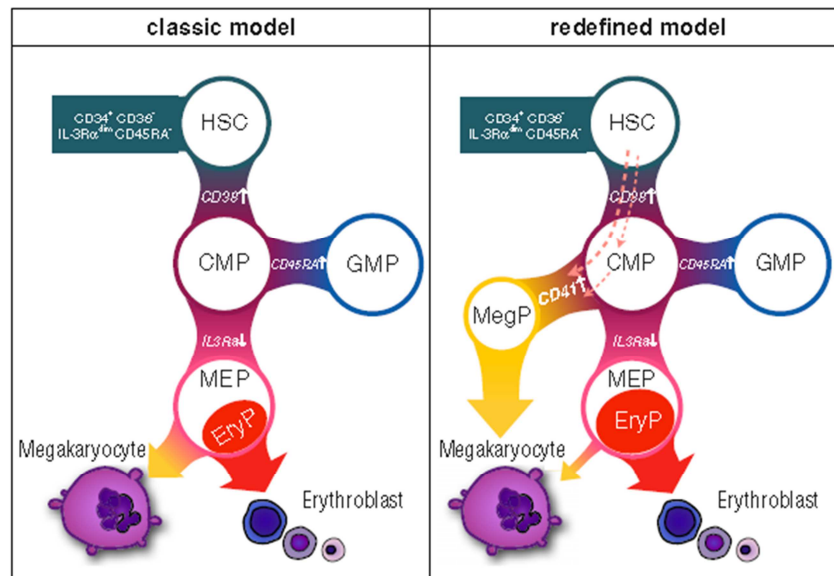


Figura 29. Jerarquía del desarrollo megacariocítico humano. El modelo clásico propone la generación de megacariocitos a partir del MEP originado por el CMP. El modelo redefinido propone la existencia un progenitor megacariocítico unipotente (MegP) CD41⁺ que se desarrolla a partir del CMP y dará lugar a los megacariocitos juntos con el MEP. Adaptada de Miyawaki *et al.*²⁹⁰

3.5. Regulación molecular de la megacariopoyesis y la trombopoyesis

El desarrollo megacariocítico está regulado a múltiples niveles por diversas citoquinas, factores de crecimiento y TF.

Un hito importante en la comprensión de los mecanismos moleculares de la trombopoyesis fue el descubrimiento de la trombopoyetina (TPO), el principal regulador de la trombopoyesis, en modelos de ratón en 1994²⁹¹. TPO, junto con su receptor c-Mpl (también conocido como proteína MPL o TPO-R) se expresan en las HSC y en los progenitores que posteriormente formarán los megacariocitos (CMP y MEP). Durante el desarrollo megacariocítico, TPO-MPL se encargan de regular la supervivencia, proliferación, diferenciación y maduración de los megacariocitos para la correcta formación de las plaquetas²⁹². TPO se produce constitutivamente en el hígado y circula por el torrente sanguíneo hasta que es secuestrada por las plaquetas circulantes de manera dependiente de MPL. Como resultado, la reducción en el recuento de plaquetas conduce a mayores niveles de TPO circulante, que estimula a las HSC de la médula ósea, aumentando así el número de megacariocitos, y por tanto de plaquetas²⁹³. La señalización de TPO comienza con la internalización del complejo TPO-MPL que inicia múltiples cascadas de señalización que regulan el desarrollo de los megacariocitos. TPO induce la fosforilación de JAK2 (del inglés, *Janus Kinase*) y de otras quinasas como MAPK/ERK y PI3K/AKT que activa los factores STAT3/STAT5 (del inglés, *Signal Transducer And Activator Of Transcription*) y estos activan otros TF específicos de la formación del megacariocito²⁹⁴.

Factores de crecimiento como SCF y varias interleuquinas como IL3, IL6 e IL11 ayudan a la señalización de la TPO para completar el desarrollo del megacariocito²⁹⁵. Estudios en ratones deficientes en *Tpo* y *c-Mpl* reportan una reducción del número de HSC y por tanto una disminución drástica de megacariocitos y plaquetas²⁹⁶⁻²⁹⁷.

En humanos, la pérdida de función completa de c-MPL causa un recuento plaquetario medio del $21 \times 10^9/L$ o incluso por debajo, siendo el normal en individuos sanos del $150-450 \times 10^9/L$. Estos datos sugieren que los pacientes sin una señalización funcional de TPO son capaces de generar plaquetas, pero a niveles reducidos²⁹⁸⁻²⁹⁹. Aunque TPO es un regulador crítico de la megacariopoyesis, no ejerce un papel esencial en las etapas finales de la formación y liberación de las pro-plaquetas.

La figura 30 muestra un esquema representativo del mecanismo de regulación de la trombopoyesis mediado por TPO y su receptor c-Mpl.

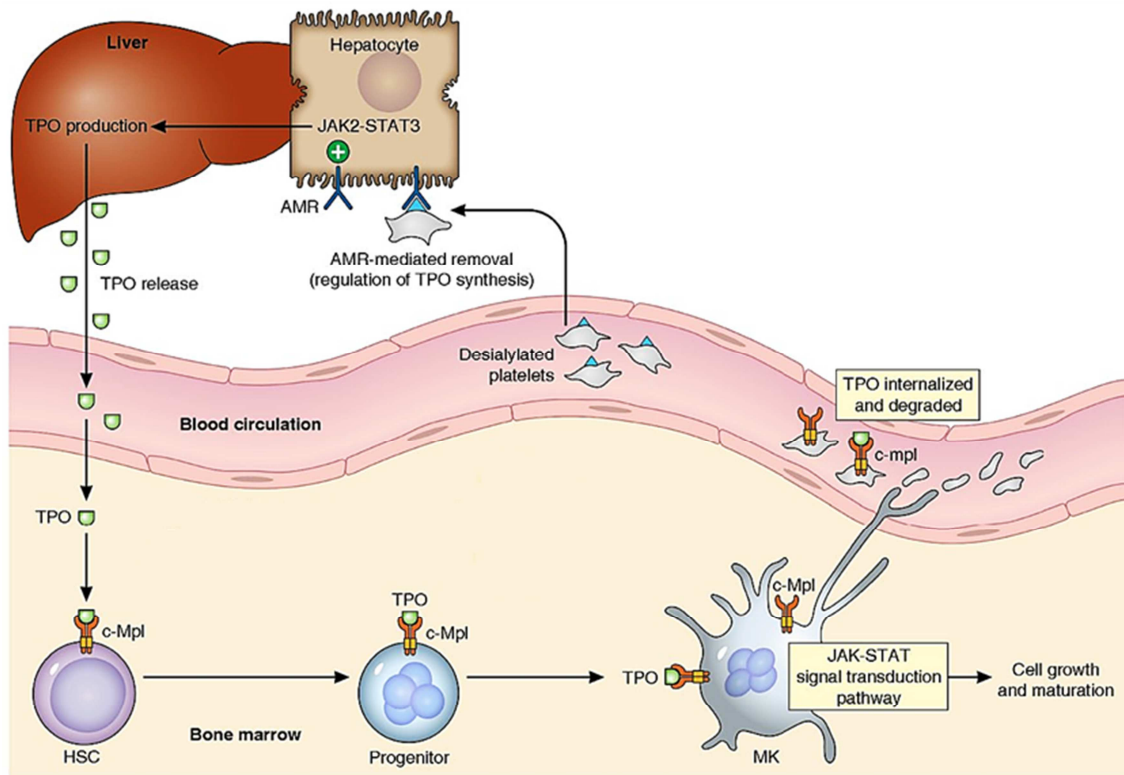


Figura 30. Regulación de la trombopoyesis por la vía de señalización de TPO. TPO, producida principalmente en el hígado es liberada a la circulación sanguínea. En médula ósea, se une a su receptor c-Mpl expresado en las HSC y sus progenitores derivados. El complejo TPO-c-Mpl activa las vías JAK/STAT y estimula el crecimiento y maduración de los megacariocitos. Las plaquetas en circulación, también expresan c-Mpl en la superficie celular que se une a la TPO y la internaliza para ser degradada. Las plaquetas senescentes que serán eliminadas en hígado promueven la síntesis de TPO en hígado mediante la activación de las vías JAK/STAT. Adaptada de Zhang and Zehnder³⁰⁰.

La especificación de las HSC y la diferenciación megacariocítica están coordinadas por la expresión temporal de varios TF. Estos TF están implicados tanto en el desarrollo hematopoyético embrionario como en el mantenimiento y auto-renovación de las HSC adultas y en la especificación del linaje megacariocítico.

Estudios en ratón han identificado la vía de Notch como mediadora de la megacariopoyesis. La señalización de Notch se requiere para la formación del linaje megacariocítico, a través de la señalización de AKT y la consiguiente supresión de FOXO se produce un incremento del número de CMP y MEP, y por tanto también de células CD41⁺³⁰¹⁻³⁰². Sin embargo, en humanos la activación de NOTCH inhibe la maduración de los megacariocitos terminales a partir de las células progenitoras CD34⁺³⁰³. Recientemente, se ha demostrado que la regulación negativa del receptor NOTCH4 por RUNX1 se requiere para el desarrollo normal de megacariocitos en células humanas. Específicamente, la delección del sitio de unión a RUNX1 provoca un aumento de la expresión del receptor NOTCH4 y por tanto la inhibición de la diferenciación a megacariocitos. Además, se ha visto que la inhibición de la señalización de NOTCH4 por edición génica en hiPSC mejora la megacariopoyesis humana *in vitro*³⁰⁴.

Dos TF esenciales para la determinación de las HSC durante el desarrollo embrionario, pero también para la diferenciación a megacariocitos son SCL y RUNX1³⁰⁵⁻³⁰⁶. Se ha visto que la regulación ejercida por Scl es crítica para el

desarrollo de la megacariopoyesis en ratón³⁰⁷. Además, en la diferenciación de hESC se ha reportado el papel crítico de SCL en la especificación a linaje megacariocítico²⁴⁶⁻²⁴⁷. La delección condicionada de *Runx1* en modelos de ratón muestra una maduración megacariocítica anormal, presentando megacariocitos de reducido tamaño y con una disminución significativa de la poliploidia³⁰⁶. El cultivo *in vitro* de megacariocitos procedentes de células madre derivadas de pacientes con mutaciones en *RUNX1* presenta una diferenciación a megacariocitos y poliploidización defectuosa³⁰⁸.

GATA2 se requiere tanto para el mantenimiento de las HSC como para el desarrollo de la megacariopoyesis temprana, pero no para la maduración terminal de los megacariocitos³⁰⁹. Otro TF que regula la viabilidad de las HSC y la diferenciación a megacariocitos es ETV6. En modelos de ratón se ha comprobado que la deficiencia de *Etv6* provoca defectos en la viabilidad de las HSC y un deterioro en la maduración de los megacariocitos³¹⁰.

Durante la diferenciación de las HSC a megacariocitos, diversos TF intervienen de forma temporal regulando las distintas etapas del desarrollo megacariocítico (Figura 31). El primer paso del compromiso mieloide comienza a partir del CMP que requiere del balance de expresión de dos TF antagónicos, GATA1 y PU.1. PU.1 dirige la diferenciación hacia el progenitor granulocítico-monocítico y GATA1 dirige la diferenciación hacia el MEP para inducir la formación del linaje eritroide. Experimentos en ratones, han reportado la activación recíproca de Gata1 y Pu.1 para la especificación del linaje hematopoyético hacia el CMP o hacia el MEP³¹¹. En humanos, se ha demostrado de igual manera el efecto antagónico entre GATA1 y PU.1³¹².

Durante el compromiso a linaje eritroide o megacariocítico a partir de la formación del MEP intervienen varios TF que se expresan de manera dependiente de tiempo y dosis. Entre ellos encontramos a NFE2, SCL, GFI1B, GATA1, GATA2, KLF1 y ETV6 que se expresan durante el desarrollo del MEP. Experimentos en células humanas demuestran la función antagónica de GATA2 y GATA1 junto con su co-factor FOG1 durante la etapa del MEP, GATA2 promueve la megacariopoyesis, mientras que GATA1 induce la eritropoyesis. Sin embargo, esta relación no es exclusiva, ya que GATA1 es ampliamente estudiado en el desarrollo del linaje eritroide, pero su expresión también es esencial durante la megacariopoyesis³¹³. Además, se ha reportado que la sobre-expresión de GATA2 en líneas celulares humanas inhibe la eritropoyesis y promueve la diferenciación a megacariocitos³¹⁴. Por otro lado, hay TF específicos de linaje eritroide y megacariocítico. EKLF (del inglés, *Erythroid Krüppel-Like Factor*) y c-MYB se expresan exclusivamente en el linaje eritroide³¹⁵, mientras que FLI1 y RUNX1 se expresan de forma exclusiva en el linaje a megacariocitos³¹⁶⁻³¹⁷.

En la diferenciación de células CD34⁺ humanas se ha reportado que RUNX1 reprime activamente a KLF1, específico de linaje eritroide, lo que permite un aumento de expresión de FLI1 que promueve la diferenciación a megacariocitos^{315, 317}. Además, en experimentos *in vitro* e *in vivo* a partir de células CD34⁺ humanas se ha demostrado que FLI1 (regulado negativamente por ETV6) juega un importante papel en la megacariopoyesis, regulando la expresión de los receptores GPIIb y GPIX de la membrana del megacariocito³¹⁸⁻³¹⁹.

Durante los estadios terminales de la megacariopoyesis, RUNX1 reprime y activa la expresión de las miosinas MYH10 y MYL9 necesarias para la poliploidización y maduración del megacariocito³²⁰⁻³²¹. MYH10 se expresa en megacariocitos inmaduros y se localiza específicamente en el anillo contráctil. Inhibe la poliploidización y evita la

transición de células 2N a 4N. Durante la diferenciación de células CD34⁺ humanas y de ratón hacia megacariocitos, se ha demostrado que se requiere del silenciamiento de esta miosina por Runx1 para inducir la maduración del megacariocito³²⁰. Por otra parte, la miosina MYL9 se expresa en megacariocitos maduros y plaquetas. En humanos, se ha comprobado que *MYL9* es un gen diana de RUNX1 para inducir la maduración terminal de los megacariocitos³²¹. Durante la especificación a linaje megacariocítico, NFE2 también es requerido en la fase final de maduración del megacariocito y la formación de pro-plaquetas³²²⁻³²³. Ratones deficientes en *Nfe2* presentan defectos en la biogénesis de las plaquetas³²². Estudios más recientes en ratón han demostrado que Nfe2 colabora con Fli1 y Runx1 para inducir la maduración terminal de los megacariocitos³²³. La expresión de GFIB es importante para el establecimiento del linaje terminal eritroide y megacariocítico. Ratones deficientes en *Gf1b* muestran una diferenciación eritroide defectuosa que les provoca anemia³²⁴. Otros estudios, han demostrado que la deficiencia en *Gf1b* causa un deterioro en la expansión y maduración de los megacariocitos y defectos en trombopoyesis³²⁵⁻³²⁶.

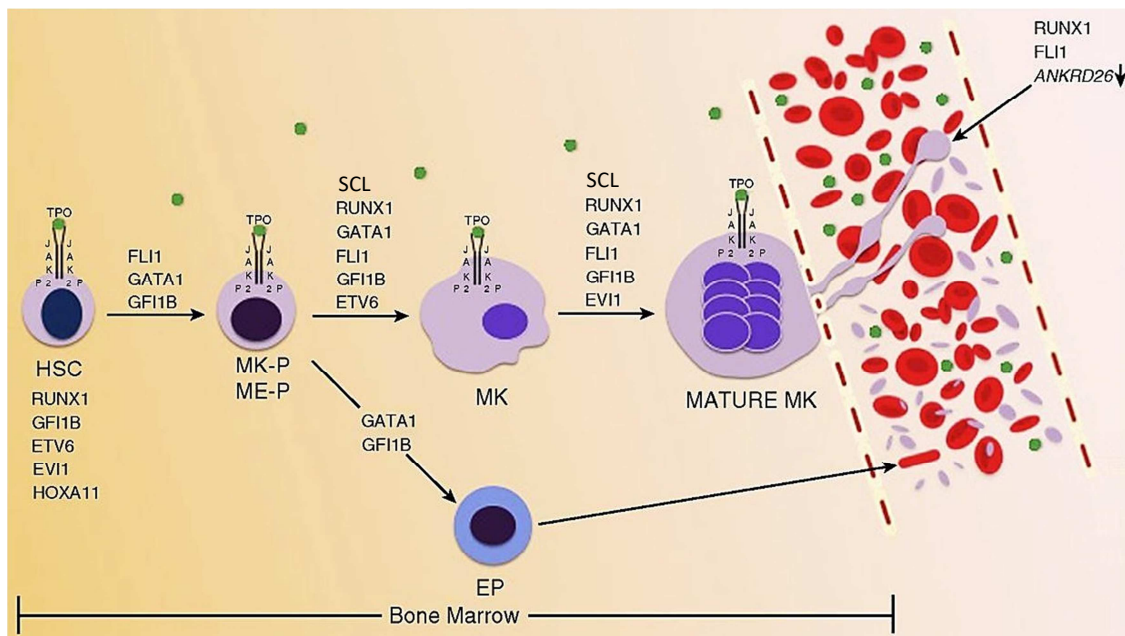


Figura 31. Representación esquemática de los TF implicados en la biogénesis de los megacariocitos y de las plaquetas. Diversos TF hematopoyéticos, en combinación con la estimulación de TPO, actúan promoviendo la diferenciación de las HSC hacia el linaje megacariocítico. Algunos de ellos se expresan exclusivamente en la etapa de maduración del megacariocito y en la formación de pro-plaquetas y la liberación de plaquetas al torrente sanguíneo. Adaptada de Songdej and Rao³²⁷.

3.6. TAL1/SCL en la hematopoyesis y megacariopoyesis

TAL1 (del inglés, *T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1*), también conocido como SCL (del inglés, *Stem Cell Leukemia*) es un TF esencial para el desarrollo de la hematopoyesis normal. Se requiere tanto para la especificación del sistema hematopoyético durante el desarrollo como para la supervivencia de las HSC adultas y la quiescencia, además de la maduración terminal de determinados linajes sanguíneos, como el linaje hacia megacariocitos.

3.6.1. Organización genómica de TAL1/SCL

En humanos, el *locus SCL* se localiza en el brazo pequeño del cromosoma 1 en la posición 33. En 1989, el gen *SCL* se clonó en virtud de su implicación en la translocación cromosómica t(1;14)(p33;q11) de una línea celular derivada de un paciente con T-ALL³²⁸. Desde entonces, estudios posteriores han revelado el papel crítico de *SCL* en la hemopoyesis normal y maligna, confirmando las hipótesis iniciales sobre funciones paralelas en el desarrollo de las HSC y la transformación leucémica³²⁹⁻³³¹.

En 1990, se concluyó que el gen *SCL* codifica una proteína que forma dos hélices separadas por un bucle (HLH del inglés, *Helix-Loop-Helix*) con homología a LYL1, que también está involucrada en el desarrollo maligno linfoide³³². Las proteínas HLH presentan un dominio de unión al ADN que se encuentra en una gran variedad de proteínas que controlan el crecimiento y la diferenciación celular³³³. En 1991, el grupo del Dr. Begley aisló el ADNc del gen *Scl* murino y descubrió que la secuencia nucleotídica de la región codificante presentaba un 88% de identidad con el gen *SCL* humano y además la proteína compartía una identidad del 94% de aminoácidos con el gen *SCL* humano. El motivo HLH y las regiones hidrofílicas localizadas por encima del gen están completamente conservados en las proteínas murinas y humanas³³⁴. Las proteínas HLH funcionan como factores reguladores capaces de unirse a otros dominios proteicos. Se ha reportado que el dominio HLH de *SCL* forma heterodímeros con otras proteínas como E47 o E12 tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos datos sugieren que los heterodímeros HLH que involucran a *SCL* pueden funcionar *in vivo* como factores reguladores de la transcripción que influyen en la determinación del tipo celular durante el desarrollo hematopoyético³³⁵.

3.6.2. Regulación del desarrollo hematopoyético embrionario

SCL es un gen complejo que se expresa a lo largo del desarrollo, activando o reprimiendo la transcripción de precursores hematopoyéticos, neurales y endoteliales.

En modelos murinos, se observaron las primeras evidencias de las funciones de *Scl* en el desarrollo hematopoyético embrionario. La delección de *Scl*, *in vivo*, demostró que este gen es imprescindible en las primeras etapas del desarrollo hematopoyético embrionario del ratón. Los embriones *Scl*^{-/-} murieron a día E9.5 debido a la ausencia de mielopoyesis y eritropoyesis primitiva en el saco vitelino³³⁶⁻³³⁷. Además, la deficiencia en *Scl* también ocasiona ausencia completa de la hematopoyesis definitiva producida durante la tercera oleada³³⁸. El bloqueo completo de la hematopoyesis sugiere que *Scl* es esencial no sólo durante las primeras fases de la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos sino también para la especificación de las células mesodérmicas hacia un determinado linaje sanguíneo. La diferenciación de mESC a células hematopoyéticas recapituló las oleadas 1 y 2 de la hematopoyesis del saco vitelino³³⁹, y además se estableció que *Scl* se requería tanto para la generación de células endoteliales como hematopoyéticas derivadas de las células mesodérmicas Flk1⁺³⁴⁰⁻³⁴¹.

Como se mencionó anteriormente, la expresión de *Scl* marca el compromiso del hemangioblasto hacia la formación del endotelio hemogénico¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. La delección condicionada de *Scl* a través de la escisión de la recombinasa Tie2-Cre confirmó estas observaciones. En este modelo, la especificación hematopoyética no se vio afectada, pero la maduración de los eritrocitos primitivos y definitivos, así como la maduración de los megacariocitos sí fue defectuosa, lo que condujo a la letalidad del embrión de ratón entre los días E13.5- 14.5³⁴². Además, *Scl* también es necesario para el desarrollo de la red vascular después de la formación del angioblasto. La pérdida de expresión de *Scl* en embriones de ratón interrumpe la remodelación angiogénica extraembrionaria³⁴³. Por lo tanto, SCL es uno de los TF hematopoyéticos que actúa en las etapas tempranas del desarrollo y está involucrado tanto en la formación de células hematopoyéticas como endoteliales a partir del endotelio hemogénico.

3.6.3. Regulación del linaje megacariocítico

Varios estudios de ganancia y pérdida de función en modelos murinos han resaltado el papel de *Scl* en la diferenciación de las células progenitoras a diferentes linajes hematopoyéticos como el linaje eritroide, megacariocítico y la formación de mastocitos y monocitos^{342, 344}. Experimentos en ratones adultos han demostrado que la delección de *Scl* perturba la megacariopoyesis y la eritropoyesis con la pérdida de células progenitoras tempranas en ambos linajes, en cambio los progenitores del linaje granulocítico-monocítico no se vieron afectados³⁴⁴. Por otra parte, se ha visto que *Scl* activa la progresión del ciclo celular en progenitores derivados de HSC adultas en modelos murinos. Mediante un estricto control de la expresión de *p21* y *p16/Ink4a*, *Scl* regula el inicio de la diferenciación hacia eritrocitos, la poliploidización y maduración terminal de los megacariocitos y la proliferación de los progenitores monocíticos³⁴⁵⁻³⁴⁷. Estudios de secuenciación en modelos murinos revelan que *Scl* presenta cambios en sus niveles de expresión génica durante la diferenciación de los progenitores hacia linaje megacariocítico o eritroide. Estos cambios dinámicos sugieren un papel central en el compromiso hacia linaje específico y la maduración terminal. Se piensa que estos cambios de expresión pueden deberse a la formación de complejos multiproteicos de *Scl* con otros TF o cofactores, esenciales durante el desarrollo hematopoyético³⁴⁸. Entre ellos, las proteínas GATA se han descrito como las mejores compañeras de SCL. GATA2 está implicada en la supervivencia y especificación de las HPC y en las primeras etapas de la diferenciación hacia linaje, y GATA1 es requerida para la maduración terminal³⁴⁹⁻³⁵⁰. En cultivos primarios de megacariocitos y eritrocitos derivados de progenitores hematopoyéticos de hígado fetal de ratón, se ha observado la acción combinada de *Scl* con diversos TF. *Scl* actúa junto con Gata2, Lyl1, Fli1, Erg, Runx1 y Lmo2 para llevar a cabo la especificación del linaje megacariocítico³⁵¹. Adicionalmente, experimentos basados en la diferenciación de hPSC a células hematopoyéticas mediante la expresión ectópica de SCL en combinación con GATA2, LMO2 y RUNX1 confirman que estos complejos multiproteicos están involucrados en la formación del MEP³⁵².

3.7. Generación de megacariocitos y plaquetas a partir de hPSC

Muchos pacientes sufren defectos congénitos que afectan a la estructura y funcionalidad de las plaquetas, como veremos en el siguiente apartado³⁵³⁻³⁵⁴. Pero además, existen pacientes con desordenes plaquetarios provocados por infecciones víricas, enfermedades autoinmunes, ciertos medicamentos, fallo hepático, leucemias, efectos secundarios derivados de la quimioterapia o radioterapia o incluso durante el embarazo³⁵⁵⁻³⁶¹.

Los tratamientos actuales para estos pacientes consisten en incrementar y estimular la producción plaquetaria mediante el uso de fármacos³⁶²⁻³⁶³. En casos severos, se precisa de transfusiones de sangre o de plaquetas, pero cuando éstas son reiterativas en el tiempo, los pacientes requieren de un gran número de donantes. Aunque, con el tiempo pueden sufrir rechazo, conocido como refractariedad plaquetaria, lo que supone un problema clínico bastante significativo³⁶⁴⁻³⁶⁵. Si estos tratamientos no funcionan, se recomienda una cirugía para extirpar el bazo³⁶⁶⁻³⁶⁷. Frente a estas desventajas, la producción de plaquetas *in vitro* supondría un gran avance en el tratamiento de estos pacientes, ya que la obtención de plaquetas de sangre periférica y las limitaciones que conlleva su preservación junto con la falta de donantes dificulta el uso de estas plaquetas para tratar a estos pacientes.

Actualmente, las plaquetas son colectadas del donante mediante extracción de sangre completa o aféresis, pero estos métodos presentan sus limitaciones. Independientemente del método de obtención, la temperatura de almacenaje es muy importante para mantener la viabilidad y la funcionalidad de esas plaquetas. Este es uno de los principales problemas a los que se enfrentan en clínica, ya que las plaquetas no toleran bien la refrigeración a diferencia de los eritrocitos o el plasma. Las temperaturas hipotérmicas (4 °C) causan modificaciones profundas en la forma y funcionalidad de las plaquetas. Por tanto se precisa de una temperatura mayor para su almacenaje. La alternativa más utilizada es almacenarlas a 22°C, en agitación continua con el fin de preservar su función, durante un máximo de 5 días debido al riesgo de contaminación bacteriana o vírica, además de alteraciones estructurales³⁶⁸⁻³⁶⁹. Uno de los tratamientos actuales, cuyo uso ha aumentado desde los últimos años, es la terapia mediante plasma rico en plaquetas (PRP), definido como el volumen de plasma autólogo con una concentración de plaquetas superior al nivel basal (150.000-350.000/μL) y rico en factores de crecimiento y quimioquinas. Dada su fácil disponibilidad, se usa fácilmente en entornos clínicos y quirúrgicos, no sólo para tratar a pacientes con trombocitopenias sino también con otras patologías o para el tratamiento de lesiones de deportistas de élite, pero su eficacia y la actuación de los factores de crecimiento, citoquinas y mediadores de la inflamación aún no ha sido dilucidada³⁷⁰⁻³⁷².

Lo ideal sería trasplantar las plaquetas procedentes de las HSC del propio paciente, pero el cultivo y la expansión *in vitro* de estas células es muy limitada³⁷³⁻³⁷⁴. En cambio, las hPSC gracias a su capacidad de crecimiento ilimitado *in vitro* y diferenciación a cualquier linaje celular, como se ha descrito anteriormente, serían una fuente constante de plaquetas para su uso en terapia celular y aplicación a clínica como un recurso independiente de donante para transfusiones^{10, 12}.

Hasta la fecha se han empleado varios protocolos de diferenciación para generar megacariocitos y plaquetas *in vitro* derivadas de hPSC, pero no han sido lo suficientemente eficientes. Estudios previos han empleado células OP9 en co-cultivo con hESC para generar megacariocitos y plaquetas *in vitro*, ya que las células OP9 poseen factores que ayudan a la megacariopoyesis y trombopoyesis³⁷⁵⁻³⁷⁷. Otros protocolos han combinado la formación de EBs y el co-cultivo con células OP9 para diferenciar hESC a megacariocitos, además de expresar SCL de forma ectópica, esencial en la formación de los megacariocitos²⁴⁶⁻²⁴⁷. En los últimos años, se han desarrollado nuevos protocolos libres de suero y componentes animales con medios definidos para derivar hPSC a megacariocitos y plaquetas, mediante la formación de spin-EBs^{230, 378}. Otro grupo ha reportado la generación de progenitores megacariocíticos y plaquetas mediante un protocolo libre de suero y células estromales por cultivo secuencial con diferentes medios de crecimiento y combinando condiciones de normoxia e hipoxia²²⁶. Otra opción, es la sobre-expresión de TF implicados en el desarrollo del linaje megacariocítico para incrementar la producción de progenitores megacariocíticos y así su expansión *in vitro* a partir de hiPSC³⁷⁹. Muy recientemente, se ha llevado a cabo la generación a gran escala de megacariocitos *in vitro* mediante un protocolo definido basado en la expresión ectópica de GATA1, SCL y FLI1 por transducción lentiviral^{227,380}.

3.8. Trastornos plaquetarios hereditarios

La función hemostática de las plaquetas puede verse comprometida por defectos adquiridos o congénitos que afectan tanto a la producción como a la destrucción de estas células, además de verse afectada la expresión o funcionalidad de cualquiera de los elementos involucrados en la fisiología plaquetaria, lo que conduce a una diátesis hemorrágica³⁸¹.

Los trastornos de plaquetas hereditarios se agrupan en:

1. Trombocitopenias hereditarias. Son desórdenes plaquetarios que afectan al tamaño y número de las plaquetas, causando una disminución del número de plaquetas circulantes en sangre, inferiores a $150 \times 10^9/L$. Suelen ser ocasionadas por una producción insuficiente o anómala de plaquetas en médula ósea, por una acumulación excesiva de plaquetas en el bazo o en el hígado, o por un descenso de la supervivencia de las plaquetas por mecanismos inmunitarios³⁸¹.
2. Trastornos de la función plaquetaria. Desórdenes que dan lugar a plaquetas disfuncionales y posiblemente también se vea afectado el número de plaquetas. Pueden estar ocasionados por defectos en los componentes de la superficie de las plaquetas o en los componentes intracelulares³⁸¹.

Los trastornos que afectan a la funcionalidad de las plaquetas, causados por defectos en los componentes y receptores de la superficie de las plaquetas se clasifican en:

1. Defectos de adhesión plaquetaria

Se producen defectos de adhesión plaquetaria cuando se afecta el complejo glicoproteico GPIb-IX-V. Este receptor es exclusivo de megacariocitos y plaquetas y está formado por las proteínas GPIbA, GPIbB, GPIX y GPV. Además, también actúa como receptor de la trombina e interactúa con el citoesqueleto contribuyendo al mantenimiento de la estructura plaquetaria^{260, 382}. Encontramos dos trastornos plaquetarios asociados a la formación anormal o defectuosa del complejo GPIb-IX-V:

- Síndrome de Bernard-Soulier. BSS (del inglés, *Bernard-Soulier Syndrome*) es un desorden plaquetario raro caracterizado por presentar una macrotrombocitopenia de moderada a severa, con una pérdida de adhesión a colágeno dependiente del vWF. Esta causado por mutaciones en los genes *GP1BA*, *GP1BB* o *GP9*³⁸³. Este síndrome será tratado con mayor profundidad en el siguiente apartado.
- Enfermedad von Willebrand de tipo plaquetario. PvWD (del inglés, *Platelet-type von Willebrand Disease*) es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por presentar hemorragias de leves a moderadas y trombocitopenia con plaquetas de gran tamaño caracterizadas por la unión espontánea de GPIb al vWF, debido a mutaciones en el gen *GP1BA*. Resulta en una interacción excesiva e innecesaria de las plaquetas al vWF con la posterior eliminación del vWF de alto peso molecular, así como de las plaquetas en circulación, lo que conduce a una trombocitopenia y una diátesis hemorrágica³⁸⁴. La enfermedad von Willebrand tipo 2B modifica la producción plaquetaria, presenta un parámetro fenotípico y síntomas clínicos similares a la PvWD, en cambio su etiología y modalidad de tratamiento es diferente. Esta ocasionada por mutaciones en el gen *VWF*³⁸⁵.

Otros defectos de adhesión plaquetaria implican defectos en el receptor de colágeno. La interacción plaquetas-colágeno en el flujo sanguíneo es un proceso de varios pasos que involucra tanto a la integrina $\alpha 2\beta 1$ como a GPVI, es un proceso regulado negativamente por PECAM1, una molécula de adhesión endotelial-plaquetaria. Los haplotipos específicos en *GP6* e *ITGA2* proporcionan amplias variaciones en la densidad de ambos receptores y se ha estimado una variabilidad del 40% en la respuesta de señalización de GPVI cuando las plaquetas se unen al colágeno³⁸⁶.

2. Defectos en receptores y proteínas implicadas en las vías de señalización

Los defectos en las rutas de señalización que controlan la secreción y agregación plaquetaria son la causa más común de sangrado en los trastornos plaquetarios.

Se clasifican en:

- Patología de los receptores de ADP y tromboxano A₂ (TXA₂). Las plaquetas poseen 2 clases de receptores purinérgicos para ADP: P2Y₁ que media la movilización del Ca²⁺, el cambio de la morfología de las plaquetas y el inicio de la respuesta de agregación plaquetaria, mientras que P2Y₁₂ es un regulador importante de la coagulación de las plaquetas. Alrededor del 20-30% de los sitios de unión de plaquetas a ADP están asociados con P2Y₁, mientras que el 70% restante está asociado con P2Y₁₂. Los pacientes presentan un sangrado leve caracterizado por una agregación plaquetaria reducida, pero rápidamente reversible a altas dosis de ADP³⁸⁷⁻³⁸⁸. Se debe a mutaciones en los *loci* de los receptores purinérgicos o a un déficit de los mismos³⁸⁸⁻³⁸⁹.
Por otro lado, mutaciones en la subunidad α del receptor de TXA₂ causan sangrados leves en los pacientes³⁹⁰. Se han reportado otras mutaciones en TBXA₂R que interrumpen tanto la función de TP α como el reciclaje de los receptores. Estas mutaciones son especialmente importantes ya que fisiológicamente imitan el efecto de la aspirina al bloquear el metabolismo del ácido araquidónico por la inhibición de la ciclooxigenasa³⁹¹⁻³⁹².
- Patología asociada al receptor de P2X₁. ATP, antagonista tanto de P2Y₁ como de P2Y₁₂, inhibe la activación de las plaquetas por ADP³⁹³, sin embargo, a través de su interacción con P2X₁ también puede activar a las plaquetas al inducir una entrada rápida de Ca²⁺ desde el medio extracelular, asociado con un cambio transitorio de la morfología plaquetaria³⁹⁴. Además, la activación plaquetaria por ATP amplifica las respuestas plaquetarias a otros agonistas, especialmente en condiciones de flujo sometidas a un alto estrés³⁹⁵⁻³⁹⁶.

3. Defectos en agregación plaquetaria

La integrina α IIb β 3 en plaquetas activadas permite la unión del fibrinógeno y de otras proteínas adhesivas solubles involucradas en la agregación plaquetaria³⁹⁷.

La trombastenia de Glanzmann está causada por mutaciones bialélicas en los genes *ITGA2B* o *ITGB3* que codifican α IIb (GPIIb) y β 3 (GPIIIa), respectivamente, ya que son únicas de cada familia. A pesar de presentar un recuento plaquetario y una morfología normal, los pacientes con trombastenia de Glanzmann sufren diátesis hemorrágica severa debido a defectos cualitativos o cuantitativos en α IIb β 3 que inhiben la unión de las plaquetas al fibrinógeno durante la activación plaquetaria. Las mutaciones ocurren en ambos genes, siendo *ITGA2B* el más afectado posiblemente porque es más pequeño que *ITGB3*. Estas mutaciones sin sentido deterioran la biosíntesis de las subunidades α IIb y β 3, inhibiendo la formación del complejo α IIb β 3, la maduración y la translocación a la membrana plasmática de los megacariocitos³⁹⁸⁻³⁹⁹. El grupo del Dr. Nurden ha examinado recientemente una gran cohorte de pacientes con trombastenia de Glanzmann y mediante análisis de secuenciación han identificado 55 mutaciones nuevas que afectan a los genes *ITGA2B* e *ITGB3*⁴⁰⁰.

4. Defectos en la actividad pro-coagulante de las plaquetas

La externalización de la fosfatidilserina a la membrana plasmática de las plaquetas es esencial para llevar a cabo la actividad pro-coagulante y la eliminación de micropartículas procedentes de células activadas, apoptóticas o necróticas, este proceso es dependiente de Ca^{2+} y está regulado por la actividad de TMEM16F. TMEM16F es un canal catiónico activado por Ca^{2+} que regula los niveles de Ca^{2+} , y por lo tanto afecta la codificación de la fosfatidilserina en las plaquetas durante la coagulación. Tanto deleciones homocigotas como heterocigotas del gen *TMEM16F* y mutaciones sin sentido han sido identificadas en pacientes con síndrome de Scott⁴⁰¹⁻⁴⁰². El síndrome de Scott es un trastorno hemorrágico extremadamente raro que se caracteriza por defectos en la externalización de la fosfatidilserina inducida por la activación de las plaquetas y el posterior deterioro de la generación de la trombina inducida por el factor tisular, además del desprendimiento de micropartículas pro-coagulantes por las plaquetas⁴⁰³. Modelos murinos deficientes en *Tmem16f* recapitulan los defectos plaquetarios asociados a *Tmem16f* y su papel crítico en la función de las plaquetas⁴⁰⁴.

La figura 32 recapitula los trastornos plaquetarios que afectan a los receptores y componentes de la superficie de las plaquetas.

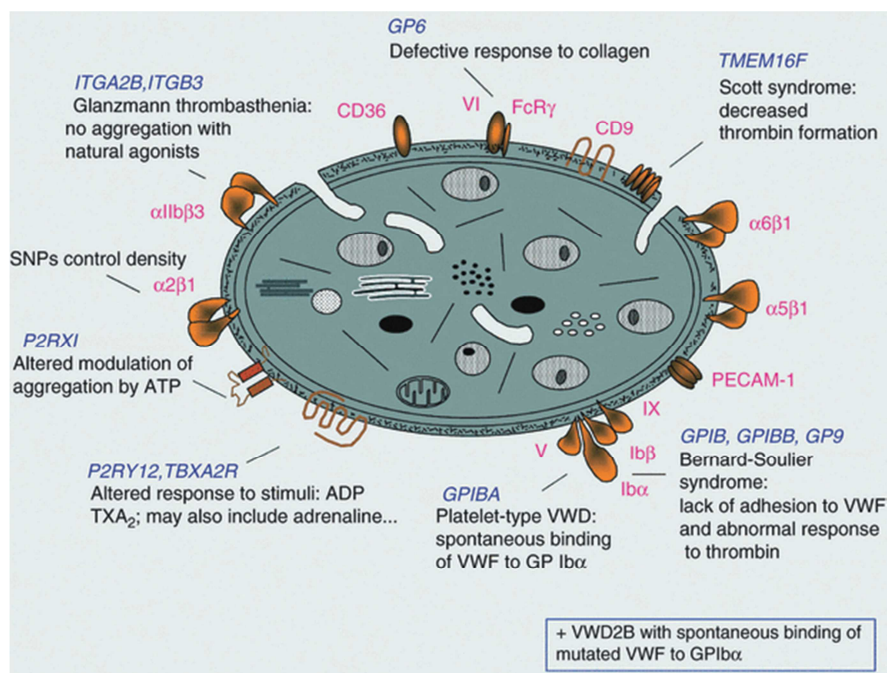


Figura 32. Esquema representativo de las alteraciones o mutaciones de los componentes de la superficie de las plaquetas que causan desordenes plaquetarios. Estos desordenes plaquetarios son ocasionados por defectos en la adhesión, en las vías de señalización, en la agregación y en la actividad pro-coagulante de las plaquetas⁴⁰⁵.

Diversos trastornos plaquetarios congénitos son causados por deficiencias cualitativas y cuantitativas que afectan a los gránulos intracelulares (α , δ , o raramente a ambos). Los pacientes con estas afecciones presentan diátesis hemorrágica moderada y anormalidades variables en las respuestas de agregación plaquetaria a bajas dosis de diferentes agonistas³⁸¹. Podemos clasificarlos en varios tipos según afecten a los gránulos α o δ :

1. Defectos asociados a los α -gránulos

Los gránulos α son los orgánulos plaquetarios más abundantes y la liberación proteica de estos desencadena la adhesión de las plaquetas, la hemostasia y la cicatrización de la herida. Entre los defectos plaquetarios que afectan a los gránulos α , los más estudiados son:

- Síndrome de plaquetas grises. Es un desorden congénito que provoca defectos en la función plaquetaria, debido a la biogénesis defectuosa de los α -gránulos, lo que ocasiona problemas de almacenaje y empaquetado proteico. Los pacientes presentan sangrados de leves a moderados, trombocitopenia con plaquetas grandes y pálidas, mielofibrosis y, en algunos casos, esplenomegalia. En 2011, estudios de secuenciación en tres grupos independientes condujeron a la identificación de mutaciones en el gen *NBEAL2* como las causantes del síndrome de plaquetas grises, autosómico recesivo⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Sin embargo, las mutaciones en *NBEAL2* no pueden explicar todos los casos de síndrome de plaquetas grises. El grupo del Dr. Monteferraio identificó años después una mutación sin sentido en el gen *GFI1B* como responsable de una forma autosómica dominante del síndrome de plaquetas grises junto con defectos en los glóbulos rojos⁴⁰⁹. Se ha reportado un caso de síndrome de plaquetas grises ligado al cromosoma X a causa de una mutación atípica en *GATA1*, tanto para esta mutación como para otras relacionadas con *GATA1* los pacientes también presentan anemia diseritropoyética, un hallazgo no característico de este síndrome que presenta esta familia además de la sintomatología propia de esta enfermedad⁴¹⁰.
- Síndrome de plaquetas Quebec. Es un trastorno hemorrágico, autosómico dominante con alta penetrancia y casi exclusivo de familias franco-canadienses. El hecho de que el sangrado responda a los inhibidores fibrinolíticos en lugar de a las transfusiones de plaquetas condujo al descubrimiento de que los gránulos α de los pacientes poseían grandes cantidades inusuales del activador plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), una proteína que se secreta tras la activación plaquetaria y conlleva a la generación excesiva de plasmina y la proteólisis anormal de otras proteínas, como vWF o P selectina, entre otras⁴¹¹⁻⁴¹². Los pacientes presentan deficiencias en la agregación plaquetaria, y a veces trombocitopenia. Este síndrome está causado por una mutación en el gen *PLAU* que codifica para uPA, cuyos niveles de ARNm se incrementan durante la diferenciación a megacariocitos⁴¹³.

2. Defectos asociados a los gránulos δ

Las enfermedades que afectan a la secreción de gránulos δ conducen a defectos de agregación plaquetaria y diátesis hemorrágicas. Cuando se asocian con defectos en otros orgánulos relacionados con el lisosoma, conllevan características fenotípicas claras. Se clasifican en tres tipos de trastornos plaquetarios, que además incluyen falta de pigmentación en piel y cabello³⁸¹.

- Síndrome de Hermansky-Pudlak. Es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por albinismo óculo-cutáneo y un desarrollo deteriorado de los orgánulos relacionados con el lisosoma, acompañado de trastornos intestinales³⁸¹. Es una enfermedad con una base molecular muy heterogénea, con la implicación de hasta nueve genes diferentes (*HPS1-HPS9*) que aparecen mutados en este síndrome y diferentes proteínas que interactúan entre sí formando complejos (*BLOC1-BLOC3*)⁴¹⁴⁻⁴¹⁶.
- Síndrome de Chediak-Higashi. Es un trastorno hemorrágico, autosómico recesivo caracterizado por la deficiencia de gránulos δ, la presencia de gránulos lisosomales gigantes, albinismo óculo-cutáneo y la inclusión de cuerpos en neutrófilos y otras células³⁸¹. Los niños presentan infecciones bastante graves, que pueden ocasionarles la muerte. En fase acelerada, suele aparecer linfohistiocitosis en el 85% de los pacientes, con una proliferación descontrolada de linfocitos y una disfunción neurológica progresiva en caso de que el paciente sobreviva hasta la edad adulta. Este síndrome se debe exclusivamente a mutaciones en el gen *LYST/CHS1*, que codifica la proteína *LYST*, un regulador de la biogénesis de los orgánulos y del tráfico lisosomal⁴¹⁷⁻⁴¹⁸.
- Síndrome de Griscelli. Es una enfermedad rara, también autosómica recesiva, cuyos pacientes pertenecen a varios subtipos presentando albinismo parcial y cabello plateado, defectos neurológicos y/o linfohistiocitosis. La principal dificultad clínica es que se trata de un síndrome hemofagocítico mortal, causado por la activación inapropiada de las células linfoides y la liberación de citosinas. Esta causada por mutaciones en los genes que codifican la miosina Va (tipo I), Rab27a (tipo II) y la melanofilina (tipo III). Solo las mutaciones en Rab27a están asociadas a inmunodeficiencias⁴¹⁹⁻⁴²⁰.

Además, encontramos defectos asociados al citoesqueleto de las plaquetas. Podemos clasificarlos en tres tipos según el constituyente celular que se vea afectado³⁸¹:

- Síndrome de Wiscott-Aldrich. Es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, combina trombocitopenia y plaquetas pequeñas con eccemas, infecciones recurrentes debido a una deficiencia inmunológica y un mayor riesgo de presentar otros trastornos autoinmunes. Se debe a defectos genéticos en *WAS* que resultan en la disminución de la expresión de su proteína WASP o a su ausencia. WASP es un regulador clave de la polimerización de actina en las células hematopoyéticas y está involucrado en la transducción de señales hematopoyéticas. La falta de WASP compromete

múltiples aspectos de la actividad celular normal, incluida la proliferación, la fagocitosis, la formación de sinapsis inmune, la adhesión y la migración dirigida⁴²¹⁻⁴²². También conduce a la formación prematura de pro-plaquetas en la médula ósea, donde la falta de podosomas ricos en actina ralentiza la migración de los megacariocitos al nicho vascular⁴²³.

- Desorden asociado a miosina 9 (MYH9). Es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones en la MYH9 y caracterizada por presentar macrotrombocitopenia asociada con múltiples variaciones fenotípicas que incluyen nefritis, hipoacusia neurosensorial y cataratas⁴²⁴. Las deficiencias en MYH9 ralentizan la migración de los megacariocitos hacia los sinusoides, así como la formación de pro-plaquetas⁴²⁵.
- Trastorno asociado a filamina A (FLNA). Es un desorden autosómico dominante ligado al cromosoma X, causado por mutaciones en el gen FLNA que codifica la proteína del citoesqueleto FLNA, se caracteriza por presentar heterotopía nodular periventricular⁴²⁶. Significativamente, FLNA tiene un sitio de unión a GPIIb α y ayuda a mantener la estabilidad del trombo en una lesión⁴²⁷. Modelos de ratón deficientes en *Flna* confirmaron una megacariocitopoyesis defectuosa con problemas de señalización y una reducida acumulación de plaquetas⁴²⁸.

También, podemos encontrar defectos que involucran a proteínas asociadas a la integrina, como es el caso del síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria III (LAD-III, del inglés *Leukocyte Adhesion Deficiency*) que se caracteriza por sangrados severos asociados a un incremento de infecciones y mala cicatrización. Las infecciones varían desde neumonía bacteriana y septicemia temprana hasta enfermedad fúngica. Las características clínicas son bastante complejas con disfunción de linfocitos, neutrófilos e integrinas plaquetarias debido a mutaciones en el gen *KINDLIN-3* que inhiben la activación de la integrina, aunque permiten su expresión⁴²⁹.

También, son de gran interés las proteínas que están implicadas en las principales vías de señalización de las plaquetas y que provocan patologías plaquetarias³⁸¹. Se han reportado defectos en las proteínas G. La mayoría de los estímulos externos dependen del receptor acoplado a la proteína G, que induce la activación y agregación plaquetaria. Los defectos asociados a las proteínas G causan sangrados severos por problemas en la expresión de *G α* y *G β* , ligandos del receptor de la proteína G⁴³⁰. Entre los defectos plaquetarios que involucran a las vías de señalización, encontramos mutaciones que afectan a determinados TF importantes para el desarrollo de las plaquetas, como RUNX1. Mutaciones en el gen *CBFA2* conducen a una reducida expresión proteica de RUNX1 y por tanto conlleva a alteraciones en el desarrollo de los megacariocitos⁴³¹. Cabe destacar que la haplodeficiencia de *CBFA2* causa FPDMM⁴³². Este desorden plaquetario será desarrollado en mayor profundidad en el siguiente apartado.

Además, podemos encontrar otros defectos plaquetarios que afectan al metabolismo de las plaquetas, provocando problemas de almacenaje de glucógeno o de producción de ATP o aquellos que afectan a determinadas enzimas plaquetarias³⁸¹.

La figura 33 muestra los principales trastornos que afectan a los orgánulos intracelulares y a las proteínas citosólicas de las plaquetas.

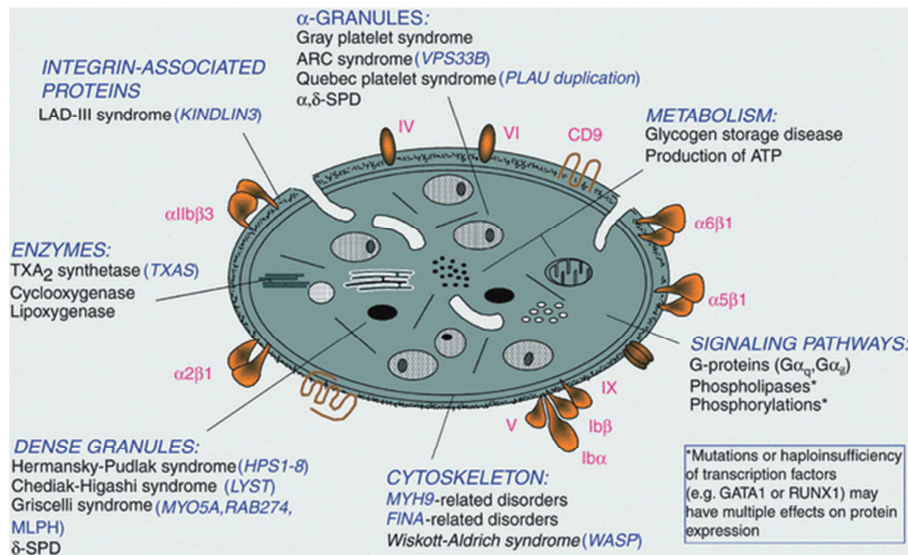


Figura 33. Esquema representativo los trastornos plaquetarios debidos a defectos en los orgánulos intracelulares y en las proteínas citosólicas de las plaquetas. Son causados por defectos en el metabolismo, en los gránulos α , δ , componentes del citoesqueleto, enzimas y proteínas implicadas en las vías de señalización y asociadas a las integrinas⁴⁰⁵.

3.8.1. Trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM)

El trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM) o también conocido como trastorno plaquetario familiar con predisposición a leucemia mieloide aguda (FDP/AML, del inglés *Familial Platelet Disorder with predisposition to Acute Myeloid Leukemia*) (OMIM #601399) es una enfermedad rara hereditaria, causada por mutaciones heterocigotas en el gen *RUNX1*^{381, 432}.

En 1969, se describieron por primera vez los síntomas asociados a FPDMM en varios miembros de una familia multigeneracional⁴³³. En 1985, el grupo del Dr. Dowton describió un gran pedigrí con un trastorno plaquetario familiar autosómico dominante asociado con el desarrollo de leucemia mieloide aguda⁴³⁴. Años más tarde, en 1996, se observó que el cromosoma 21 (21q22.1-22.2) estaba asociado a esta enfermedad⁴³⁵, hasta que en 1999 se identificó al gen *RUNX1* como el causante del FPDMM⁴³².

Esta enfermedad se caracteriza por presentar trombocitopenia con un recuento plaquetario de leve a moderado, función anormal plaquetaria y predisposición a desarrollar otros trastornos plaquetarios o neoplasias mieloides como MDS o AML, o leucemias linfoides como T-ALL. La severidad de los síntomas varía entre los

pacientes, pudiendo presentar hematomas, sangrados prolongados o excesivos después de algunos procedimientos o cirugía, sangrado menstrual abundante, sangrado de las encías y pequeñas manchas rojas en la piel (petequias). Todos los pacientes con FPDMM presentan un riesgo del 20-60% de desarrollar MDS y/o AML. Los síntomas de MDS o AML pueden incluir fatiga, debilidad, hematomas, sangrado, fiebre, dificultad para respirar o infecciones frecuentes⁴³⁶⁻⁴³⁷.

Hasta 2017, se habían identificado 40 mutaciones en *RUNX1* que ocasionan FPDMM (Tabla 3.8.1.1). Las mutaciones identificadas se localizan en el RHD, lo que conduce a la interrupción de la capacidad de unión al ADN. Aunque la incidencia es menos común, también se han reportado mutaciones en la región C-terminal⁴³⁸ y deleciones intragénicas en muy pocas familias como causantes de esta enfermedad⁴³⁹⁻⁴⁴⁰. La mayoría de las mutaciones de *RUNX1* causan haploinsuficiencia⁴³², mientras que otras mutaciones actúan de manera dominante negativa⁴⁴¹⁻⁴⁴². Se ha sugerido que las mutaciones con efectos dominantes negativos se asocian con una alta frecuencia de progresión de la leucemia en comparación con las mutaciones que ocasionan haploinsuficiencia⁴⁴¹.

Tabla 3.8.1.1. Variantes de *RUNX1* que causan FPDMM que han sido identificadas hasta el año 2017. Adaptada de Morgan and Daly⁴⁴³.

Genomic variation	Protein effect	Variation type
c.16 G>A	p.D6N	Missense
c.82dup888	p.A28GfsX83	Insertion
c.236 G>A	p.W79X	Nonsense
c.239 G>A	p.R80H	Missense
c.247 A>G	p.K83E	Missense
c.270+1G>T		Splicing
c.271-1G>T		Splicing
c.295 G>C	p.D99H	Missense
c.319 G>C	p.A107P	Missense
c.322 G>A	p.G108S	Missense
c.361_368delACCGCAGC	p.T121HfsX9	Deletion
c.386 C>A	p.A129E	Missense
c.415 C>T	p.R139X	Nonsense
c.416 G>A	p.R139Q	Missense
c.426delA	p.Ser145AfsX4	Deletion
c.427 G>A	p.G143R	Missense
c.427+1G>T		Splicing
c.428+3delA	p.R135fsX177	Splicing
c.505 A>G	p.T169A	Missense
c.506 C>G	p.T169R	Missense
c.511 G>T	p.D171Y	Missense
c.512 A>T	p.D171V	Missense
c.520 C>T	p.R174X	Nonsense
c.521 G>A	p.R174Q	Missense
c.529 C>T	p.R177X	Nonsense
c.530 G>A	p.R177Q	Missense
c.568 G>A	p.G190R	Missense
c.654delC	p.T219RfsX8	Deletion
c.703 C>T	p.Q235X	Nonsense
c.707delC	p.P236LfsX48	Deletion
c.780 C>A	p.Y260X	Nonsense
c.786delA	p.S263PfsX21	Deletion
c.877 C>T	p.R293X	Nonsense
c.906delG	p.F303SfsX264	Deletion
c.918_922dup	p.Q308RfsX261	Insertion
c.1007_1013delGCATCGG	p.G336AfsX229	Deletion
c.1011delC	p.I337MfsX230	Deletion
c.1082 C>A	p.S361X	Nonsense

Aproximadamente la mitad de los individuos con mutaciones en la línea germinal en las familias desarrollan neoplasias hematológicas a lo largo de su vida con una latencia prolongada. Esta evidencia clínica indica claramente que se requieren eventos genéticos adicionales para la transformación de la enfermedad. Se han identificado mutaciones somáticas en el gen *CDC25C* en más de la mitad de los pacientes de Japón con FPDMM. La mutación en *CDC25C* se considera un evento genético temprano que genera clones pre-leucémicos. Esto podría permitir la adquisición de eventos genéticos posteriores, lo que resulta en una progresión de la leucemia⁴⁴⁴. Se han identificado mutaciones en el gen *TET2* o un cromosoma 21 anormal que presenta una delección en el locus *RUNX1*, lo que resulta en la generación de clones pre-leucémicos. Estos pacientes, adquieren mutaciones adicionales que desencadenan en MDS^{440, 445-446}.

Por otra parte, se ha reportado una alta frecuencia de mutaciones bialélicas en *RUNX1* en pacientes con FPDMM^{213, 437, 447}. Además de estas mutaciones aparecen una gran variedad de mutaciones adicionales que desarrollan AML⁴⁴⁷.

La figura 34 muestra un esquema representativo de las mutaciones que ocasionan leucemias en pacientes con FPDMM.

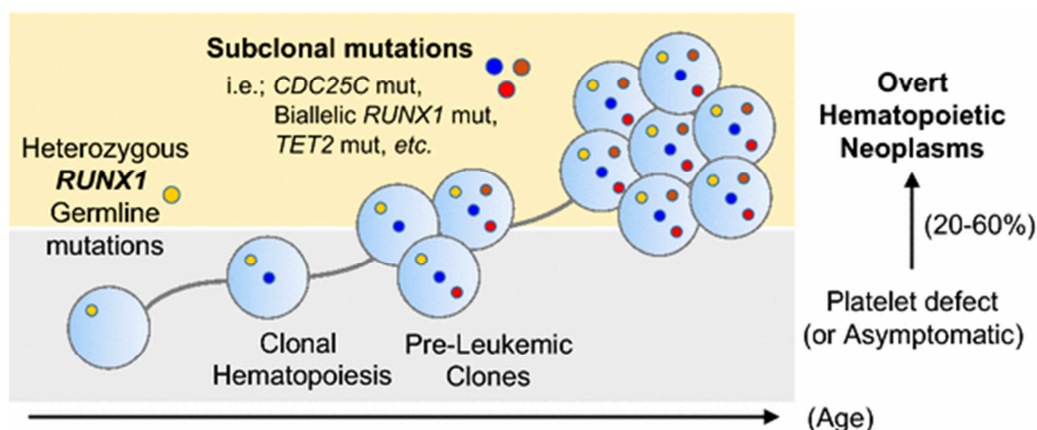


Figura 34. Mutaciones adicionales en pacientes con FPDMM que desarrollan leucemias. Se han identificado mutaciones en *CDC25C*, en *TET2*, haploinsuficiencias en *RUNX1* o mutaciones bialélicas en *RUNX1* que acompañadas de mutaciones adicionales desencadenan leucemias⁴⁴⁸.

Se han diseñado modelos animales de ratón o pez cebra de FPDMM, pero no logran recapitular todos los defectos que se dan en pacientes, ya que no presentan megacariopoyesis anormal ni desarrollan leucemias⁴⁴⁹⁻⁴⁵⁰. Debido a esta problemática surge la necesidad de generar modelos humanos de FPDMM que sean eficientes para poder estudiar la biología de esta enfermedad y conseguir una posible terapia para dichos pacientes. Recientemente, se han obtenido grandes avances en la investigación de esta enfermedad gracias al empleo de hiPSC derivadas de pacientes. En 2014, se establecieron las primeras hiPSC de pacientes con FPDMM, y además se lograron rescatar los defectos en la diferenciación megacariocítica *in vitro* que presentaban estas líneas celulares mediante la sobre-expresión del gen silvestre *RUNX1*⁴⁵¹.

Posteriormente, se establecieron otras líneas hiPSC de pacientes con FPDMM, que lograron recuperar una megacariopoyesis normal mediante la edición génica del gen *RUNX1* mutado⁴⁵²⁻⁴⁵³. Un último estudio sobre hiPSC de FPDMM corregidas por terapia génica identifica a *NOTCH4* como un gen diana de *RUNX1*. *RUNX1* regula negativamente a *NOTCH4*, por lo que demuestran que la inactivación de *NOTCH4* por CRISPR-Cas9 potencia la megacariopoyesis en FPDMM-iPSC⁴⁵⁴.

3.8.2. Síndrome de Bernard-Soulier (BSS)

BSS (OMIM # 231200), es un trastorno autosómico recesivo raro, caracterizado por presentar plaquetas de mayor tamaño, trombocitopenia severa y baja capacidad de adhesión a colágeno. Posee una prevalencia de menos de 1 paciente por cada millón de habitantes. Está causado por mutaciones en los genes *GP1BA*, *GP1BB* o *GP9* que codifican los componentes del complejo glicoproteico GPIb-IX-V localizado en la membrana plasmática de megacariocitos y plaquetas⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁶.

En 1948, el Dr. Bernard y el Dr. Soulier describieron un trastorno hemorrágico congénito en pacientes que presentaban plaquetas inusualmente grandes y un grado moderado de trombocitopenia con un prolongado tiempo de sangrado⁴⁵⁷. Más adelante, en 1963 y 1967 se reportaron casos con la misma trombopatía congénita⁴⁵⁸⁻⁴⁵⁹. En 1974, se observó que la falta de unión del vWF a las plaquetas podría estar implicada en el BSS al reducirse la adhesión plaquetaria a la zona de la lesión vascular en estos pacientes⁴⁶⁰. En 1975, el Dr. Nurden y el Dr. Caen demostraron que las plaquetas de los pacientes con BSS carecían de un complejo glicoproteico presente en su membrana⁴⁶¹. Posteriormente, se identificaron las subunidades de este complejo (GPIb-IX-V) como las responsables de la enfermedad⁴⁶²⁻⁴⁶³.

3.8.2.1. Estructura y función del complejo glicoproteico GPIb-IX-V

El complejo proteico GPIb-IX-V es esencial en las funciones de hemostasis y trombosis, permitiendo la unión del vWF que media la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular cuando ocurre una lesión. Además, desempeña un papel muy importante en el mantenimiento de la forma plaquetaria⁴⁶⁴. Está compuesto por cuatro subunidades proteicas, GPIb α , GPIb β , GPIX y GPV distribuidas en una relación 2:4:2:1, respectivamente⁴⁶⁵. Todas las subunidades presentan regiones ricas en leucina en el dominio extra-celular N-terminal, una región transmembrana y un dominio citoplasmático C-terminal. El dominio N-terminal de la subunidad GPIb α , además de su papel principal en la unión al vWF, presenta una región de unión a múltiples ligandos que regulan la interacción de las plaquetas con la matriz extracelular y otros tipos celulares en trombosis o inflamación del tejido⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁷. Otros ligandos que se unen a este dominio son la P-selectina que se expresa en las plaquetas y células endoteliales activadas⁴⁶⁸ y la integrina α _M β ₂ (también conocida como Mac-1 o CD11b/CD18)⁴⁶⁹. Estas dos interacciones son fundamentales para la comunicación cruzada entre las plaquetas y los leucocitos, tanto en la trombosis como en la respuesta inflamatoria⁴⁷⁰.

El complejo GPIb-IX-V también es un receptor clave en la mediación de la coagulación dependiente de plaquetas, particularmente con respecto a la vía intrínseca de la coagulación, por lo que presenta sitios de unión en el dominio N-terminal de GPIb α para el quinínogeno de alto peso molecular, los factores XI, XII y la α -trombina⁴⁶⁴ (Figura 35).

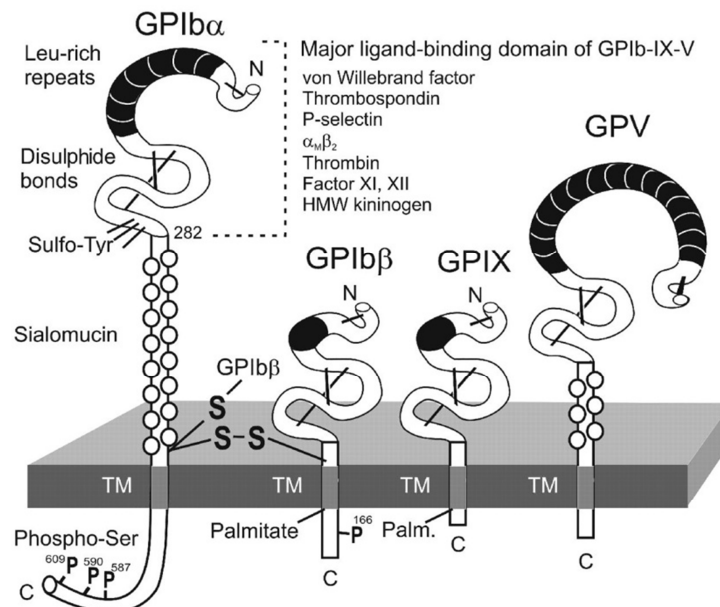


Figura 35. Estructura del complejo proteico GPIb-IX-V localizado en la membrana plasmática de megacariocitos y plaquetas. Está compuesto por la subunidad GPIb α unida por enlaces disulfuro a las subunidades GPIb β y de forma no covalente a las subunidades GPIX y GPV⁴⁵⁵.

El complejo GPIb-IX-V también desempeña un papel en el mantenimiento de la forma de las plaquetas al unir la superficie plaquetaria a una red sub-membranosa de filamentos de actina. Esto implica la porción central de la cola citoplasmática de GPIb α , particularmente Phe568 y Trp570, que proporciona un sitio de unión para la proteína asociada a la actina, la FLNA⁴⁶⁴. Otras proteínas se unen a la cara citoplasmática de GPIb-IX-V, ya sea directa o indirectamente, como la calmodulina o la proteína de ensamblaje, así como otras proteínas potencialmente involucradas en la propagación de señales tras la unión del complejo GPIb-IX-V al vWF^{464, 471}. Cuando el vWF se une al complejo se inicia la cascada de señalización que activa a la integrina α IIb β 3/GPIIb-IIIa y la agregación plaquetaria. Se ha identificado a la proteína de señalización más próxima al receptor, Lyn, perteneciente a la familia de quinasas Src⁴⁷²⁻⁴⁷³.

3.8.2.2. Fenotipo de BSS

BSS es caracterizado clínicamente por antecedentes de epistaxis (hemorragias nasales), sangrado gingival y cutáneo, y hemorragia post-trauma. En las mujeres también se puede asociar con menorragia severa (flujo menstrual abundante). La presentación clínica incluye un tiempo de sangrado prolongado en piel, trombocitopenia y plaquetas grandes. Con frecuencia, los casos de BSS se diagnostican erróneamente como púrpura trombocitopénica idiopática, en ausencia de investigación clínica adicional. Las plaquetas de pacientes con BSS se caracterizan por una deficiente aglutinación plaquetaria⁴⁷⁴. Una excepción interesante es la variante Bolzano, que involucra una mutación en la cual las plaquetas expresan niveles esencialmente normales del complejo GPIb-IX-V, sin embargo, el complejo es disfuncional y no puede unirse al vWF⁴⁷⁵.

Además, las plaquetas de estos pacientes muestran defectos funcionales adicionales que incluyen una mayor deformación de la membrana, una respuesta de agregación plaquetaria deficiente y baja capacidad para generar trombina durante la coagulación. Las plaquetas de gran tamaño y el bajo recuento plaquetario se deben presuntamente a la ausencia de GPIb α y el sitio de unión de la FLNA, que une el complejo GPIb-IX-V con el esqueleto de la membrana plaquetaria. En ratones también se han detectado estos síntomas en ausencia de GPIb α ⁴⁷⁶. La ausencia de la interacción normal de GPIb α con la FLNA también parece ser la causa del aumento de la deformación de la membrana de las plaquetas de pacientes con BSS⁴⁷⁷.

El recuento plaquetario suele variar entre $20-140 \times 10^9/L$ en pacientes con BSS debido a la presencia de plaquetas de gran tamaño. Los análisis de plaquetas por citometría de flujo son característicos de estos pacientes, muestran una unión normal a los anticuerpos CD41 (GPIIb) y CD61 (GPIIIa), en cambio la unión a los anticuerpos CD42a (GPIX), CD42b (GPIb α), CD42c (GPIb β) y CD42d (GPV) es defectuosa⁴⁷⁸.

3.8.2.3. Genotipo de BSS

Se ha descrito una gran cantidad de mutaciones en *GP1BA*, *GP1BB* y *GP9* que son causantes del BSS. En cambio, no se han reportado mutaciones en *GP5* causantes de BSS. Además, la presencia de GPV no se requiere para la expresión de las otras subunidades del complejo GPIb-IX-V^{464, 479}.

En 1990, se descubrió la primera mutación responsable de uno de los casos de BSS, una mutación homocigota asociada al gen *GP1BA*⁴⁸⁰. En 1993, se identificaron mutaciones heterocigotas en el gen *GP9* en una familia con BSS⁴⁸¹. En 1996, se reportó una mutación en el promotor de *GP1BB* de un paciente con BSS⁴⁸². Desde entonces, se han identificado una gran variedad de mutaciones que afectan a los genes *GP1BA*, *GP1BB* y *GP9*. Hasta el año 2017, tenemos constancia de 45 variantes bialélicas que afectan al gen *GP1BA*, 39 que afectan al gen *GP1BB* y 28 que afectan al gen *GP9*. La variante monoalélica más frecuente del gen *GP1BA* es la variante Bolzano, mencionada anteriormente, caracterizada por presentar una trombocitopenia

moderada y un incremento del volumen plaquetario, con o sin síntomas de sangrado^{475, 483}.

La mayoría de los pacientes con BSS exhiben una herencia autosómica recesiva, pero en algunos casos el BSS puede ser autosómico dominante. Se han identificado variantes monoalélicas del BSS que afectan a *GP1BB* y se asocian con una macrotombocitopenia autosómica dominante⁴⁸⁴. Más recientemente, se han identificado dos mutaciones que afectan al gen *GP9*, aunque de momento no se conocen bien sus efectos, sí se sabe que presentan una expresión reducida del complejo GPIb-IX-V y plaquetas de gran tamaño⁴⁸⁵.

Entre las distintas variantes, las más frecuentes son las mutaciones sin sentido, con cambio de sentido o cambio en la pauta de lectura. Las mutaciones sin sentido (*nonsense mutation*) o las que provocan cambios en el marco de lectura (*frameshift mutation*) provocan un acortamiento o una alteración significativa de la subunidad GPIb-IX con respecto a la secuencia nativa, ello conlleva una pérdida de la integridad estructural del complejo. Dado que el dominio extracelular y transmembrana participan en el ensamblaje de las subunidades GPIb-IX, todas las mutaciones sin sentido o de cambios en el marco de lectura se restringen a estos dominios⁴⁸⁶⁻⁴⁸⁷. En cambio, las mutaciones con cambio de sentido (*missense mutation*) impiden el ensamblaje de las subunidades GPIb-IX a través de dos mecanismos distintos, pero relacionados. Primero, la mutación puede desestabilizar el dominio LRR, que posee zonas críticas para la integridad estructural del complejo. Por tanto, se alteran los residuos Cys que forman parte de los enlaces disulfuro o se agregan residuos Cys adicionales a las regiones N-terminal y C-terminal, interfiriendo en los enlaces disulfuro⁴⁸⁸⁻⁴⁸⁹.

Además, se han encontrado mutaciones que eliminan cadenas hidrofóbicas grandes o agregan cadenas polares al interior del dominio LRR con un resultado disruptivo del complejo. Para determinar experimentalmente el efecto de una mutación en el plegamiento del dominio LRR, es necesario expresar este dominio mutante en células transfectadas y analizar su expresión, secreción y formación de enlaces disulfuro intramoleculares⁴⁹⁰⁻⁴⁹¹. Esto solo es aplicable para mutaciones en los dominios LRR de GPIb α y GPIb β , ya que el dominio extracelular GPIX no se puede expresar de forma aislada⁴⁹¹.

La figura 36 muestra un esquema representativo de las variantes del BSS asociadas a las subunidades GPIb α , GPIb β y GPIX del complejo glicoproteico GPIb-IX-V.

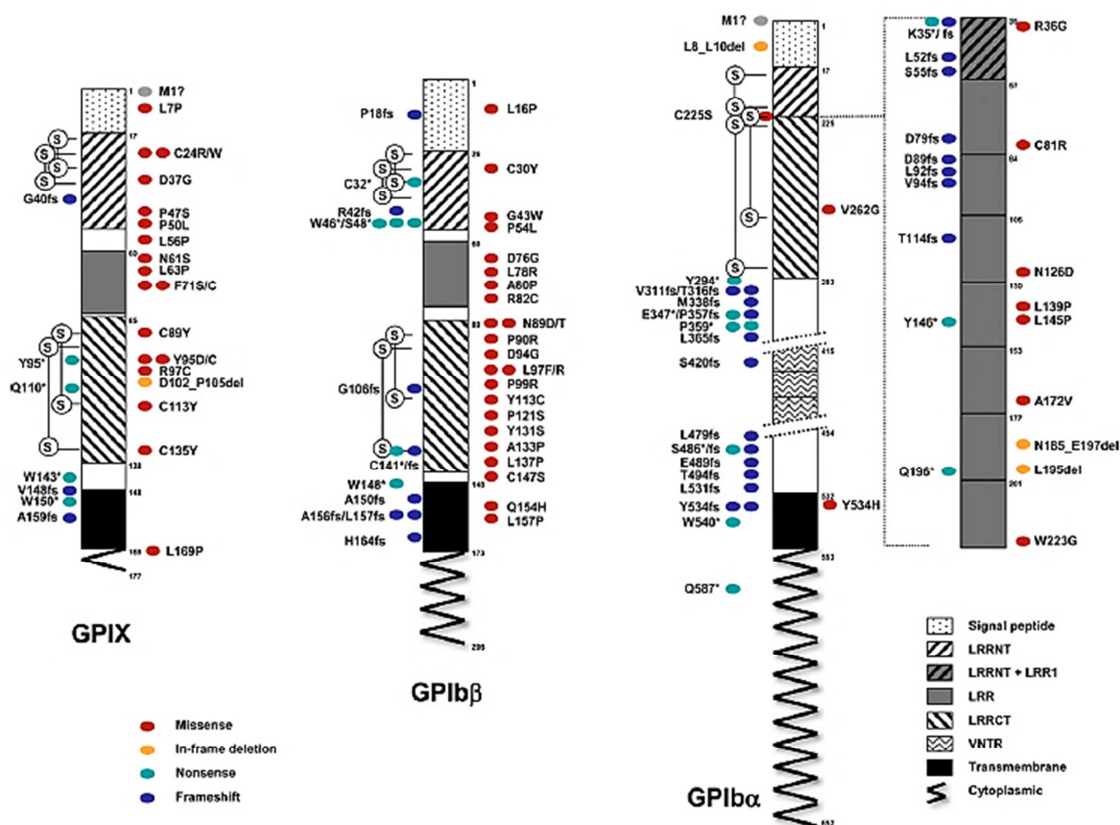


Figura 36. Mutaciones identificadas en los genes *GP1BA*, *GP1BB* y *GP9* responsables del BSS⁴⁹².

Hasta la fecha, se han generado varios modelos de ratón de BSS para intentar recapitular los defectos ocasionados en los pacientes con BSS. El primer modelo murino de BSS se estableció en el 2000 y se consiguió el rescate fenotípico mediante la sustitución del gen mutado *Gp1ba* murino por el gen silvestre humano utilizando terapia génica⁴⁹³. Posteriormente, en 2004 se generó otro modelo murino de BSS por la delección de *Gp1bb* para comprobar la correlación con las mutaciones en GPIIbβ en humanos⁴⁹⁴. Más recientemente, se han generado modelos murinos de BSS que han sido rescatados fenotípicamente por terapia génica, mediante lentivirus que expresan GPIIbα humano (hGPIIbα)⁴⁹⁵, usando radiación letal condicionada y seguida de una transferencia génica por lentivirus que expresan hGPIIbα⁴⁹⁶ y por transferencia lentiviral expresando hGPIIbβ⁴⁹⁷. Sin embargo, aunque los modelos murinos aporten datos relevantes en el estudio de esta enfermedad genética, es necesario generar modelos humanos ya que la genética humana es mucho más compleja que la del ratón y además, los modelos humanos pueden ser usados para probar fármacos diseñados específicamente para tratar a pacientes con BSS. Recientemente, se han generado hiPSC de pacientes de BSS con deficiencias en los genes *GP1BA* y *GP1BB* y además, se han rescatado fenotípicamente por lentivirus que expresan los genes silvestres⁴⁹⁸. En nuestro laboratorio, hemos generado varios modelos humanos de hiPSC de pacientes del BSS con diferentes mutaciones en el gen *GP9*⁶⁶⁻⁶⁸.

HIPOTESIS

La obtención de hPSC a partir de embriones humanos o de células adultas reprogramadas ha hecho posible el estudio del desarrollo embrionario humano y el conocimiento de la evolución de diversas enfermedades gracias a sus características de auto-renovación, crecimiento ilimitado *in vitro* y diferenciación a cualquier linaje celular. Por tanto, suponen un modelo ideal para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a procesos de especificación embrionaria, con grandes implicaciones en biología del desarrollo, modelos de enfermedad y medicina regenerativa.

Los mecanismos moleculares que orquestan la regulación del sistema hematopoyético han sido muy estudiados en modelos animales. Existen numerosas rutas de señalización y factores de transcripción que juegan distintos papeles en el desarrollo hematopoyético, pero en humanos aún existe un gran desconocimiento sobre la función de estos factores. Además, la comprensión de la regulación del nicho de la médula ósea que alberga a las células madre hematopoyéticas es de gran importancia para conocer la biología y el desarrollo de las células hematopoyéticas, en especial la formación de megacariocitos y plaquetas.

Por todo lo anterior, la hipótesis de nuestro estudio se basa en el empleo de hPSC como una herramienta ideal para el estudio del desarrollo de la hematopoyesis y la generación de células hematopoyéticas humanas de manera ilimitada para su uso en clínica, en especial células de linaje megacariocítico como terapia celular sustitutiva en pacientes con trastornos plaquetarios.

En este trabajo hemos centrado nuestro interés en dos factores transcripcionales esenciales durante el desarrollo hematopoyético y megacariocítico. El primero de ellos es RUNX1, que posee un papel crítico en la hematopoyesis embrionaria de ratón, y consecuentemente debería mantener esta relevancia en la hematopoyesis humana. Consideramos que la expresión de RUNX1 potenciará la diferenciación hematopoyética de hPSC.

La megacariopoyesis y trombopoyesis se desarrollan en un ambiente hipóxico en médula ósea, por tanto consideramos que la hipoxia inducirá una mayor producción de células de linaje megacariocítico. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el factor transcripcional SCL es esencial en la hematopoyesis y megacariopoyesis humana. Planteamos que la expresión de SCL junto con la hipoxia incrementará la diferenciación megacariocítica *in vitro* de hPSC.

Asimismo, la generación de modelos humanos de enfermedades hematopoyéticas es de gran importancia para estudiar la biología, el desarrollo de dichas enfermedades y el diseño de nuevas herramientas terapéuticas. Consideramos que las hPSC son un modelo ideal para la generación de modelos humanos de trastornos plaquetarios como FPDMM y BSS. Además, nos permitirán evaluar el rescate genético de estos síndromes mediante terapia génica y su validación funcional o fenotípica mediante la diferenciación megacariocítica *in vitro*.

OBJETIVOS

Proponemos 3 objetivos específicos a desarrollar en este proyecto:

1. Estudiar el papel de RUNX1 en el desarrollo de la hematopoyesis humana empleando hPSC como modelo de estudio.
 - Analizar la función de las isoformas del gen *RUNX1* durante la diferenciación hematopoyética de hPSC.
2. Optimizar la generación de células hematopoyéticas de linaje megacariocítico mimetizando el ambiente fisiológico de médula ósea empleando hPSC.
 - Estudiar el efecto de la hipoxia en la diferenciación megacariocítica de hPSC.
 - Analizar el efecto combinado de la hipoxia y la sobre-expresión del factor de transcripción SCL en la diferenciación megacariocítica de hPSC.
3. Generar y validar modelos humanos de enfermedades hematopoyéticas a partir de hPSC.
 - Generar un modelo humano del Trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM).
 - Validar el rescate génico del modelo humano del Síndrome de Bernard-Soulier (BSS) previamente generado por células primarias de pacientes de dicha enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo 1. Estudiar el papel de RUNX1 en el desarrollo de la hematopoyesis humana empleando hPSC como modelo de estudio.

Para analizar la función de las isoformas del gen *RUNX1* durante la diferenciación hematopoyética se lleva a cabo la siguiente metodología.

1.1. Cultivo de líneas hiPSC

Las líneas hiPSC, PBMC1-iPS4F1-EV/iPS4F1-EV, PBMC1-iPS4F1-RUNX1a/ iPS4F1-RUNX1a, PBMC1-iPS4F1-RUNX1b/ iPS4F1-RUNX1b y PBMC1-iPS4F1 RUNX1c/ iPS4F1-RUNX1c fueron cultivadas en frascos T25 cubiertos con Matrigel (BD Bioscience) a una dilución 1:20 en KO-DMEM (Life Technologies) usando el medio de crecimiento esencial 8 (E8)⁴⁹⁹. Las líneas celulares se sub-cultivaron semanalmente con una confluencia del 80% mediante disociación celular con PBS-EDTA 0.5mM (Life Technologies).

1.2. Estrategia de clonaje, vectores lentivirales y transducción

Las líneas celulares iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c fueron obtenidas mediante la transducción lentiviral de la línea original PBMC1-iPS4F1⁵⁰⁰ y clonadas en el vector pRRL-EF1α-eGFP-PGK-NEO (generosamente provisto por el Profesor Trono. Lausanne, Suiza), previamente cortado en los sitios PmeI. Basado en un *backbone* pRRL⁵⁰¹, el vector carece de actividad promotora y de *enhancer* en su 3' LTR (del inglés, *Long Terminal Repeat*) eliminando el riesgo de activación de oncogenes, por lo que da lugar a su auto-inactivación. La extensión central de poli-purinas aumenta la eficiencia de transducción, facilitando la importación nuclear.

EF1α es el promotor del factor de elongación 1α, un promotor constitutivo de origen humano utilizado para dirigir la expresión ectópica de genes tanto *in vitro* como *in vivo*. Se suele usar en aquellos sistemas en los que el promotor CMV (Cytomegalovirus) tiene una actividad baja o nula, como en hPSC⁵⁰².

PGK es el promotor de la fosfoglicerato quinasa, un promotor constitutivo humano que facilita la expresión de transgenes en hPSC a largo plazo⁵⁰².

NEO, técnicamente conocido como aminoglicósido 3' fosfotransferasa, es un gen que codifica una enzima que inactiva por fosforilación a los antibióticos aminoglicósidos, como la neomicina o la geneticina (G418 sulfato), permitiendo a las células que lo expresan ser resistentes a la exposición a estos antibióticos. Se emplea para seleccionar las líneas celulares transducidas con plásmidos de expresión, eliminando así a las células no transducidas. Este vector produce resistencia a la neomicina gracias al promotor PGK, pero el promotor EF1α no dirige la expresión de ningún transgén, por eso lo hemos usado como vector control (EV, del inglés *Empty Vector*).

EGFP, es una proteína verde fluorescente mejorada que permite un seguimiento de la expresión del vector, mediante técnicas de citometría e imagen, indicando la expresión del transgén (Figura 37).

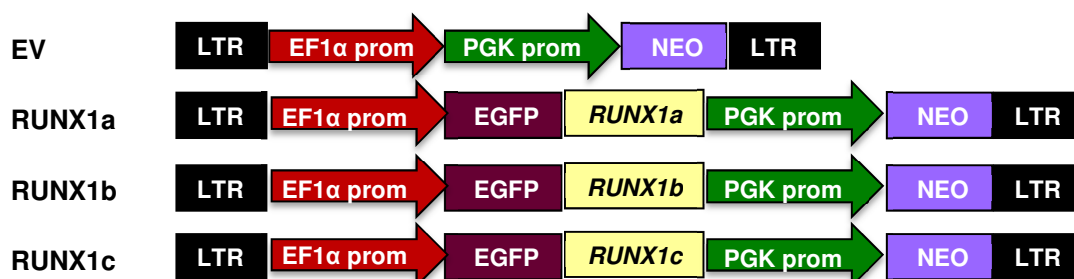


Figura 37. Esquema de los vectores de expresión usados como control (EV) y la sobreexpresión de las isoformas de *RUNX1* en la línea PBMC1-iPS4F1.

Las células HEK-293T fueron transfectadas con los vectores pRRL-EF1α-PGK-NEO (EV), pRRL-EF1α-eGFP-*Runx1a*-PGK-NEO, pRRL-EF1α-eGFP-*Runx1b*-PGK-NEO y pRRL-EF1α-eGFP-*Runx1c*-PGK-NEO junto con los plásmidos empaquetadores, psPAX y pMD2.G (Addgene) mediante transfección estándar con fosfato cálcico²⁴⁵. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron a las 48h de la transfección y se concentraron mediante ultracentrifugación a 26000 rpm. Las partículas virales fueron resuspendidas en E8 y la línea PBMC1-iPS4F1 fue transducida con las diferentes isoformas de *RUNX1* durante 14-16h tras ser subcultivada con los virus concentrados y suplementada con 8 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich) que aumenta la eficiencia de transducción al neutralizar la repulsión de cargas entre las partículas víricas y el ácido siálico presente en la superficie celular. Al día siguiente, se eliminó el sobrenadante con los virus y las hiPSC transducidas fueron lavadas con medio fresco y mantenidas en cultivo. La selección se llevó a cabo con 150 µg/mL G418 (Invitrogen) desde el día 3 al 15 post-transducción.

1.3. Expresión de las isoformas de *RUNX1* por qPCR

Para verificar que la transducción lentiviral con las isoformas del gen *RUNX1* se ha realizado correctamente, se comprueba la expresión génica de dichas isoformas mediante el análisis por PCR cuantitativa (qPCR). El ARN total fue aislado usando High Pure RNA Isolation Kit (Roche). El ADNc fue generado usando Transcription First Strand c-DNA synthesis kit (Roche) a partir de 1 µg de ARN y analizado mediante qRT-PCR usando Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) en el sistema ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific). Se usó *GAPDH* (del inglés, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) como normalizador y la expresión relativa fue calculada usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los primers usados se muestran en la Tabla 1.3.1.

Tabla 1.3.1. Primers usados para la detección de las isoformas de *RUNX1* por qPCR.

Primer	Secuencia (5'-3')
GAPDH Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
GAPDH Rv	GAAGATGGTGTATGGGATTTC
RUNX1 Fw	CCGAGAACCTCGAAGACATC
RUNX1 Rv	GCTGACCCTCATGGCTGT

1.4. Expresión de las isoformas de *RUNX1* por Western Blot

Las líneas celulares fueron lavadas dos veces con PBS 1X y disociadas con TrypLE Express (Invitrogen). Las células fueron lisadas en buffer RIPA (Sigma-Aldrich) suplementado con inhibidores de proteasas como PMSF (del inglés, *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*), Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche), un estabilizador de proteínas como DTT (del inglés, *Dithiothreitol*), Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 y Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (ambas de Sigma-Aldrich). Tras el lisado celular, se sometieron 100 ug de extracto proteico a electroforesis mediante el método SDS-PAGE (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) ampliamente utilizado para separar las proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética. Los pesos moleculares de las proteínas son 27KDa para RUNX1a, 45KDa para RUNX1b y 48KDa para RUNX1c. Se elaboraron geles de poliacrilamida al 10%. La transferencia proteica se llevó a cabo en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *Polyvinylidene Fluoride*).

Las proteínas RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c fueron detectadas con el sistema de imagen infrarrojo Odyssey (Li-cor Bioscience) usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-RUNX1 (Cell Signaling Technology) a una dilución 1:500. Como control de carga de uso el anticuerpo anti- β -Actin (clone AC-15; Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10000.

1.5. Análisis de pluripotencia

Es importante comprobar que las líneas generadas por sobre-expresión de las diferentes isoformas del gen *RUNX1* continúan manteniendo su pluripotencia, característica imprescindible para su posterior diferenciación hematopoyética.

El análisis de pluripotencia se llevó a cabo mediante la detección endógena de los genes de pluripotencia y por análisis de citometria de flujo a nivel de proteína.

1.5.1. Análisis de expresión endógena de los genes de pluripotencia

Se evaluó la expresión endógena de los factores de transcripción de pluripotencia OCT3/4, SOX2, REX1 y NANOG mediante RT-PCR. Se aisló ARN total de las diferentes líneas usando High Pure RNA Isolation Kit (Roche) y el ADNc se generó usando Transcription First Strand c-DNA synthesis kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa. Como control de carga se utilizó β - Actin. La secuencia de los *primers* usados se muestra en la Tabla 1.5.1.1.

Tabla 1.5.1.1. Primers usados para la detección endógena de pluripotencia

Primer	Secuencia (5'-3')
NANOG Fw	TGCAGTTCCAGCCAAATTCTC
NANOG Rv	CCTAGTGGTCTGCTGTATTACATTAAGG
OCT4 Fw	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA
OCT4 Rv	ACACTCGGACCACATCCTTC
REX1 Fw	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT
REX1 Rv	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA
SOX2 Fw	TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAG
SOX2 Rv	CTCAGTCCTAGTCTTAAAGAGGCAGC
β-ACTIN Fw	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
β-ACTIN Rv	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA

1.5.2. Análisis de expresión proteica de pluripotencia

Se analizó la pluripotencia de las líneas celulares a nivel de proteína mediante la tinción con anticuerpos específicos de marcadores de superficie de hPSC y analizados por citometría de flujo, usando el citómetro BD FACS Verse (BD Bioscience). Las colonias celulares de las diferentes líneas hiPSC fueron disociadas empleando Tryple Express (Life Technologies) y lavadas con PBS suplementado con 5% Suero bovino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) por centrifugación a 1250rpm 5 minutos. La suspensión celular fue teñida con los marcadores de superficie SSEA3 (PE, BD Bioscience), SSEA4 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen), Tra1-60 (PE, BD Bioscience), Tra1-81 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen) durante 15 minutos, en oscuridad a temperatura ambiente. La tinción intracelular para Oct3/4 fue desarrollada por incubaciones secuenciales mediante soluciones de fijación y permeabilización (A and B Fix & Perm Solutions, Invitrogen). Después, las células se incubaron con el anticuerpo primario Oct3/4 (BD Bioscience) y posteriormente con el anticuerpo secundario conjugado en FITC (BD Bioscience). Después del lavado, las células fueron teñidas con el marcador de viabilidad celular 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (PerCP-Cy5.5, BD Bioscience) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Como controles negativos se emplearon los isotipos SSEA3 (Isotype Control Antibody, BD Bioscience), APC (Ig 62b, BD Pharmingen) y TRA-1-60 (Mouse IgM-PE, BD Bioscience). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante FlowJo™ software (FlowJo, LLC-BD Bioscience).

1.6. Diferenciación hematopoyética

En nuestro laboratorio, trabajamos con un modelo de diferenciación hematopoyética que trata de simular lo que ocurre en la hematopoyesis humana. En primer lugar, cultivamos las hPSC y posteriormente, cuando las células han alcanzado la confluencia adecuada llevamos a cabo su diferenciación a los diferentes estadios de la hematopoyesis humana como son el mesodermo, el endodermo y finalmente a células hematopoyéticas (Figura 38).

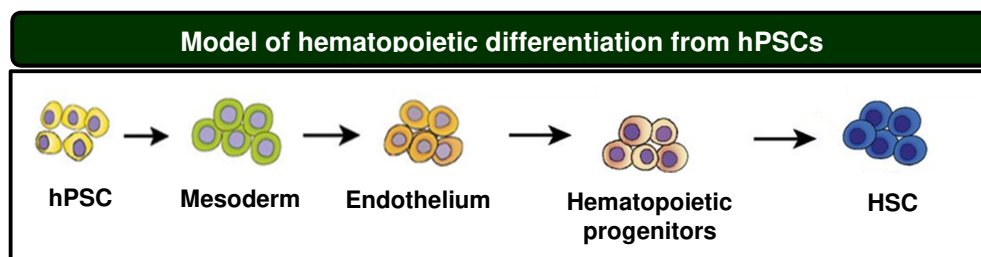


Figura 38. Modelo de diferenciación de hPSC hacia células de linaje hematopoyético.

La diferenciación hematopoyética de las líneas hiPSC que expresan las isoformas de *RUNX1* se realizó mediante el empleo de un protocolo de diferenciación libre de suero y componentes animales descrito por Uenishi *et al*²²⁵.

El plaqueo celular se realizó a día -1 del protocolo de diferenciación. Las líneas celulares cultivadas en medio E8 y con una confluencia del 80% se lavaron con PBS-EDTA 0.5mM (Life Technologies), se disociaron en Tryple Express (Life Technologies), se centrifugaron a 300g 5 minutos y después se realizó el conteo celular bajo microscopía óptica usando una cámara de Neubauer. Se sembraron 40.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (Corning) previamente cubiertas con colágeno IV humano (Sigma Aldrich) en 2 mL de medio E8 con 10uM Y27632 (Selleckchem) y mantenidas a 37°C al 20% O₂ y 5% CO₂.

Al día siguiente del plaqueo celular, se inició la diferenciación a mesodermo temprano (día 0-2), se realizó el cambio de medio E8 por medio de diferenciación IF9S suplementado con 50 ng/mL BMP4 (PeproTech), 50 ng/mL FGF2 (PeproTech), 15 ng/mL Activina A (PeproTech), 2 mM LiCl (Sigma Aldrich) y 10 µM Y27632. Las células se transfirieron a un incubador a 37°C, 5% O₂ y 5% CO₂. A las 48h, se realizó el cambio de medio por IF9S suplementado con 50 ng/mL FGF2 y 50 ng/mL VEGF (PeproTech) para continuar la diferenciación hasta mesodermo hematovascular (día 2-4).

El día 4 se inició la diferenciación a endotelio hemogénico (día 4-8), el medio se cambió por IF9S complementado 50 ng/mL FGF2, 50 ng/mL VEGF, 50 ng/mL SCF (PeproTech), 50 ng/mL TPO (PeproTech), 10 ng/mL IL3 (PeproTech) y 50 ng/mL IL6 (PeproTech). El día 6 del cultivo se añadió medio de diferenciación igual al día 4, sin aspirar el medio previo y los cultivos celulares volvieron a transferirse a 37°C, 20% O₂ y 5% CO₂.

A partir de día 8 se inició la diferenciación a hematopoyesis, consistiendo en cambios de medio de diferenciación cada dos días hasta día 15, con la misma composición al día 4 (Figura 39).

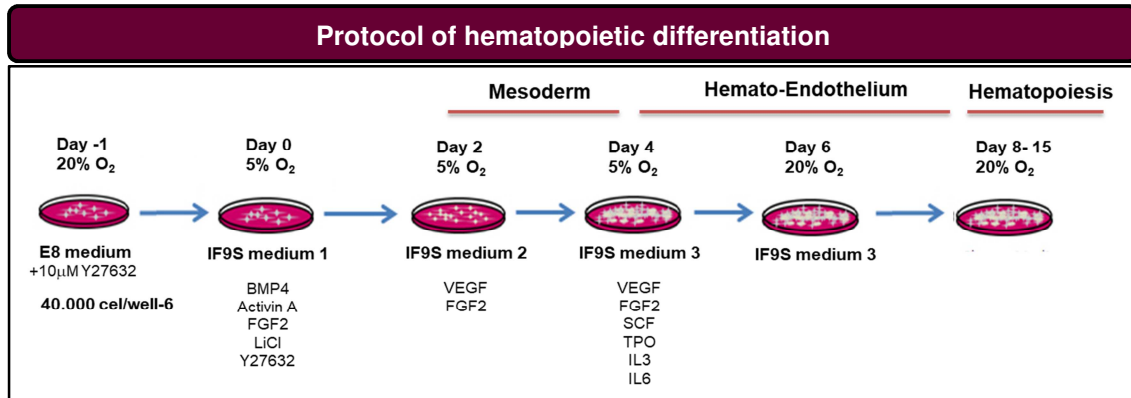


Figura 39. Protocolo de diferenciación a células de linaje hematopoyético. Adaptada de Uenishi *et al.*²²⁵

Los días 5, 8, 11 y 15 los cultivos celulares fueron disociados empleando Tryple Express (Life Technologies) y lavados con PBS 5% FBS mediante centrifugación a 300g 5 minutos. Posteriormente, la suspensión celular se tiñó con los anticuerpos anti-human CD34 (PE-Cy7, BD Pharmingen), anti-human KDR (PE, BD Bioscience) y anti-human CD144 (V450, BD Horizon) para analizar marcadores endoteliales. Para analizar los HEP la suspensión celular fue teñida con los anticuerpos anti-human CD34 (PE-Cy7, BD Pharmingen) y anti-human CD43 (APC, BD Bioscience) y por último, para analizar los progenitores hematopoyéticos se tiñó con los anticuerpos anti-human CD41a (PE, BD Bioscience), anti-human CD45 (APC-Cy7, BD Bioscience) y anti-human CD235a (FITC, BD Pharmingen). Tras 15 minutos de tinción en oscuridad a temperatura ambiente, las células fueron lavadas y teñidas con el marcador de viabilidad celular 7-AAD (PerCP-Cy5.5, BD Bioscience) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las poblaciones celulares se analizaron en el citómetro BD FACS Verse (BD Bioscience) y los resultados obtenidos mediante FlowJo™ software (FlowJo, LLC-BD Bioscience).

Tabla 1.6.1. Composición del medio de diferenciación IF9S

Casa comercial	Componentes	Concentración final
Solución stock	10X IF4S	1X
	ddH2O	
Sigma-Aldrich	Polyvinyl Alcohol (PVA)	10 g/L
Life Technologies	Glutamax 100X	1X
Life Technologies	Non-Essential Amino Acids (NEAA)	1X
Peptotech	Holo-Transferrin	10.6 mg/L
Sigma-Aldrich	Human Insulin	20 mg/L

Tabla 1.6.2. Composición del medio base de diferenciación 10X IF4S

Casa comercial	Componentes	Concentración final
Life Technologies	IMDM	5X
Life Technologies	F12	5X
	ddH2O	
Fisher	Sodium Bicarbonate	21 g/L
Sigma-Aldrich	L-asorbic Acid 2-Phosphate Mg2+ salt	640 mg/L
Sigma-Aldrich	Monothioglycerol	400 μ l/L
Sigma-Aldrich	Additional Sodium Selenite	140 μ g/L
Life Technologies	CDLC	2X

1.7. Ensayo de unidades formadoras de colonias (CFU)

Se realizaron ensayos del potencial clonogénico de los progenitores hematopoyéticos de las distintas líneas celulares para estudiar la capacidad de proliferación y de formación de colonias hematopoyéticas. Se cultivaron 5×10^4 células provenientes de los cultivos en diferenciación hematopoyética siendo positivos para los marcadores hematopoyéticos $CD34^+$, $CD43^+$ y $CD41a^+$, imprescindibles para la formación de colonias hematopoyéticas. Estas células se cultivaron en MethoCult™ SF H4436 (Stem Cell Technologies) a día 8 de la diferenciación.

Las células fueron incubadas a 37°C en una atmosfera humidificada y el conteo de CFU (del inglés, *Colony Forming Units*) se realizó entre los días 10 y 12 usando criterios morfológicos descritos en la guía *Atlas of Human Hematopoietic Colonies*, Stem Cell Technologies⁵⁰³.

Podemos distinguir varios tipos de colonias hematopoyéticas (Figura 40). Las más frecuentes son:

- CFU-G: colonias que formarán una población homogénea de granulocitos.
- CFU-M: colonias que formarán una población homogénea de macrófagos.
- CFU-GM: colonias que formarán una población heterogénea de granulocitos y monocitos.
- CFU-E: colonias que formarán eritrocitos.

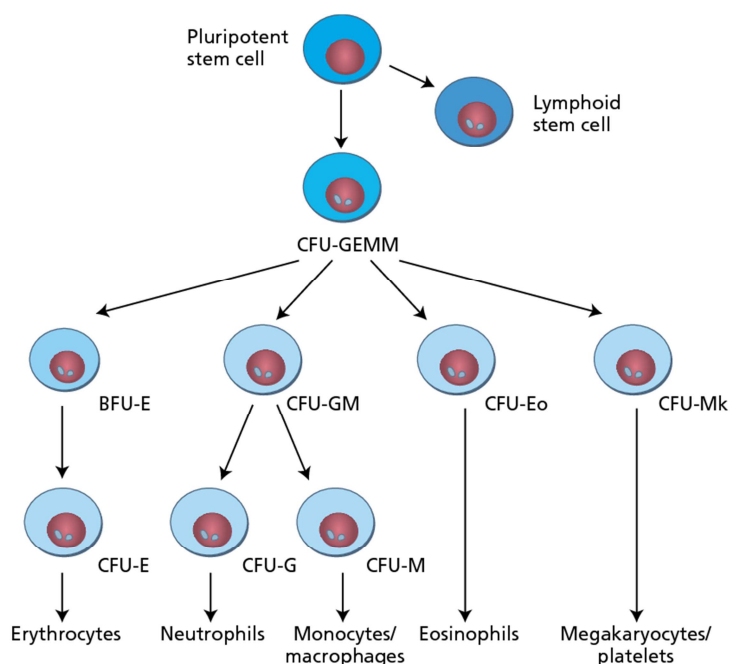


Figura 40. Esquema representativo de la proliferación y formación de CFU hematopoyéticas⁵⁰⁴.

1.8. Análisis estadístico

Todos los datos están representados como la media $\pm$ SEM. Los análisis estadísticos con respecto al control han sido llevados a cabo mediante un ANOVA de dos vías complementándola con el test de comparación múltiple de Bonferroni. Excepto los datos de distribución de las colonias hematopoyéticas de los ensayos de CFU que se han analizado mediante un ANOVA de una vía complementándose con el post-test de Newman-Keuls.

Valores de $p < 0.05$ han sido considerados como estadísticamente significativos.

* corresponde a $p < 0.05$, ** corresponde a $p < 0.01$ y *** corresponde a $p < 0.001$.

Objetivo 2. Optimizar la generación de células hematopoyéticas de linaje megacariocítico mimetizando el ambiente fisiológico de la médula ósea empleando hPSC.

Para estudiar el efecto de la hipoxia y de SCL en la megacariopoyesis se realizó la siguiente metodología.

2.1. Cultivo de líneas hESC

Las líneas hESC, H9 y AND1 SCL se cultivaron en frascos T25 cubiertos con Matrigel (BD Bioscience) a una dilución 1:20 en KO-DMEM (Life Technologies) en medio PluriSTEM™ Human ES/iPS (Merck Millipore). Los cultivos celulares se sub-cultivaron semanalmente con una confluencia del 80-90% empleando Collagenase IV (Invitrogen).

La línea H9 se obtuvo por un acuerdo de cesión de WiCell Research Institute, (Madison, WI).

Las líneas AND1 NEO y AND1 SCL se obtuvieron por la transducción lentiviral de la línea original AND1 (Banco Nacional de células madre) empleando el vector pRRL-EF1α-PGK-NEO y pRRL-EF1α-EGFP-2A-Flag-SCL-PGK-NEO, respectivamente²⁴⁵.

2.2. Análisis de pluripotencia

Se comprobó que las líneas celulares mantenían su pluripotencia, característica esencial para su posterior diferenciación a megacariocitos. Se analizaron por citometría de flujo los marcadores de pluripotencia a nivel de proteína mediante tinción con los anticuerpos específicos de superficie SSEA3 (PE, BioScience), SSEA4 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen), Tra1-60 (PE, BioScience), Tra1-81 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen) y Oct3/4 (BD BioScience). Los porcentajes celulares se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Bioscience). Metodología descrita anteriormente.

2.3. Diferenciación a megacariocitos mediante co-cultivo con células OP9

Para llevar a cabo la generación de células de linaje megacariocítico derivadas de las líneas hESC empleamos un protocolo de diferenciación optimizado por Lu *et al*⁸⁷⁶.

Este protocolo consta de dos etapas: una primera fase de formación y crecimiento de cuerpos embrioides (EBs) y una segunda fase de co-cultivo con células estromales de médula ósea de ratón, células OP9 (Figura 41). Estas células son capaces de diferenciarse a megacariocitos y plaquetas *in vitro* a partir de células embrionarias como se ha reportado en varios artículos^{224, 246-247, 505}.

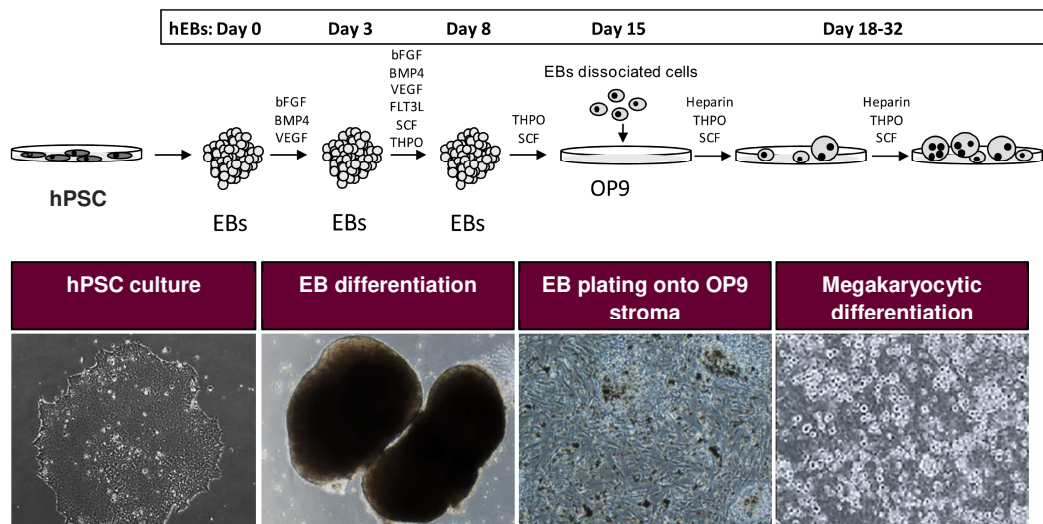


Figura 41. Protocolo de diferenciación a megacariocitos. Este protocolo de diferenciación consta de una primera fase mediante la formación de EBs y una segunda fase de co-cultivo con células OP9. Mostramos imágenes representativas de las diferentes fases del cultivo durante la diferenciación a megacariocitos. Adaptada de Toscano *et al.*²⁴⁷

Las células OP9 fueron cultivadas en placas de 10cm cubiertas con gelatina en medio basal α -MEM (Gibco) suplementado con un 20% FBS (Gibco).

Las hESC fueron disociadas cuando alcanzaron una confluencia del 80% empleando Collagenase IV (Gibco) durante 5 minutos a 37°C seguido de un raspado suave en pequeños fragmentos que fueron transferidos a placas de 6 pocillos de baja adhesión celular (Corning) y cultivadas en medio de EBs (DMEM suplementado con 20% FBS, 1% NEAA, 1% Glutamax y 0.2% β -Mercaptoetanol. Todo de Gibco).

Una vez formados los EBs realizamos distintos procedimientos para estudiar el efecto de la hipoxia en la formación de megacariocitos, para ello mantuvimos cultivos celulares a distintas condiciones de oxígeno (Figura 42):

- Como control un cultivo se mantuvo a 37°C, 20% O₂ y 5% CO₂ durante todo el proceso de diferenciación.
- Como tratamientos experimentales:
 - Para simular las condiciones fisiológicas ambientales que encontramos en médula ósea, mantuvimos un cultivo a 37°C, 2% O₂ y 5% CO₂ durante la fase de formación de EBs y en la fase de co-cultivo con células OP9 a 37°C, 5% O₂ y 5% CO₂.
 - Cultivo continuado a 37°C, 2% O₂ y 5% CO₂.
 - Cultivo progresivo 37°C, 5% O₂ y 5% CO₂.

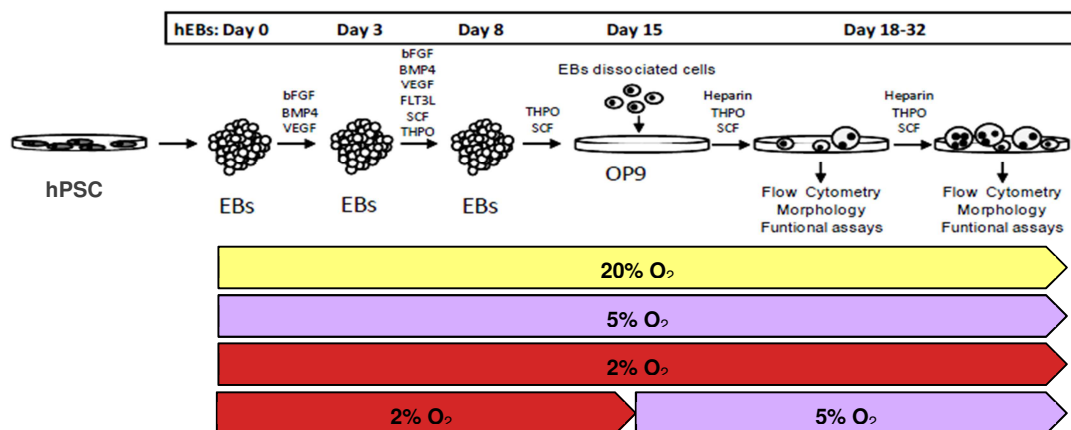


Figura 42. Esquema representativo del procedimiento experimental llevado a cabo durante la diferenciación a megacariocitos.

A las 24h, tras la formación de EBs, el medio se cambió por medio de EBs suplementado con 50 ng/mL BMP4 (Peprotech), 50 ng/mL VEGF (Peprotech) y 20 ng/mL FGFb (Miltenyi Biotec). Posteriormente, se realizaron cambios de medio cada dos días hasta el día 9, suplementándose el medio de EBs con 50 ng/mL BMP4, 50 ng/mL VEGF, 20 ng/mL FGFb, 20 ng/mL SCF (Peprotech), 20 ng/mL TPO (Peprotech) y 20 ng/mL FLT3 (Peprotech). Desde el día 9 al 15, el cóctel de citoquinas añadidas al medio se simplificó a 50 ng/mL TPO y 20 ng/mL SCF.

El día 15, los EBs fueron disgregados empleando Collagenase B (Roche) 2h a 37°C, seguido de 10 minutos de incubación al baño a 37°C usando Cell Dissociation Buffer (Gibco) para obtener una suspensión de células con los precursores megacariocíticos. Posteriormente, las células se cultivaron en medio de diferenciación de OP9 (medio basal α -MEM suplementado con 10% FBS, 10 μ M monotioglicerol y 50 μ g/mL ácido ascórbico) con 100 ng/mL TPO y 50 ng/mL SCF en placas de 6 pocillos recubiertas con un estroma de células OP9. En este momento, el cultivo que representaría la condición fisiológica de médula ósea y había crecido a un 2% O_2 se traspasó a un incubador al 5% O_2 hasta finalizar el proceso de diferenciación. Además, se colectaron muestras para analizar la viabilidad celular por tinción con 7-AAD (PerCP-Cy5.5, BD Bioscience) y marcadores celulares de progenitores hematopoyéticos por tinción con el anticuerpo anti-CD34 (APC, BD Bioscience) mediante citometría de flujo, usando el citómetro BD FACSCanto II (BD Bioscience).

A las 24h de la disociación de EBs, se cambió el medio por medio de diferenciación de OP9 suplementado con 100 ng/mL TPO, 50 ng/mL SCF y 25 U/mL Heparina. Los días 18, 22, 25 y 28 se recolectaron las células del sobrenadante para proceder al análisis de los marcadores celulares específicos de linaje megacariocítico por tinción con los anticuerpos anti-CD41a (PE, BD Bioscience) y anti-CD42b (APC, BD Bioscience). Los porcentajes de estos marcadores se analizaron por citometría de flujo, usando el citómetro BD FACSCanto II. Al resto del cultivo celular se le añadió la cantidad de medio equivalente de medio de diferenciación de OP9 suplementado con 100 ng/mL TPO, 50 ng/mL SCF y 25 U/mL Heparina. A partir del día 22, se añadió al cultivo celular el inhibidor de metaloproteinas GM6001 (Merck Millipore) a 50 μ M para

prevenir la rotura y pérdida del antígeno CD42b en las plaquetas producidas. Para cuantificar el número de células megacariocíticas $CD41a^+CD42b^+$ se añadió a la mezcla de células un número determinado de Perfect-Count Microspheres (Cytognos) antes de su análisis por citometría. Los megacariocitos y las plaquetas pueden diferenciarse en el citómetro por su diferencia en complejidad y tamaño (Figura 43).

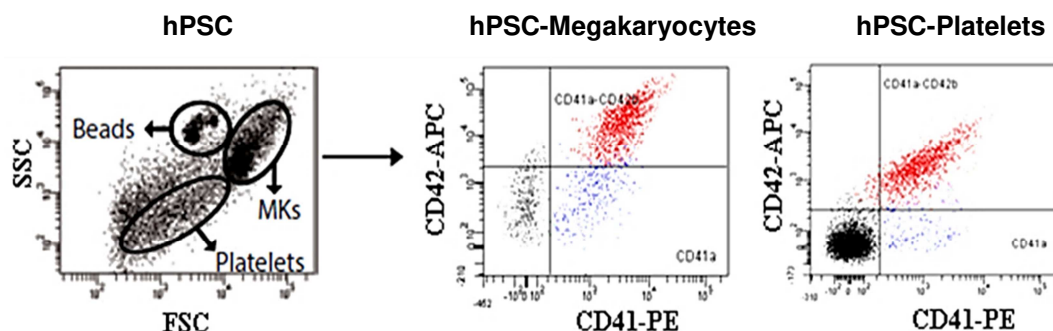


Figura 43. Análisis de células $CD41a^+CD42b^+$ mediante citometría de flujo.

2.4. Estudio combinado del papel de la hipoxia y SCL en la megacariopoyesis de hESC

Para estudiar el efecto derivado de la hipoxia junto con el papel de SCL en la megacariopoyesis, empleamos la misma línea celular (AND 1 SCL) empleada en el estudio de Toscano *et al.*²⁴⁷. Los resultados de este estudio confirman que la expresión ectópica de SCL incrementa la megacariopoyesis.

Para llevar a cabo la diferenciación a megacariocitos de AND1 SCL se utilizó el protocolo de diferenciación descrito anteriormente, aplicando las mismas condiciones de O_2 que en la línea H9 Neo durante el cultivo celular, para así estudiar el efecto de la hipoxia y la expresión de SCL en la formación de megacariocitos derivados de AND1 SCL.

2.4.1. Western Blot

Tras completar la diferenciación a megacariocitos de la línea celular AND1 SCL y comprobar que los datos obtenidos no eran los esperados en combinación con la hipoxia, se intentó buscar la explicación de estos resultados. Por esta razón, se analizó la expresión de SCL a bajas tensiones de O_2 por western blot.

Se ha reportado que SCL es degradado bajo condiciones de hipoxia en varios tipos celulares⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁷. Para comprobar si esto ocurría en hESC, cultivamos la línea AND1 SCL durante 6 días al 20% O_2 , 5% O_2 y al 2% O_2 y analizamos la expresión de la proteína SCL mediante western blot. Las células AND1 NEO fueron empleadas como control negativo de expresión de SCL.

Además, estudiamos las posibles vías de degradación de SCL bajo hipoxia. En células endoteliales, SCL es fosforilada en un residuo de serina (Ser122), esta fosforilación

activa la degradación de la proteína por el proteosoma⁵⁰⁶. Cultivamos nuestras células al 2% O₂ durante 24h empleando varios inhibidores de la ruta transcripcional de SCL que afectan a la fosforilación de la proteína y a su degradación por el proteosoma (Figura 44):

- Inhibidores de la fosforilación de SCL
 - PD 98059 (inhibidor de MAPK Kinase 1, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*), (Merck Millipore). Se utilizó a una concentración 50 µM.
 - LY 294002 (inhibidor de PI3K, del inglés *Phosphatidylinositol 3 Kinase*), (Merck Millipore). Se utilizó a una concentración 1 µM.
- Inhibidores de la degradación de SCL
 - MG132 (potente inhibidor del proteosoma), (Merck Millipore). Se utilizó a una concentración 0.01 µM.

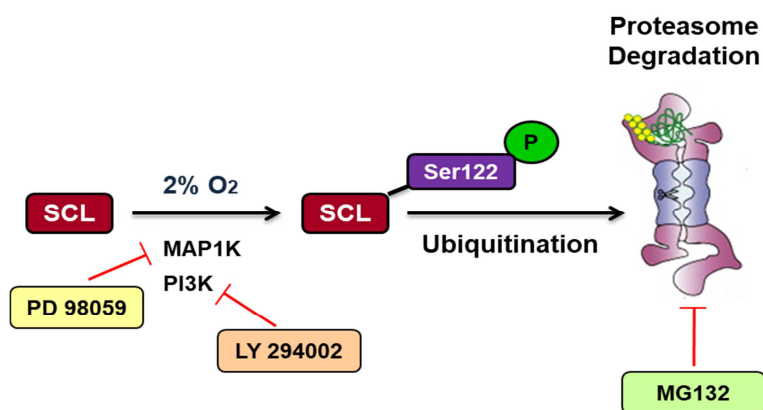


Figura 44. Esquema representativo de los inhibidores de la ruta transcripcional de SCL

Las células fueron lisadas en buffer RIPA. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis mediante el método SDS-PAGE. El peso molecular de SCL es de 42 KDa. Se elaboraron geles de poliacrilamida al 8%. Metodología descrita anteriormente.

La proteína SCL fue detectada con el sistema de imagen infrarrojo Odyssey (Li-cor Bioscience) usando un anticuerpo policlonal de cabra anti-TAL1(C-21) (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500. Como control de carga de uso el anticuerpo anti-β-Actin (clone AC-15; Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10000.

2.5. Análisis estadístico

Los datos están representados como la media ± SEM. Los análisis estadísticos correspondientes a la viabilidad celular, a los progenitores hematopoyéticos y a las cuantificaciones relativas proteicas se han realizado mediante un ANOVA de una vía. En cambio, los correspondientes a las células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺ se realizaron mediante un ANOVA de dos vías. En todos los casos el ANOVA se complementó con el test de comparación múltiple de Bonferroni.

Valores de $p < 0.05$ han sido considerados estadísticamente significativos.

Objetivo 3. Generar y validar modelos humanos de enfermedades hematopoyéticas a partir de hPSC.

3.1. Generar un modelo humano del Trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM).

3.1.1. Reprogramación celular de un paciente con FPDMM

En primer lugar, para la generación de un modelo humano de FPDMM, llevamos a cabo la reprogramación celular de una mujer caucásica con FPDMM, cuyos antecedentes familiares presentan trombocitopenias y neoplasias mieloides.

El árbol genealógico de la paciente se muestra en la Figura 45.

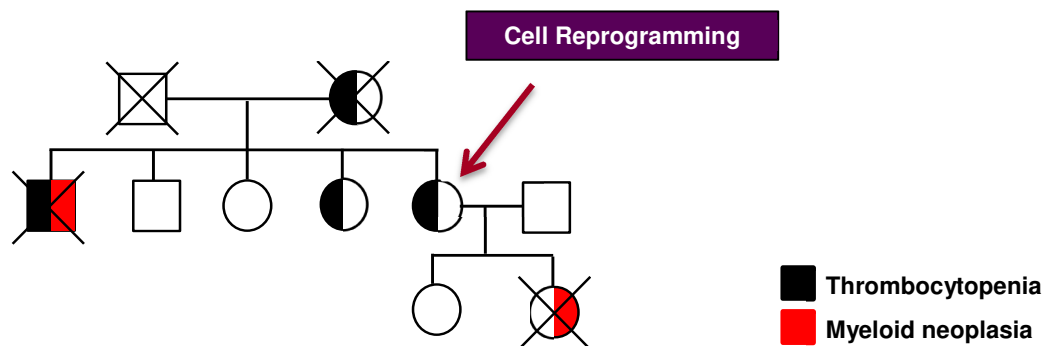


Figura 45. Árbol genealógico de la paciente con FDPMM para reprogramación celular.

Esta paciente presenta una mutación, que aún no ha sido descrita, en el exón 6 del *locus RUNX1*, la variante **p.Thr196Ala** (Figura 46).

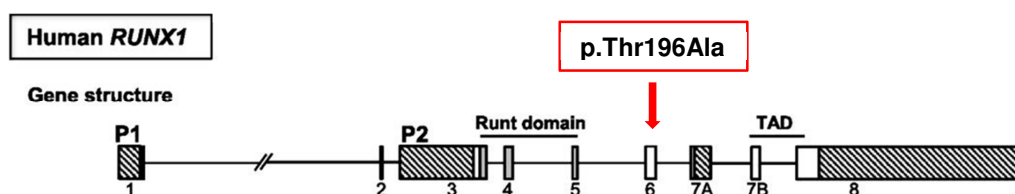


Figura 46. Localización de la mutación p.Thr196Ala en el exón 6 del *locus RUNX1*.

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de la paciente con FPDMM tras obtener el consentimiento informado de acuerdo al Comité de ética de Andalucía para la reprogramación celular, la legislación europea y española. La muestra de sangre fue diluida 1:2 (volumen: volumen) en PBS y centrifugada con Ficoll Paque™ PLUS (GE Healthcare) a 1600 rpm 30 minutos para separar por fases el plasma sanguíneo, las células mononucleares, los granulocitos y los eritrocitos. Colectamos las células mononucleares de sangre periférica (PBMNC, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) usando una pipeta *pasteur* (VWR) y lavamos con PBS por centrifugación a 900 rpm 10 minutos para separar por fases el suero junto con las plaquetas y las PBMNC.

Posteriormente, las PBMC fueron lisadas con Ammonium chloride (Sigma-Aldrich) y lavadas con PBS por centrifugación a 1500 rpm 5 minutos.

Se cultivaron 5 millones de PBMC en StemSpan™ SFEM (StemCell Technologies) suplementado con 100ng/mL SCF, 100ng/mL FLT3L, 20ng/mL IL6 y 20ng/mL IL3 (todas las citoquinas de Peprotech) en placas de 6 pocillos (Corning). A los 4 días del cultivo celular, las PBMC fueron transferidas a placas de 12 pocillos recubiertas de fibronectina (BD BioCoat™) y transducidas con SeV no transmisibles que portan los factores de reprogramación Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc¹²⁻¹³ usando CytoTune® -iPS 2.0 Reprogramming kit (Life Technologies). Para la transducción se utilizó un MOI 3 (del inglés, *Multiplicity Of Infection*). Las células se cultivaron en StemSpan™ SFEM en presencia de 8 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich), 10 µM Y27632 (Selleckchem) y ácido ascórbico (Sigma-Aldrich).

Cuatro días después de la transducción, las células se co-cultivaron en StemSpan™ SFEM en ausencia de citoquinas sobre una capa de células madre mesenquimales humanas irradiadas (hMSC, del inglés human *Mesenchymal Stem Cells*) (Inbiobank). Seis días después de la transducción, las células se adaptaron al medio de embrionarias (hESC) que consiste en KO-DMEM (Life Technologies) suplementado con 10% KnockOut Serum Replacement (Life Technologies), 8 ng/mL βFGF2 (Milteny Biotec), 10 µM Y27632 (Selleckchem), 1 mM Glutamina, 1% NEAA y 0.1 mM 2β-mercaptoetanol (todo de Life Technologies).

A partir del día 7, las células se cultivaron en medio hESC. El día 13 después de la transducción, las colonias hiPSC emergentes se seleccionaron individualmente y se expandieron para la caracterización. Desde el día 4 hasta el día 20 después de la transducción, las células se cultivaron en una cámara a 37 °C, 5% O₂ y 5% CO₂.

A partir del día 20, las células se transfirieron a una cámara de cultivo a 37 °C, 20% O₂ y 5% CO₂ y a partir del día 22 los clones seleccionados se mantuvieron durante 5 días a 39 °C para eliminar por completo los SeV termosensibles.

Un mes después, comenzamos el proceso de caracterización celular de los clones seleccionados y establecidos en cultivo celular.

La figura 47 muestra un esquema representativo del proceso de reprogramación celular, selección de clones y de técnicas requeridas para la caracterización celular.

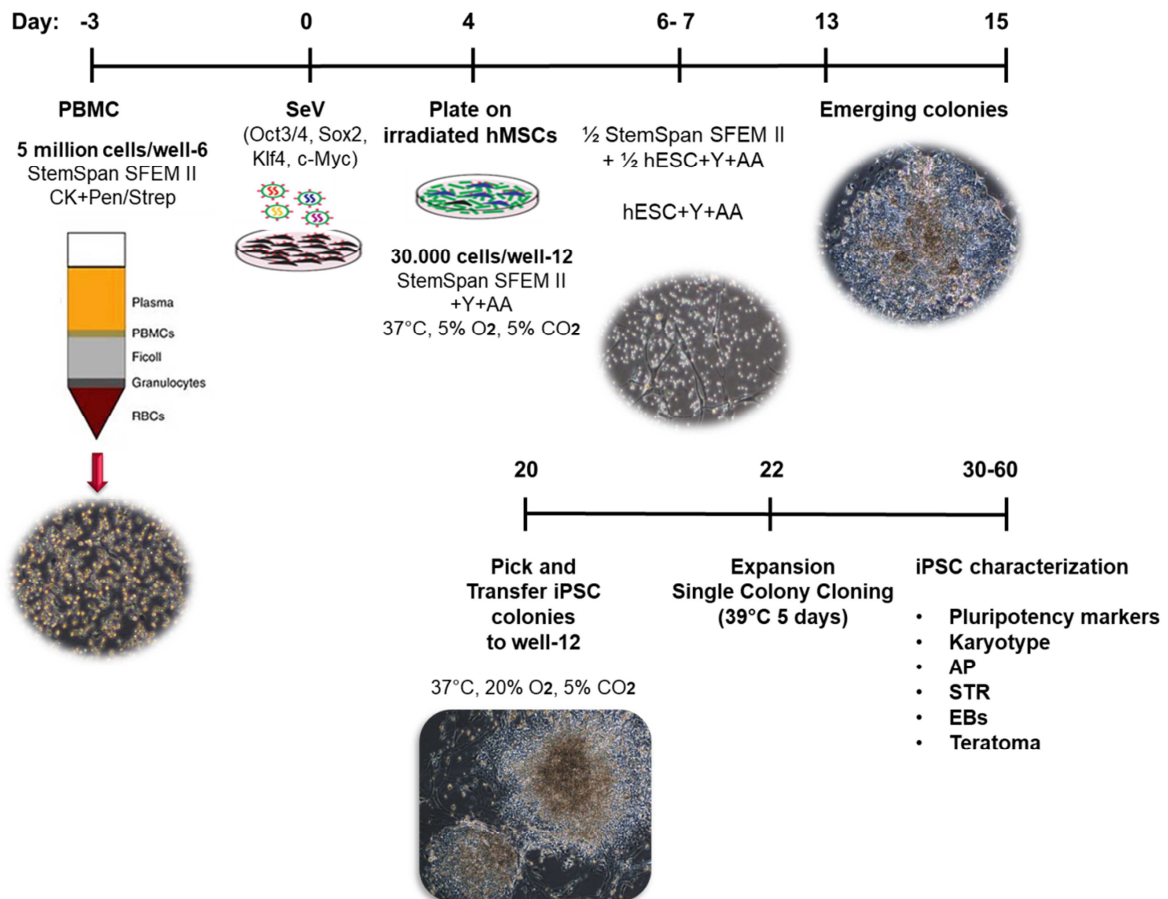


Figura 47. Esquema del protocolo de reprogramación celular de las PBMC de la paciente con FPDMM.

3.1.2. Cultivo celular de las células reprogramadas

Un mes después de la reprogramación celular, se estableció la nueva línea hiPSC generada (FPD-PBMC-iPSC4F73, también conocida como GENYOi005-A. hpscreg.eu/user/cellline/edit/GENYOi005-A) a partir de la selección clonal llevada a cabo durante el proceso de reprogramación. Las células se adaptaron al cultivo en medio de crecimiento E8 en frascos t25 recubiertos de Matrigel a una dilución 1:20 en KO-DMEM. Las células se sub-cultivaron semanalmente utilizando PBS-EDTA 0.5 mM (Life Technologies).

3.1.3. Caracterización celular de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73

Para desarrollar la caracterización celular de la nueva línea hiPSC generada se requiere de la realización de diversas técnicas que se detallan a continuación.

3.1.3.1. Análisis mutacional

EL AND genómico fue aislado de las PBMC de la paciente, de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 y de la línea control PBMC1-iPSC4F1, usando DNA extraction kit (Qiagen).

Se realizó una amplificación por PCR de todas las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent). Se empleó un set de primers que flanquean el exón 6 del *locus RUNX1* (RUNX1-exon 6). Como control de carga se empleo β -Actin. La secuencia de *primers* utilizados se muestra en la Tabla 3.1.3.1. Los fragmentos de PCR amplificados se secuenciaron usando ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabla 3.1.3.1. Secuencia de *primers* para la detección de la mutación en el *locus RUNX1*

Primer	Secuencia (5'- 3')
β -ACTIN Fw	GCGGGAAATCGTGCGTGACATT
β -ACTIN Rv	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG
RUNX1-exon6 Fw	GGCCACCAACCTCATTCTGT
RUNX1-exon6 Rv	ACTTTTGGCTTTACGGGGG

3.1.3.2. Análisis de polimorfismo (STR)

Para verificar el origen de la línea celular FPD-PBMC-iPSC4F73, se llevó a cabo un análisis STR (del inglés, *Short Tandem Repeat*), un método común en biología molecular para comparar *loci* específicos en el ADN de dos o más muestras.

Tras purificar el ADN de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 y de las PBMC de la paciente, se empleó AmpFLSTR® Identifiler® Plus kit (Applied Biosystems) para determinar por PCR la firma genética de ambas muestras mediante un análisis múltiple de 15 *loci* (D8S1179, D3S1358, D2S1338, D18S51, D21S11, TH01, D19S433, D7S820, D13S317, vWA, D5S818, CSF1PO, D16S539, TPOX y FGA) y el marcador Amelogenina que identifica el género de la muestra. Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis capilar en el ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y analizados con GeneMapper® ID Software (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.1.3.3. Análisis de expresión de los factores de reprogramación

Se aisló el ARN total de la nueva línea hiPSC generada, de la línea control (PBMC1-iPS4F1) y de las PBMC de la paciente usando High pure RNA isolation kit (Roche). Posteriormente, se generó ADNc usando Transcription First Strand c-DNA synthesis kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR usando GoTaq Flexi DNA Polimerase kit (Promega) y las condiciones de la PCR se optimizaron para conseguir datos semicuantitativos dentro del rango lineal de amplificación en un SureCycler 8800 thermal cycler (Agilent). Los productos resultantes de la PCR fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa para determinar el silenciamiento de los factores de reprogramación exógenos usando un set de *primers* para SeV, KLF4, c-MYC y KOS. Las PBMC de la paciente transducidas a día 4 tras la exposición a SeV se usaron como control positivo de la presencia de los factores de reprogramación exógenos y la línea PBMC1-iPS4F1 como control negativo. Como control de carga se utilizó β -Actin. La secuencia de *primers* empleados se muestra en la Tabla 3.1.3.3.

Tabla 3.1.3.3. Lista de *primers* usados en la detección de los factores de reprogramación

Primer	Secuencia (5'-3')
β-ACTIN Fw	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
β-ACTIN Rv	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
SeV Fw	GGATCACTAGGTGATATCGAGC
SeV Rv	ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC
KOS Fw	ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC
KOS Rv	ACCTTGACAATCCTGATGTGG
c-MYC Fw	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG
c-MYC Rv	TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG
KLF4 Fw	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC
KLF4 Rv	AATGTATCGAAGGTGCTCAA

3.1.3.4. Análisis de pluripotencia

Por un lado, se generó ADNc procedente del ARN total de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73, de la línea control PBMC1-iPS4F1 y de las PBMC de la paciente para analizar la expresión endógena de los genes de pluripotencia *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG* mediante RT-PCR. La línea PBMC1-iPS4F1 se usó como control positivo y las PBMC de la paciente se emplearon como control negativo. Metodología y listado de *primers* descritos anteriormente.

Por otra parte, por citometría de flujo se comprobaron los marcadores de pluripotencia a nivel de proteína mediante tinción con los anticuerpos de superficie SSEA3 (PE, BioScience), SSEA4 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen), Tra1-60 (PE, BioScience), Tra1-81 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen) y Oct3/4 (BD BioScience). La expresión de los marcadores de pluripotencia se analizó en el citómetro BD FACSVerser (BD Bioscience) y los resultados obtenidos analizados mediante FlowJo™ software (FlowJo, LLC-BD Bioscience). El procedimiento empleado ha sido descrito en la sección anterior.

3.1.3.5. Cariotipado

Se realizó el análisis cromosómico de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 mediante la técnica de bandeo GTG (Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, España). Se analizaron 20 metafases siguiendo las recomendaciones del ISCN (del inglés, *International System for Human Cytogenetics Nomenclature*)⁵⁰⁸⁻⁵⁰⁹.

3.1.3.6. Análisis de fosfatasa alcalina

Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos (Corning) recubiertas con Matrigel durante 5 días a 37°C. Se testó la actividad enzimática para la fosfatasa alcalina usando Alkaline phosphatase detection kit (Merck-Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron fotografías de la tinción resultante en el Microdisector Láser Zeiss PALM Microbeam (Zeiss).

3.1.3.7. Ensayos de diferenciación *in vitro* (EBs)

La capacidad de diferenciación *in vitro* de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 a las tres capas germinales embrioides es testada por la generación espontánea de EBs. Cuando el cultivo celular alcanzó una confluencia del 60-70%, se añadió Matrigel 1:6 diluido en KO-DMEM (Life Technologies) al medio de cultivo. Al día siguiente, el cultivo celular fue disociado empleando Collagenase IV (Gibco) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, las colonias fueron levantadas suavemente y cultivadas en placas de 6 pocillos de baja adherencia (Corning) en medio esencial 6 (E6) para inducir la formación de EBs. Se realizaron cambios de medio cada 2 días. Tres semanas después, los EBs fueron colectados, embebidos en parafina y seccionados para la realización de análisis histológicos e inmunocitoquímicos.

Se realizó una tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) para el análisis histológico. Y una tinción con marcadores específicos de las 3 capas germinales para el análisis inmunocitoquímico, se utilizó β -III-tubulina como marcador de ectodermo, vimentina como marcador de mesodermo y citoqueratina (CKAE1-EA3) como marcador de endodermo.

3.1.3.8. Ensayos de diferenciación *in vivo* (Teratomas)

Para testar la capacidad de diferenciación *in vivo* de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 realizamos ensayos de formación de teratomas.

Las células fueron disociadas empleando Collagenase IV (Gibco) y resuspendidas en PBS suplementado con 30% Matrigel. Se inyectaron subcutáneamente 2×10^6 células en los flancos dorsales de ratones NOD/LtSz-scid interleukin-2Ry-/- (The Jackson Laboratory). El crecimiento de los teratomas fue supervisado semanalmente y a las 10 semanas post-implantación, se colectaron los teratomas, se fijaron en formaldehído, se incluyeron en parafina y se seccionaron para su posterior análisis histológico y tinción inmunocitoquímica.

Para el análisis histológico, se procedió a la tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) y para estudiar la diferenciación a las 3 capas germinales se tiñeron con β -III-tubulina (ectodermo), vimentina (mesodermo) y CKAE1-EA3 (endodermo)⁵¹⁰. Para complementar el análisis con los marcadores específicos de cada capa germinal se incluyen estructuras específicas de endodermo, mesodermo y ectodermo. El Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEAA) de la Universidad de Granada aprobó todos los protocolos empleados en animales.

3.2. Validar el rescate génico del modelo humano del Síndrome de Bernard-Soulier (BSS) previamente generado por células primarias de pacientes de dicha enfermedad.

3.2.1. Cultivo celular de las líneas hiPSC

Las líneas celulares iBOB/A1ATD, BSS2-PBMC-iPS4F24-EV/BSS2 EV y BSS2-PBMC-iPS4F24-GP9/BSS2 GP9 fueron cultivadas en medio E8 en frascos t25 recubiertos de Matrigel a una dilución 1:20 en KO-DMEM. Semanalmente, las células fueron sub-cultivadas utilizando PBS-EDTA 0.5 mM.

La generación y descripción de la línea iBOB usada como control sano está reportada por Yusa *et al*⁵¹¹.

Las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 se obtuvieron por la transducción lentiviral de la línea original BSS2-PBMC-iPS4F24⁶⁶ y clonadas en el vector pRRL-EF1α-PGK-NEO (Figura 48). Metodología de clonación y transducción descrita anteriormente.

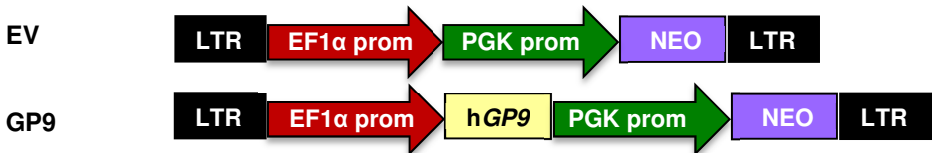


Figura 48. Esquema representativo de la construcción del vector control (EV) y el vector que expresa la copia silvestre de *GP9* en la línea BSS2-PBMC-iPS4F24.

3.2.2. Análisis de expresión de *GP9*

Para comprobar la expresión ectópica de la copia silvestre del gen *GP9* por transducción lentiviral se aisló el ARN total de las líneas celulares BSS2 EV y BSS2 GP9 usando High pure RNA isolation kit (Roche). Posteriormente, partiendo de 1µg de ARN, se generó ADNc usando Transcription First Strand c-DNA synthesis kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos resultantes de la PCR fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa para determinar la expresión de *GP9* en la línea BSS2 GP9. Se utilizó β-Actin como control endógeno. La secuencia de *primers* utilizados se muestra en la Tabla 3.2.2.

Tabla 3.2.2. Lista de primers empleados para la detección de *GP9*

Primer	Secuencia (5'-3')
β-ACTIN Fw	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
β-ACTIN Rv	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
GPIX Fw	CAGAGGCGCAGATAGGTGAG
GPIX Rv	GCCAACAACAGCCTTGAGTC

3.2.3. Análisis de pluripotencia

En primer lugar, se estudió la expresión endógena de los genes de pluripotencia *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG* de las líneas hiPSC por RT-PCR. Metodología y lista de *primers* descritos anteriormente.

Por otra parte, se comprobó la pluripotencia de las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 a nivel de proteína, mediante tinción con los anticuerpos de superficie SSEA3 (PE, BioScience), SSEA4 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen), Tra1-60 (PE, BioScience) y Tra1-81 (Alexa Fluor® 647, BD Pharmingen). La expresión de estos marcadores se analizó por citometría de flujo, usando el citómetro BD FACS Verse (BD Bioscience). Los datos resultantes se analizaron usando FlowJo™ software (FlowJo, LLC-BD Bioscience). Procedimiento descrito anteriormente.

3.2.4. Diferenciación a células de linaje megacariocítico

Para validar el modelo celular de BSS rescatado por terapia génica se llevó a cabo una diferenciación celular a megacariocitos. Con el fin de optimizar la generación a megacariocitos, empleamos un protocolo libre de suero y componentes animales, más actual y de mayor eficiencia al utilizado en la sección anterior. Este protocolo descrito recientemente por Moreau *et al*³⁸⁰ se basa en la diferenciación de hiPSC a megacariocitos mediante la expresión ectópica de GATA1, FLI1 y TAL1. Estos TF son imprescindibles en el proceso de megacariopoyesis, regulan tanto la formación como la maduración de los megacariocitos.

Las líneas iBOB, BSS2 EV y BSS2 GP9 se cultivaron en medio E8 y cuando alcanzaron una confluencia del 80% se disociaron usando Tryple Express (Life Technologies) y se colectaron mediante centrifugación a 300g 5 minutos. Se determinó su número celular mediante conteo en una cámara de Neubauer. Se cultivaron 40.000 células/pocillo en placas de cultivo celular de 12 pocillos (Corning) recubiertas con vitronectina (Gibco) en medio E8 con 10uM Y27632 (Selleckchem) a 37°C. Al día siguiente, las células fueron transducidas con el vector lentiviral (Vectalys) que expresa conjuntamente GATA1, FLI1 y TAL1 utilizando un MOI 80 para la transducción viral. Las células se cultivaron en medio E8 suplementado con 20 ng/mL FGF2 (Peprotech), 10 ng/mL BMP4 (Peprotech) y 10 ng/mL sulfato de protamina (Sigma Aldrich) para aumentar la eficiencia de transducción lentiviral.

A día 1, se realizó un lavado de virus y las células se cultivaron en medio E8 suplementado con 20 ng/mL FGF2 y 10 ng/mL BMP4 para inducir la diferenciación a mesodermo. A día 2, se induce la diferenciación a linaje megacariocítico realizando el cambio de medio a CellGRO SCGM (CellGenix) suplementado con 20 ng/mL TPO (Peprotech) y 25 ng/mL SCF (Peprotech). A día 5, se añadió al cultivo celular medio CellGRO con 40 ng/mL TPO y 50 ng/mL SCF. A día 8, se realizó un cambio de la mitad del medio de cultivo completando el volumen con medio CellGRO suplementado con 40 ng/mL TPO y 50 ng/mL SCF.

A día 9, parte del cultivo celular fue disociado con Tryple Express para analizar marcadores de superficie celular específicos de hematopoyesis y del linaje de

megacariocitos mediante tinción con los anticuerpos anti-CD34 (PECy7, BD Bioscience), anti-CD41a (PE, BD Bioscience) y anti-CD42a/GPIX (APC, BD Bioscience). Las poblaciones celulares se analizaron en el citómetro BD FACS Verse (BD Bioscience) y los datos resultantes con FlowJo™ software (FlowJo, LLC-BD Bioscience). Procedimiento de análisis ya descrito anteriormente. El resto del cultivo celular se trasladó a placas de cultivo de 6 pocillos (Corning) sin recubierta de vitronectina, en medio CellGRO suplementado con 20 ng/mL TPO y 25 ng/mL SCF.

Los días 12, 14 y 18 del cultivo celular se realizaron cambios de ½ medio de cultivo, completando con medio fresco CellGRO con 40 ng/mL TPO y 50 ng/mL SCF. El cultivo celular debe mantenerse a una concentración de 0.5×10^6 células/mL.

A día 20, las células se colectaron por centrifugación a 120g 8 minutos y se volvieron a teñir con los marcadores celulares CD34, CD41a y CD42a para su análisis por citometría de flujo. Por otra parte, se realizó un cambio de medio completo al resto del cultivo celular, que se mantuvo hasta día 30 con cambios de ½ medio cada 2 días y análisis por citometría de flujo a día 26 y 30 (Figura 49).

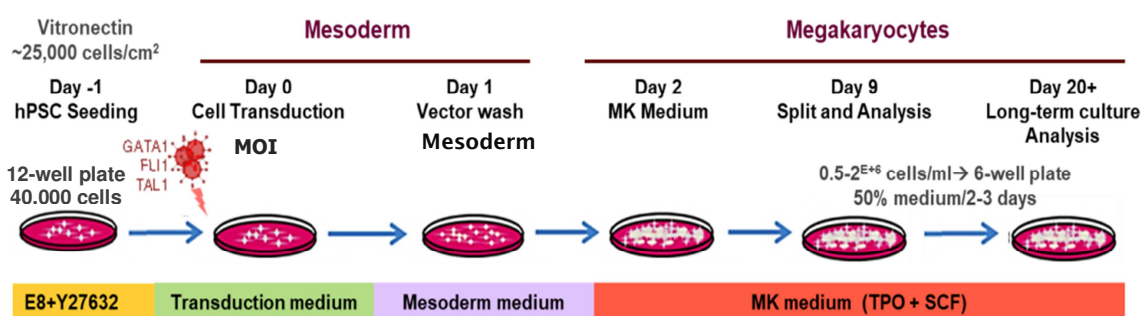


Figura 49. Protocolo de diferenciación a megacariocitos a partir de hiPSC.

3.2.5. Técnica ImageStream

Es una técnica que combina visualización de imagen, como una microscopía estándar a la vez que permite ver células marcadas con los anticuerpos de interés, como una citometría. Fue utilizada para visualizar la expresión de la proteína GPIX durante la diferenciación a megacariocitos.

A día 20 del protocolo de diferenciación a megacariocitos, las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 fueron disociadas empleando Tryple Express (Life Technologies) y lavados con PBS 5% FBS por centrifugación a 120g 8 minutos. La suspensión celular fue teñida con los marcadores de superficie anti-CD41a (PE, BD Bioscience) y anti-CD42a (APC, BD Bioscience) durante 15 minutos en oscuridad. Tras la incubación, las células se lavaron con PBS 5% FBS y se resuspendieron en 1:1000 Hoescht 1mM para la tinción nuclear. Tras 2 minutos de tinción en oscuridad, se lavaron con PBS 5% FBS y se resuspendieron en 50ul PBS 5% FBS. Las muestras se analizaron mediante Amnis ImageStream^X Mk II Imaging Flow Cytometer (Luminex Corporation). Los datos resultantes se analizaron usando IDEAS® Analysis Software (Luminex Corporation).

3.2.6. Análisis estadístico

Los datos han sido representados como la media $\pm$ SEM. El análisis estadístico se ha realizado respecto al control del paciente de BSS (BSS2 EV) mediante un ANOVA de dos vías complementándose con el test de comparación múltiple de Bonferroni. Valores de $p < 0.05$ se han considerado estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Objetivo 1. Estudiar el papel de RUNX1 en el desarrollo de la hematopoyesis humana empleando hPSC como modelo de estudio.

RUNX1 es un regulador clave del desarrollo de las células hematopoyéticas a partir del endotelio hemogénico¹⁵⁰. El papel de RUNX1 durante la hematopoyesis derivada de hESC ha sido muy estudiado en nuestro laboratorio, en concreto la isoforma *RUNX1c*²⁴⁴. En este proyecto se pretende ampliar el estudio del papel regulador de RUNX1 analizando la función de las isoformas más importantes de RUNX1.

1. Analizar la función de las isoformas del gen *RUNX1* durante la diferenciación hematopoyética

Para este estudio hacemos uso de un sistema de diferenciación hematopoyética basado en el cultivo de hiPSC que expresan de forma ectópica *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c*, en un medio definido en combinación con diferentes citoquinas hematopoyéticas²²⁵.

Previamente a la generación de células hematopoyéticas derivadas de las líneas hiPSC con sobre-expresión de las isoformas de RUNX1, se procedió a analizar la expresión ectópica de las diferentes isoformas de RUNX1.

1.1. Análisis de la expresión ectópica de las isoformas del gen *RUNX1*

Mediante la utilización de un set de *primers* que reconoce una zona común a las 3 isoformas del gen *RUNX1* mediante la técnica qPCR analizamos la expresión génica de estas isoformas.

La figura 50 muestra la estructura del gen humano *RUNX1* y de las isoformas *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c*. Se ha representado la localización del set de *primers* utilizado (señalizado mediante flechas rojas en el *locus RUNX1*) para analizar la expresión de las diferentes isoformas de *RUNX1*.

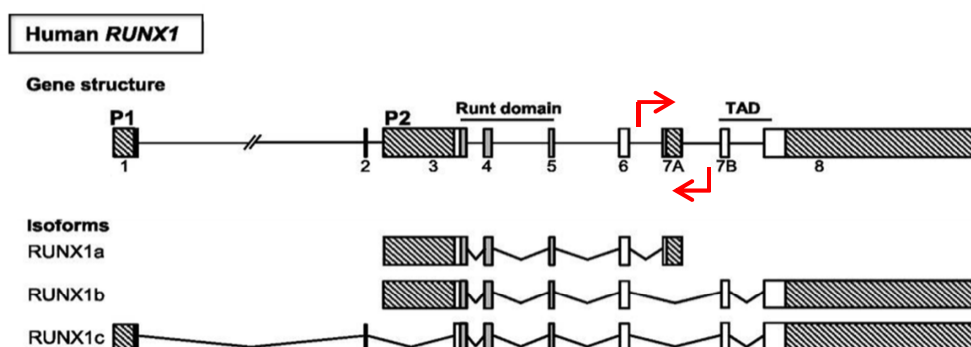


Figura 50. Diseño del análisis de la expresión ectópica de las isoformas del gen *RUNX1*. Esquema representativo de la estructura del *locus RUNX1* y de las isoformas *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c*. La localización del set de *primers* utilizado para la qPCR se muestra con flechas rojas.

La figura 51 representa la expresión de ARNm de las isoformas del gen *RUNX1* en las líneas hiPSC con respecto al control. Podemos observar como la isoforma *RUNX1a* presenta una mayor expresión ($p<0.001$) con respecto a las isoformas *RUNX1b* y *RUNX1c* ($p<0.05$).

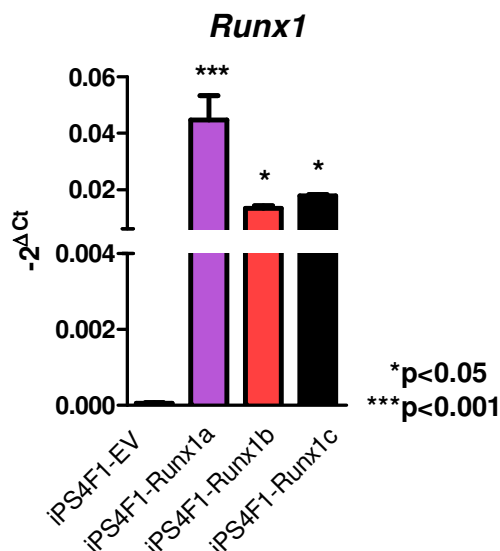


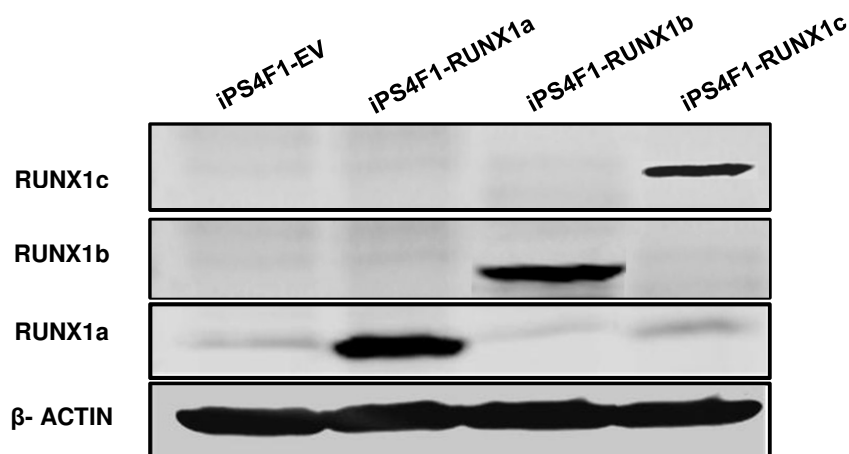
Figura 51. Análisis de la expresión ectópica de las isoformas del gen *RUNX1*. Expresión génica de las isoformas *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c* en las diferentes líneas celulares generadas. Se ha usado *GAPDH* como control interno. *RUNX1a* muestra una mayor expresión respecto al control, en comparación con las isoformas *RUNX1b* y *RUNX1c*. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

1.2. Expresión proteica de las isoformas del gen *RUNX1*

Tras comprobar la expresión ectópica de las diferentes isoformas de *RUNX1* a nivel de ARNm, realizamos un Western Blot para verificar la expresión proteica de dichas isoformas. Utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo anti-RUNX1 para detectar las proteínas de las isoformas del gen *RUNX1* y como control de carga utilizamos la proteína β -Actina. Los resultados fueron obtenidos usando el sistema de imagen infrarrojo Odyssey (Li-cor Bioscience) (Figura 52A).

Para complementar los datos obtenidos por western blot, realizamos una cuantificación relativa de la expresión proteica de las isoformas de RUNX1 correspondiente a 3 experimentos diferentes (Figura 52B). Observamos resultados equivalentes a la imagen obtenida por western blot y a la expresión génica analizada anteriormente. La proteína RUNX1a se expresa en mayor medida con respecto al control ($p<0.001$), en comparación con las proteínas RUNX1b ($p<0.01$) y RUNX1c ($p<0.05$).

A



B

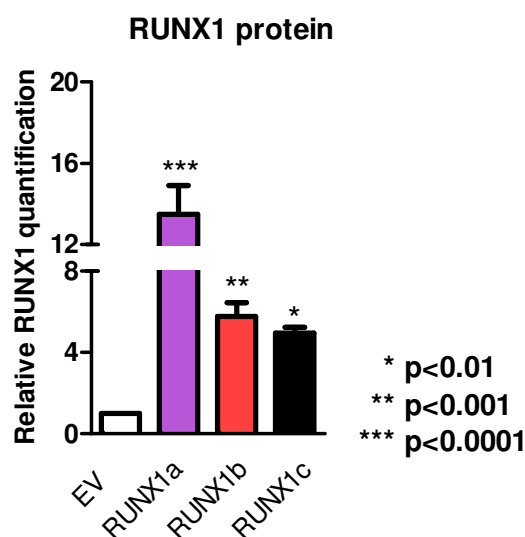


Figura 52. Expresión proteica exógena de las isoformas de RUNX1 mediante western blot. A. Imagen representativa de la expresión proteica de *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c* obtenida por western blot. B. Cuantificación relativa de las proteínas RUNX1a, RUNX1b y RUNX1c. Los datos muestran que la proteína RUNX1a se expresa en mayor medida que las proteínas RUNX1b y RUNX1c. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

1.3. Expresión de los genes de pluripotencia

La pluripotencia es una característica esencial que permite la diferenciación de las hPSC a cualquier linaje celular. Una vez analizada la expresión ectópica y proteica de las diferentes isoformas de RUNX1, que confirma que la transducción lentiviral ha sido eficiente, se procedió a analizar la pluripotencia de las líneas hiPSC, tanto por RT-PCR para confirmar la presencia de genes endógenos de pluripotencia como a nivel de proteína mediante citometría de flujo.

Por un lado, analizamos la expresión endógena de los TF de pluripotencia OCT3/4, SOX2, REX1 y NANOG por RT-PCR. Posteriormente, los productos resultantes fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa. La imagen resultante de la detección de los genes endógenos de pluripotencia muestra expresión de todos los genes analizados en las líneas hiPSC (Figura 53).

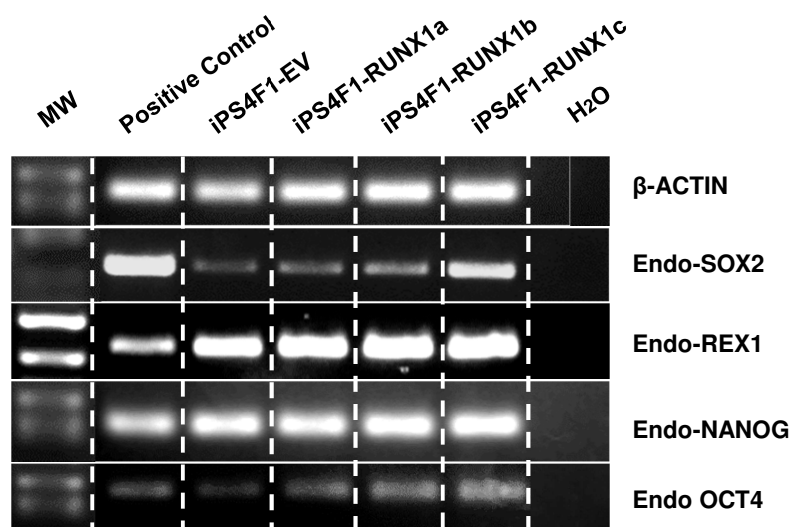


Figura 53. Pluripotencia de las líneas hiPSC que sobre-expresan las isoformas de *RUNX1* por RT-PCR. Todas las líneas expresan los genes de pluripotencia *SOX2*, *REX1*, *NANOG* y *OCT4*.

Por otra parte, mediante citometría de flujo, estudiamos la pluripotencia a nivel de proteína de las diferentes líneas hiPSC con expresión de *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c*. Se emplearon los anticuerpos de superficie SSEA3 PE, SSEA4 APC, Tra1-60 PE, Tra1-81 APC y OCT3/4 FITC. Los gráficos obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante FlowJo software muestran una expresión mayor del 80% de los marcadores de pluripotencia analizados en todas las líneas hiPSC, excepto SSEA3 que presenta una expresión menor del 50% en la mayoría de los casos (Figura 54).

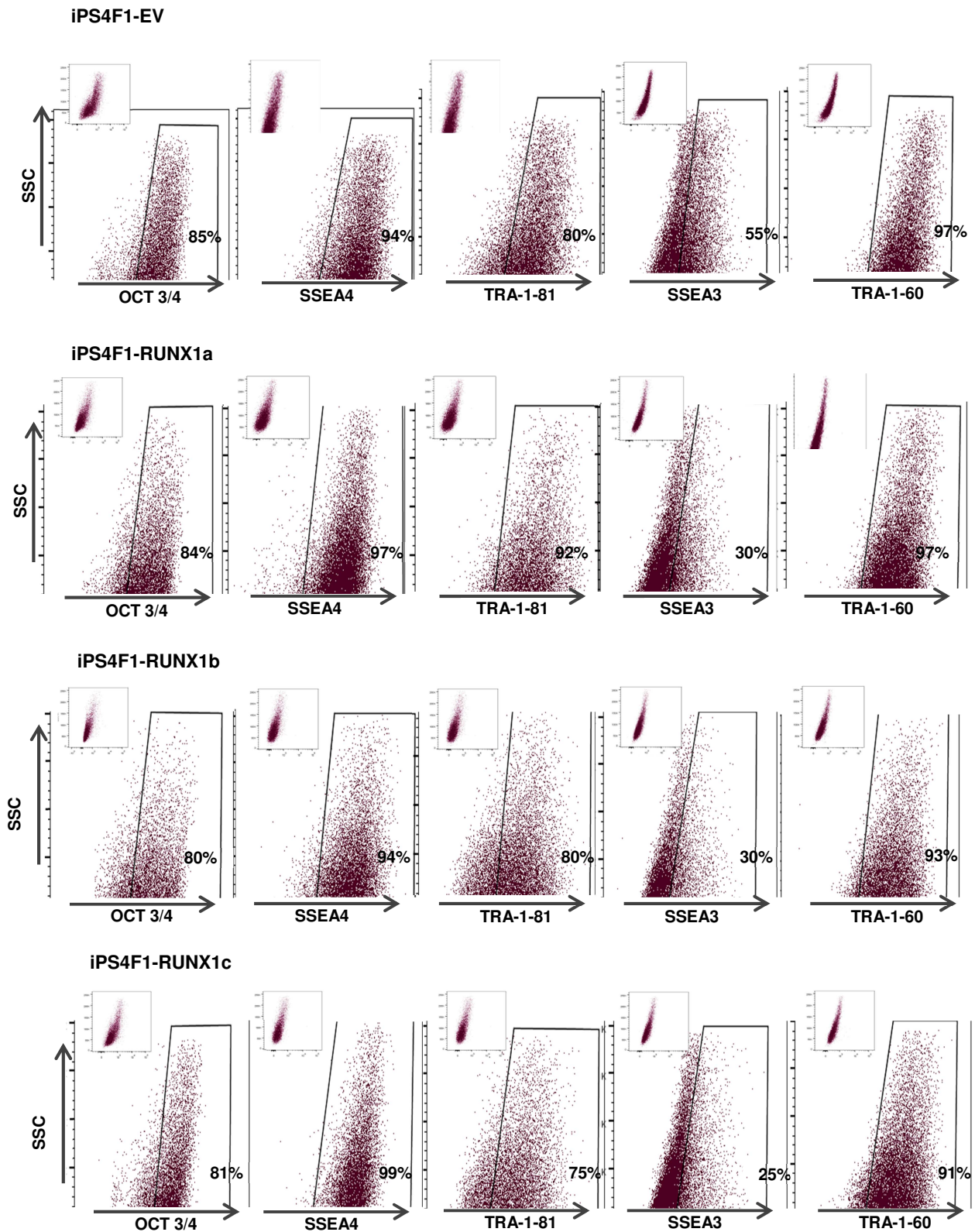


Figura 54. Panel de expresión de los factores de pluripotencia a nivel de proteína de las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c por citometría de flujo. Todas las líneas muestran un porcentaje mayor del 80% en la expresión de OCT3/4, SSEA4, TRA-1-81 y TRA-1-60, excepto para SSEA3 cuya expresión es menor del 50% en iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c.

1.4. Diferenciación hematopoyética

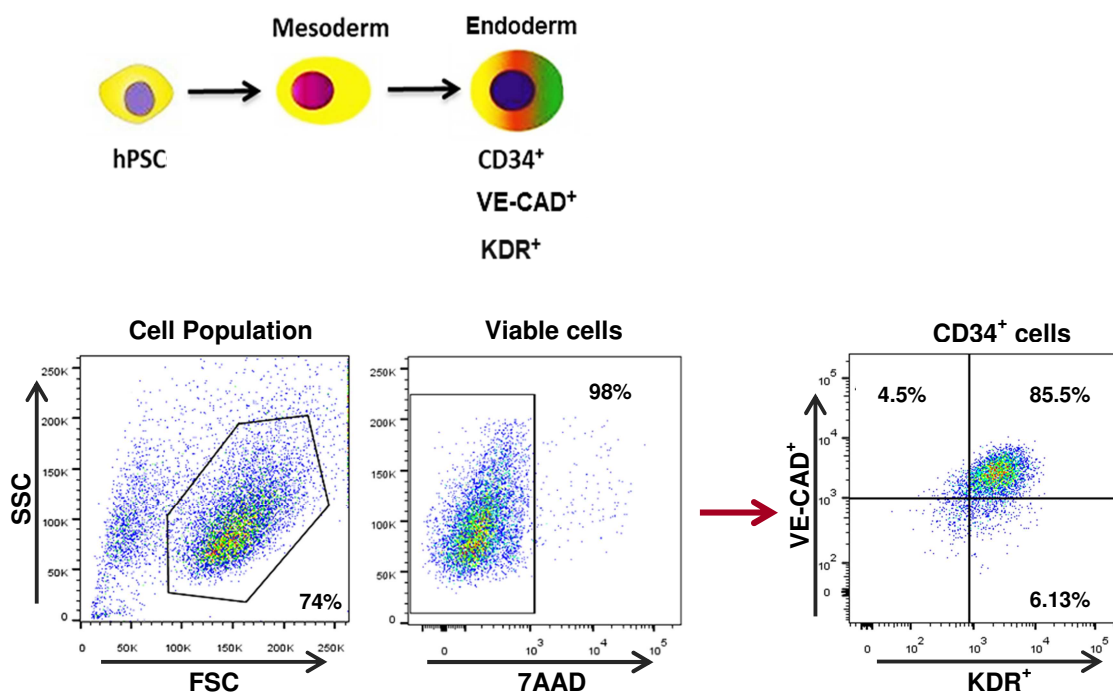
Para llevar a cabo la diferenciación hematopoyética de las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c empleamos un protocolo de diferenciación en un medio definido en combinación con diferentes citoquinas hematopoyéticas²²⁵. Cultivamos las hiPSC y analizamos a día 5, 8, 11 y 15 mediante citometría de flujo la aparición de progenitores endoteliales ($CD34^+VE-CAD^+KDR^+$), de HEP ($CD34^+CD43^+$), que sería el equivalente *in vitro* al endotelio hemogénico *in vivo*, y de progenitores hematopoyéticos ($CD41a^+CD45^+$ y $CD41a^+CD235a^+$), además de realizar a día 8 ensayos de CFU hematopoyéticas.

1.4.1. Obtención de progenitores endoteliales

La figura 55A muestra un diagrama representativo de la formación de células progenitoras endoteliales $CD34^+VE-CAD^+KDR^+$ a partir del cultivo de hPSC y gráficos de puntos mostrando el análisis por citometría de flujo de la población celular que origina los progenitores endoteliales $CD34^+VE-CAD^+KDR^+$.

A continuación, representamos la cinética de obtención de los progenitores endoteliales de iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c durante los días 5, 8, 11 y 15 (Figura 55B). A día 5, observamos un porcentaje elevado, por encima del 80%, de todas las isoformas de *RUNX1*. A partir de día 5, la obtención de estos progenitores disminuye, de igual manera que en la hematopoyesis humana cuando las células se diferencian a células hematopoyéticas terminales. La formación de los progenitores endoteliales de iPS4F1-RUNX1a y iPS4F1-RUNX1c es aún más baja a día 11 y 15, con respecto al resto de líneas celulares, lo que sugiere que estas líneas presentan una diferenciación hematopoyética más avanzada con respecto a la línea iPS4F1-RUNX1b.

A



B

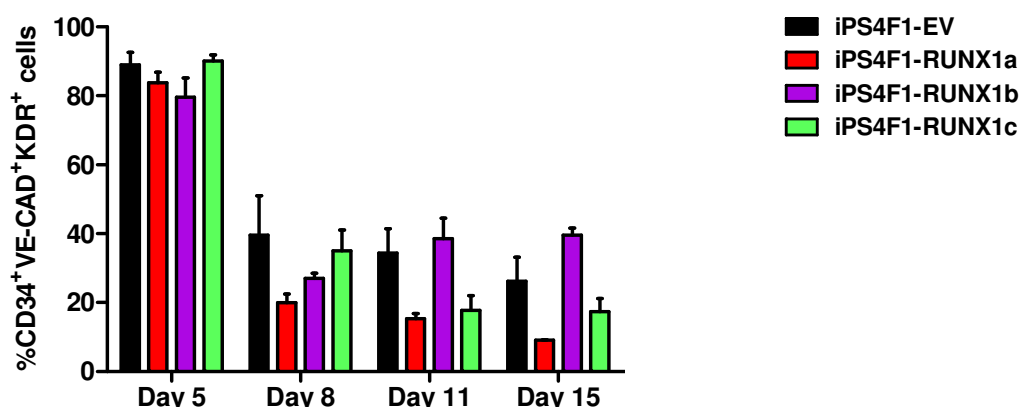


Figura 55. Análisis de los progenitores endoteliales de las líneas iPS4F1 con sobre-expresión de las isoformas del gen *RUNX1*. A. Esquema representativo de la formación de células endoteliales a partir de hPSC y gráficos representativos de la población celular, la viabilidad y los marcadores endoteliales (CD34⁺VE-CAD⁺KDR⁺) obtenidos por citometría de flujo. B. Cinética de obtención de los progenitores endoteliales a lo largo de la diferenciación. A día 5 el porcentaje de progenitores CD34⁺VE-CAD⁺KDR⁺ es mayor al 80%. En cambio, a partir de día 5, la formación de los progenitores disminuye, simulando lo que ocurre en la hematopoyesis humana. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

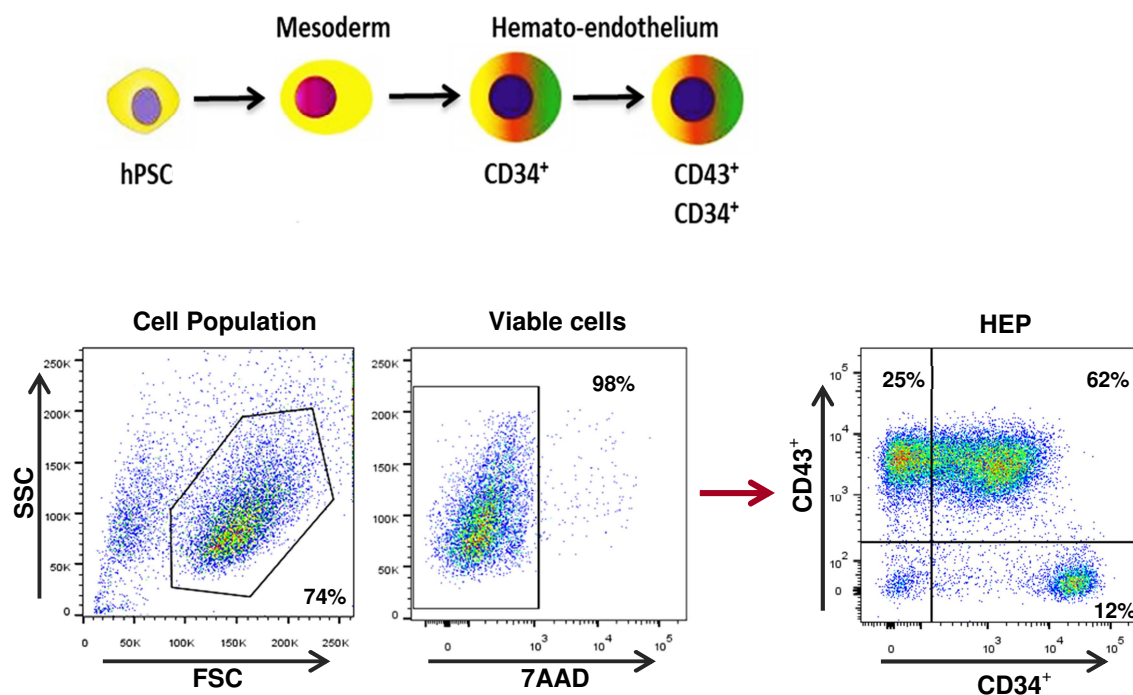
1.4.2. Obtención de progenitores hemato-endoteliales (HEP)

Tras la aparición de los progenitores endoteliales derivados de hPSC, se inicia la formación de células HEP (CD34⁺CD43⁺), que posteriormente originará progenitores hematopoyéticos.

La figura 56A muestra un esquema representativo de la formación de HEP a partir del cultivo de hPSC y gráficos de puntos de la población celular y la obtención de células CD34⁺CD43⁺ por citometría de flujo.

Cuando analizamos la cinética de obtención de los HEP en las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c desde el día 5 al 15, observamos como la línea celular iPS4F1-RUNX1a incrementa la producción de HEP durante toda la diferenciación respecto al control, alcanzando una mayor producción significativa a día 11 ($p < 0.05$). En cambio, las líneas iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c incrementan la formación de HEP a días tempranos de la diferenciación respecto al control, pero a partir de día 11 mantienen una patrón similar a la línea control iPS4F1-EV (Figura 56B).

A



B

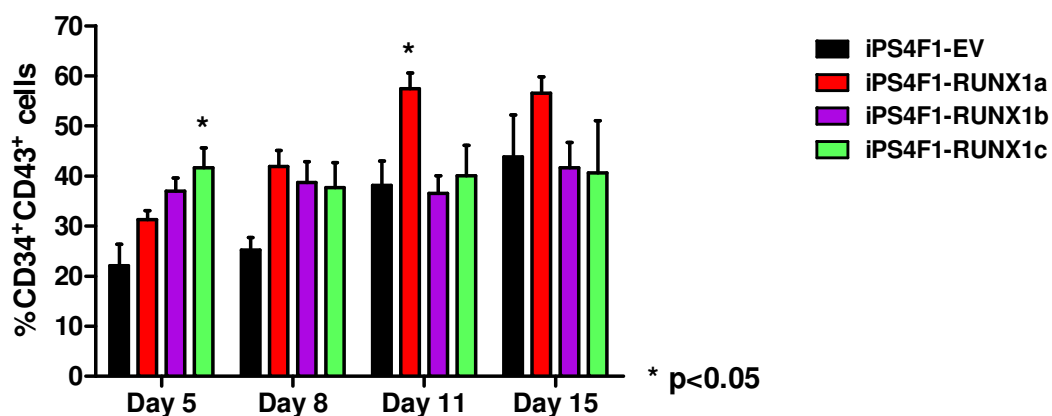


Figura 56. Análisis de HEP en las líneas iPS4F1 con expresión ectópica de las isoformas del gen *RUNX1*. A. Esquema representativo de la formación de HEP a partir de hPSC y gráficos representativos de la población celular, la viabilidad celular y las células CD34⁺CD43⁺ obtenidas por citometría de flujo. B. Cinética de obtención de los HEP a lo largo de la diferenciación. La línea iPS4F1-RUNX1a produce mayor cantidad de HEP durante la diferenciación respecto al control. Sin embargo, las líneas iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c presentan una mayor formación de HEP a días tempranos de la diferenciación. A partir de día 11, la obtención de HEP es similar al control. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

1.4.3. Formación de progenitores hematopoyéticos

Tras la generación de HEP se lleva a cabo la formación de progenitores hematopoyéticos que dará lugar a la generación de células hematopoyéticas terminales. Estos progenitores comienzan a aparecer a día 8 del protocolo de diferenciación. El progenitor bipotente $CD41a^+CD235a^+$ formará células de linaje eritroide ($CD235a^+$) y células de linaje megacariocítico ($CD41a^+$). En cambio, el progenitor hematopoyético $CD41a^+CD45^+$ originará el resto de células mieloides y linfoides.

La figura 57 muestra un diagrama de la formación de los progenitores hematopoyéticos derivados del cultivo de hPSC y gráficos representativos de la población celular y la obtención de células $CD41a^+CD45^+$ y $CD41a^+CD235a^+$ obtenidas por citometría de flujo.

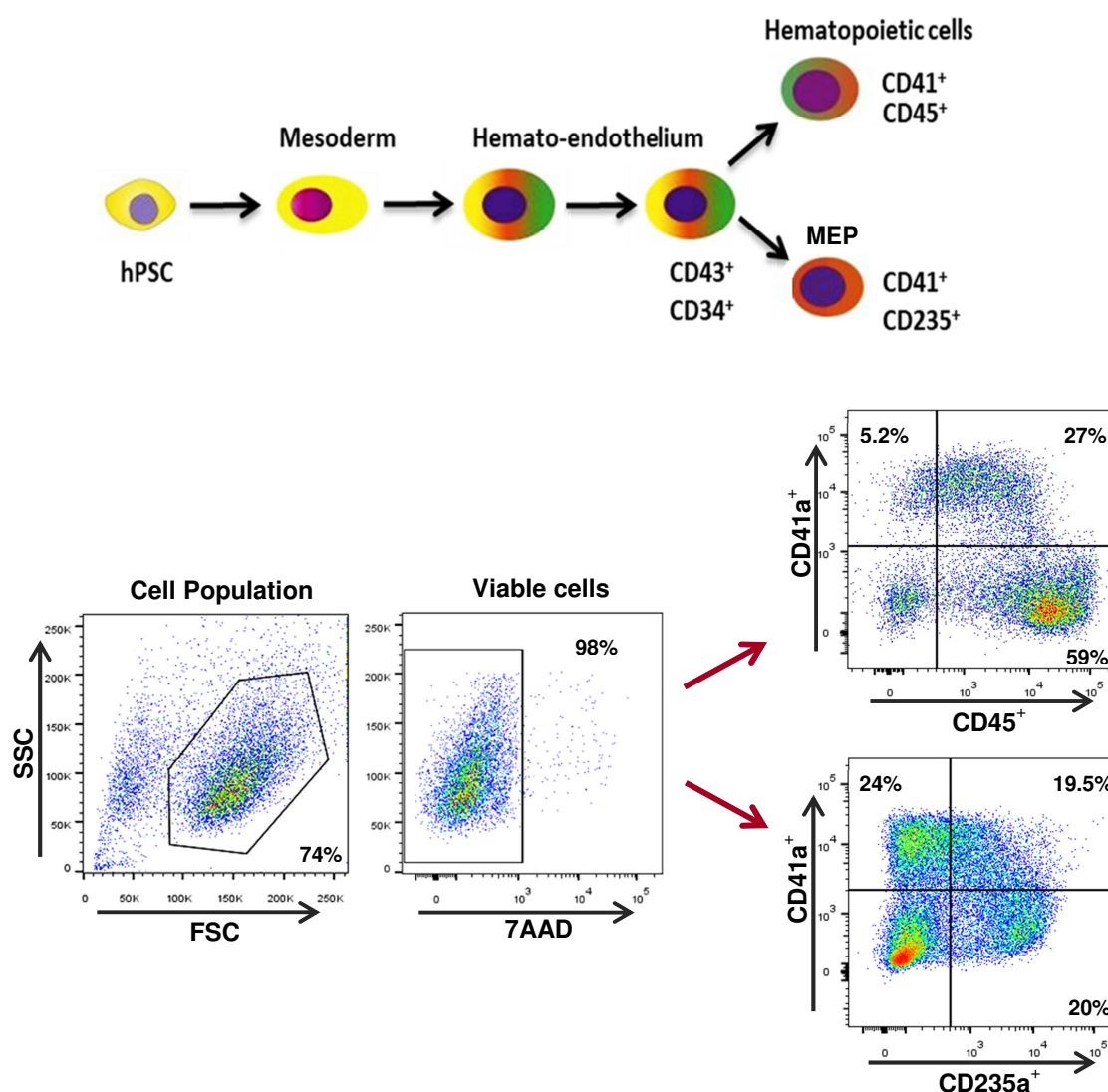


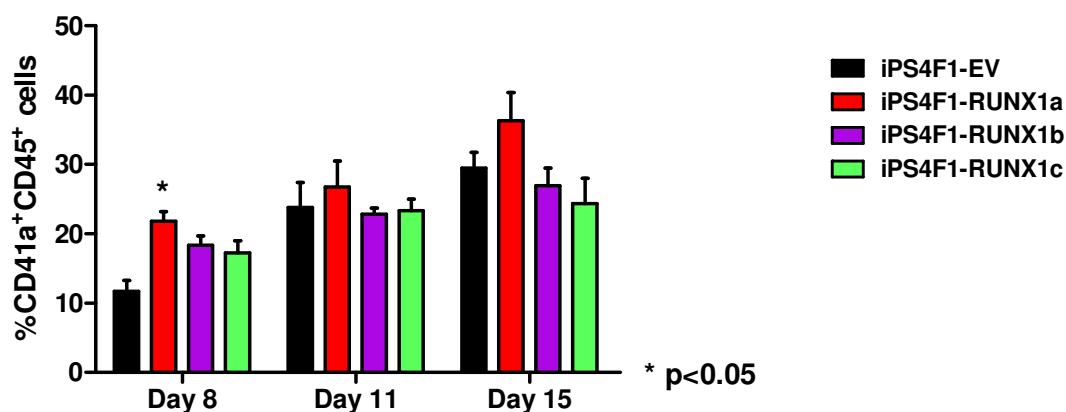
Figura 57. Esquema representativo de la formación de células hematopoyéticas derivadas del cultivo de hPSC y gráficos representativos de la formación de células $CD41a^+CD45^+$ y $CD41a^+CD235a^+$ obtenidas por citometría de flujo.

La figura 58A representa la cinética de formación de las células hematopoyéticas CD41a⁺CD45⁺ y la figura 58B la cinética de obtención de las células CD41a⁺CD235a⁺ derivadas de las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c durante los días 8, 11 y 15.

Con respecto a las células CD41a⁺CD45⁺, observamos que la isoforma *RUNX1a* incrementa la producción de los progenitores hematopoyéticos CD41a⁺CD45⁺ a lo largo de la diferenciación respecto al control, siendo significativa ($p < 0.05$) a día 8. En cambio, las isoformas *RUNX1b* y *RUNX1c* producen un mayor incremento de estos progenitores a días tempranos de la diferenciación con respecto al control, siendo mayor a día 11.

Por otra parte, cuando analizamos los MEP, observamos que la isoforma *RUNX1a* y *RUNX1c* producen una mayor cantidad de estos progenitores a días tempranos de la diferenciación respecto al control, siendo significativa ($p < 0.001$) a día 8, pero a días tardíos reducen la formación de MEP de forma significativa (iPS4F1-RUNX1a con un $p < 0.05$ y iPS4F1-RUNX1c con un $p < 0.01$) respecto a la línea control. La isoforma *RUNX1b*, a días tempranos de la diferenciación no produce ningún efecto respecto al control, pero a días tardíos disminuye la producción de estos progenitores, siendo significativa esta reducción a días 11 ($p < 0.01$) y 15 ($p < 0.001$) respecto al control.

A



B

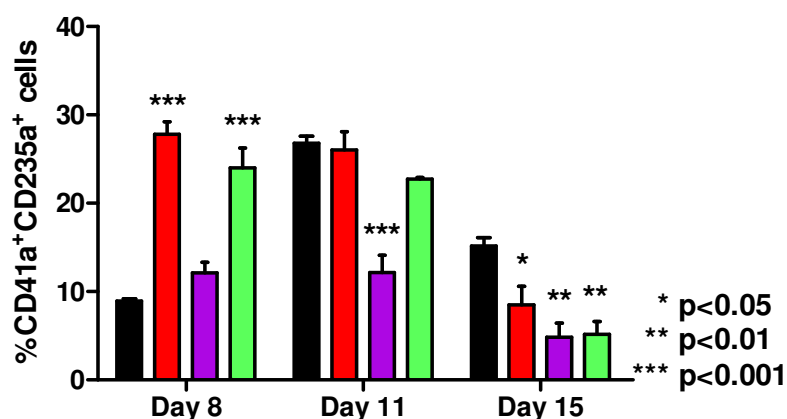


Figura 58. Análisis de progenitores hematopoyéticos de las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c. A. Cinética de obtención de las células progenitoras hematopoyéticas CD41a⁺CD45⁺ a lo largo de la diferenciación. B. Cinética de formación de los MEP a lo largo de la diferenciación. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Durante la diferenciación a células hematopoyéticas realizamos ensayos de CFU a día 8 de las diferentes líneas de hiPSC para estudiar la capacidad clonogénica de los progenitores hematopoyéticos a lo largo de la diferenciación.

1.4.4. Ensayos de CFU hematopoyéticos

A día 8 de la diferenciación hematopoyética se colectaron las células $CD34^+CD43^+CD41^+$ procedentes del cultivo y se sembraron en medio semisólido MethoCult™ SF H4436 para inducir la formación de colonias hematopoyéticas. A partir de 10 días de cultivo celular comenzaron a aparecer las primeras CFU correspondientes a las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c. El reconocimiento de la estructura y morfología de los distintos tipos de CFU obtenidos se evaluó siguiendo los criterios de la guía *Atlas of Human Hematopoietic Colonies*, Stem Cell Technologies⁵⁰³.

La figura 59 muestra fotografías representativas por microscopía óptica de los diferentes tipos de CFU obtenidos durante el cultivo celular:

- CFU-G, colonias pequeñas formadas por células individuales y de color oscuro.
- CFU-M, colonias formadas por células individuales más grandes y de color brillante.
- CFU-GM, presentan una morfología similar a la descrita anteriormente para las colonias G y M.
- CFU-E, colonias pequeñas, normalmente no pueden distinguirse células individuales y adquieren un color rojizo por la hemoglobinización de los eritroblastos.

Las colonias GM están originadas por progenitores bipotentes, pueden dar lugar tanto a colonias M como a colonias G, por tanto son más primitivas que las colonias G, M y E que revelan la presencia de progenitores más comprometidos, con potencialidad unilíneal exclusivamente.

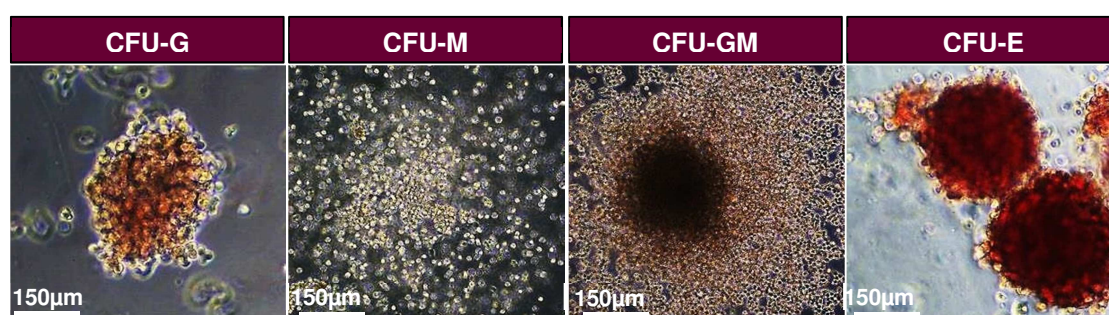


Figura 59. Ensayos de formación de colonias hematopoyéticas a partir de hiPSC. Imágenes representativas de las colonias hematopoyéticas obtenidas por microscopía óptica.

Además, representamos el conteo celular de las colonias hematopoyéticas obtenidas en el cultivo de metilcelulosa (Figura 60). Observamos que las isoformas de *RUNX1* presentan distintos potenciales clonogénicos. La isoforma *RUNX1a* reduce la formación de colonias hematopoyéticas respecto al control. El tipo de colonias predominantes en esta isoforma son las colonias M. Sorprendentemente, la isoforma *RUNX1b* no produce progenitores capaces de formar colonias hematopoyéticas, llegando a ser significativo este resultado ($p < 0.05$). En cambio, la isoforma *RUNX1c* incrementa significativamente ($p < 0.05$) la producción de CFU respecto al control. El tipo de colonias predominantes en esta isoforma son las colonias mixtas GM y las colonias M, respecto al control.

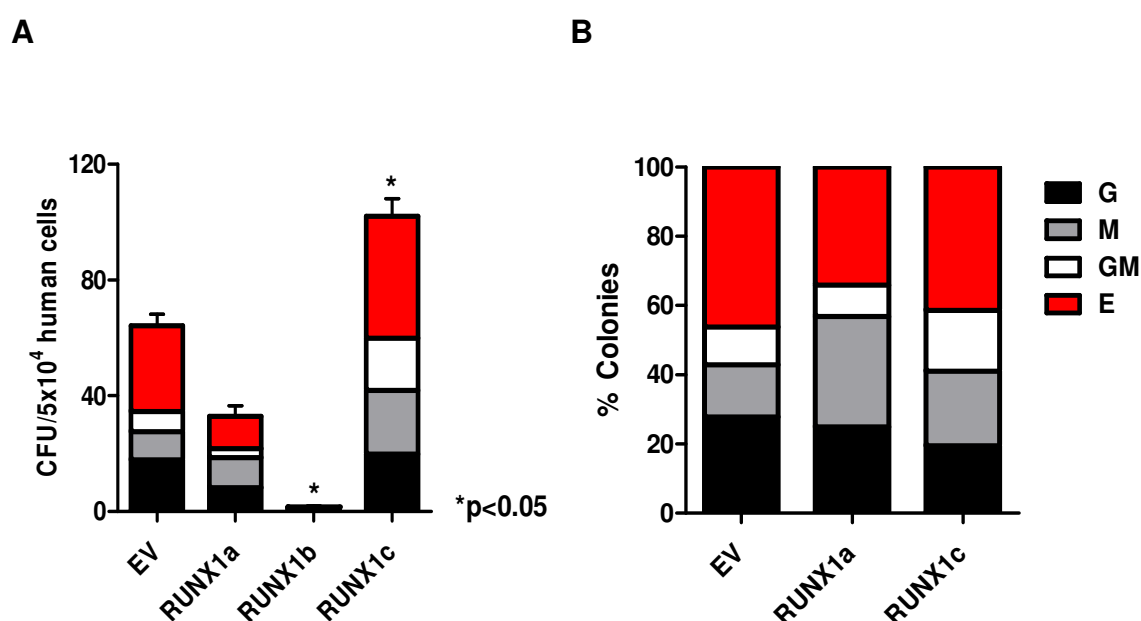


Figura 60. Ensayos funcionales de los progenitores hematopoyéticos derivados de las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c. La formación de CFU en iPS4F1-RUNX1a es menor al control. De manera sorprendente, la línea iPS4F1-RUNX1b no fue capaz de generar colonias hematopoyéticas. Sin embargo, la línea iPS4F1-RUNX1c originó una mayor cantidad de CFU respecto al control. A. Representación gráfica del conteo celular de CFU. B. Distribución en porcentaje de los diferentes tipos de colonias hematopoyéticas en las líneas iPS4F1-EV, iPS4F1-RUNX1a y iPS4F1-RUNX1c. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Objetivo 2. Optimizar la generación de células hematopoyéticas de linaje megacariocítico mimetizando el ambiente fisiológico de médula ósea empleando hPSC.

En primer lugar, se realizaron análisis de pluripotencia de las líneas H9 Neo y AND1 SCL por citometría de flujo para confirmar que estas líneas mantenían su característica de pluripotencia y poder diferenciarlas posteriormente a células de linaje megacariocítico.

2.1. Análisis de pluripotencia

Para comprobar la pluripotencia de las líneas hESC, H9 y AND1 SCL, se estudió la expresión de los marcadores celulares de pluripotencia mediante citometría de flujo. Para ello, se utilizaron los anticuerpos de superficie SSEA3 PE, SSEA4 APC, Tra1-60 PE y Tra1-81 APC. Los datos obtenidos tras el análisis muestran una expresión mayor del 80% para los marcadores de pluripotencia SSEA4 APC, Tra1-60 PE y Tra1-81 APC en ambas líneas celulares. En cambio, para el marcador SSEA3 PE la expresión es de un 40% en H9 y de un 45% en AND1 SCL (Figura 61).

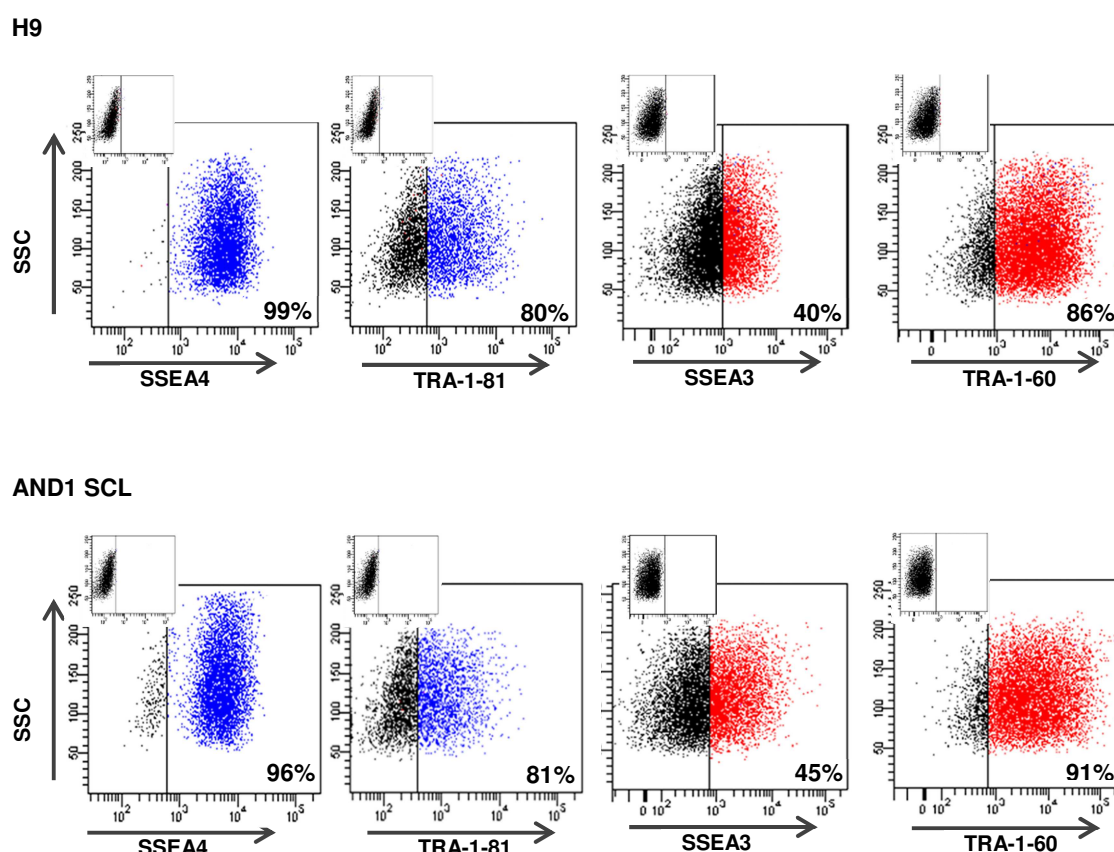


Figura 61. Expresión de los marcadores de pluripotencia analizados por citometría de flujo. Los porcentajes de expresión de los marcadores SSEA4 APC, Tra1-60 PE y Tra1-81 APC son mayores al 80% en H9 y AND1 SCL. Sin embargo, la expresión de SSEA3 se reduce en torno al 40% en H9 y en un 45% en AND1 SCL.

2.2. Estudio del efecto de la hipoxia en la diferenciación megacariocítica de hPSC

Para estudiar el papel que desempeña la hipoxia en la diferenciación de hPSC a megacariocitos empleamos la línea celular H9, una línea hESC ampliamente usada en nuestro laboratorio como modelo de estudio del desarrollo hematopoyético embrionario^{240, 244-245} y en otros trabajos de diferenciaciones hematopoyéticas derivadas de hESC^{107, 222, 512}.

Empleamos un protocolo de diferenciación basado en la formación de EBs y co-cultivo con células OP9 para la formación de células de linaje megacariocítico³⁷⁶. Este protocolo ha sido optimizado en nuestro laboratorio para la generación de megacariocitos²⁴⁶⁻²⁴⁷, y por tanto sería el ideal para estudiar el papel de la hipoxia en diferenciación a megacariocitos derivada de hESC.

De forma breve, se cultivó la línea H9 y durante la diferenciación a megacariocitos bajo las diferentes condiciones de O₂, se procedió al análisis de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ a día 15 del cultivo. Posteriormente, estos progenitores se cultivaron sobre células OP9 para originar células megacariopoyéticas. Las células CD41a⁺CD42b⁺ aparecieron a partir de día 18 y su expresión fue analizado hasta día 32.

2.2.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺

Durante el proceso de diferenciación, se analizó la viabilidad celular y la expresión de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ a día 15 por citometría de flujo.

La figura 62 muestra un diagrama de la formación de células CD34⁺ derivadas de hPSC junto con unas imágenes representativas de la viabilidad celular y la producción de progenitores CD34⁺ por citometría de flujo.

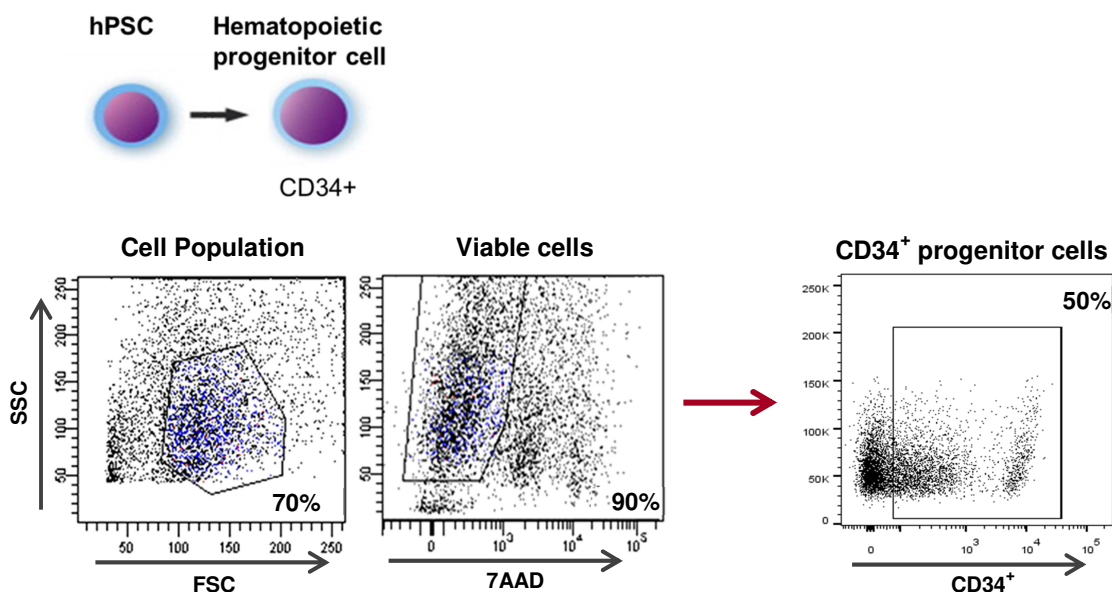


Figura 62. Representación esquemática de la formación de células progenitoras CD34⁺ derivadas de hPSC y gráficos de la viabilidad celular y expresión de progenitores CD34⁺ obtenidos por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos muestran que la hipoxia reduce la viabilidad celular de la línea H9 significativamente ($p < 0.0001$) respecto al control. El 2% O_2 , condición más restrictiva, causa un mayor descenso de la viabilidad celular en los cultivos (Figura 63A). En cambio, la hipoxia incrementa la producción de progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ de manera significativa ($p < 0.0001$), siendo la condición del 2% O_2 la que produce un mayor incremento de estos progenitores (Figura 63B). En base a estos resultados, deducimos que la hipoxia produce una reducción de la viabilidad celular seleccionando progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ más eficientes y funcionales.

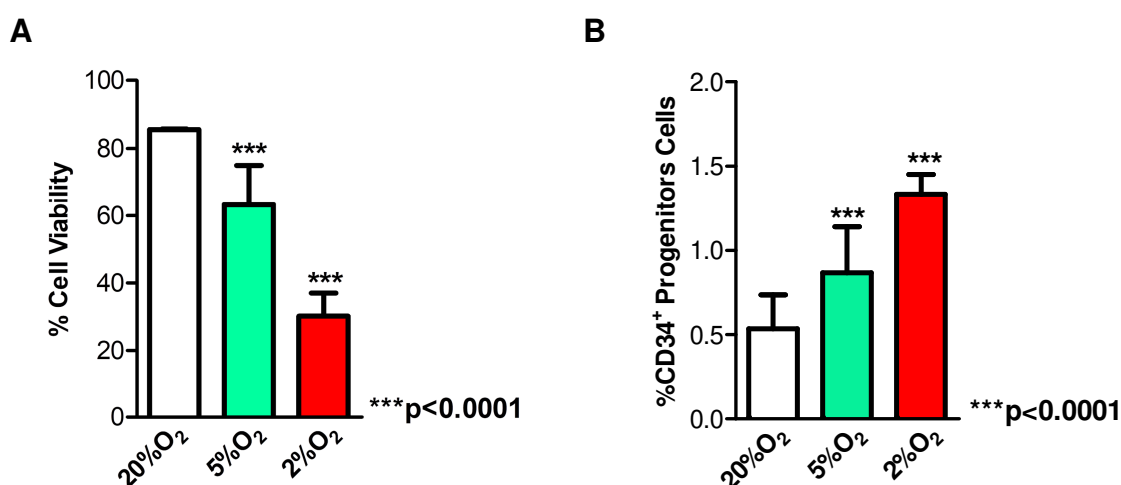


Figura 63. Viabilidad celular y obtención de células $CD34^+$ derivadas de la línea celular H9. A. La hipoxia reduce la viabilidad celular del cultivo, siendo mayor al 2% O_2 . B. La hipoxia promueve una selección eficiente de progenitores $CD34^+$, incrementando su producción, en especial al 2% O_2 . Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

2.2.2. Formación de células $CD41a^+CD42b^+$ de linaje megacariocítico

A lo largo de la diferenciación hacia megacariocitos, se analizó por citometría de flujo la expresión de los marcadores celulares de superficie específicos de linaje megacariocítico, $CD41a$ y $CD42b$.

La figura 64 muestra un digrama de la formación de células de linaje megacariocítico derivadas de hPSC y gráficos de puntos de la obtención de células $CD41a^+CD42b^+$ obtenidas por citometría de flujo.

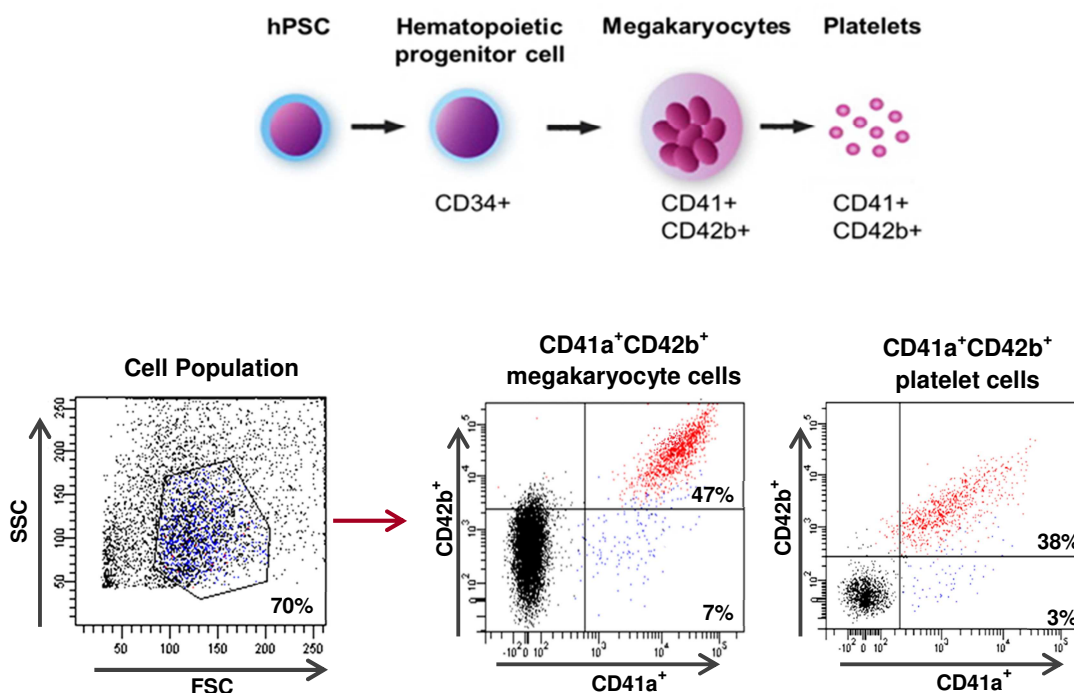


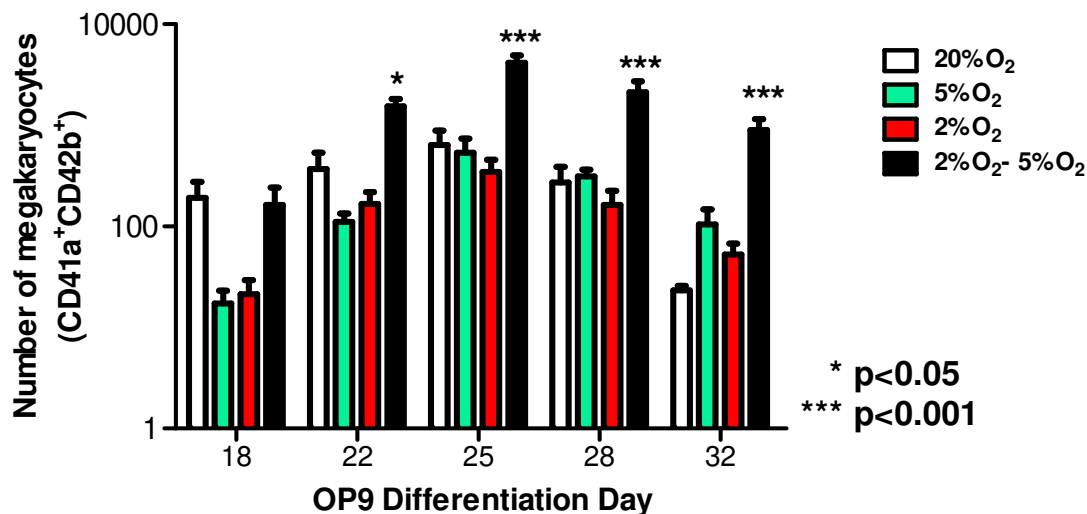
Figura 64. Diagrama de la formación de células CD41a⁺CD42b⁺ e imágenes representativas de la expresión de los marcadores celulares CD41a⁺ y CD42b⁺ obtenidos por citometría de flujo.

A continuación, se representa el análisis del número de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺ obtenidas durante la fase de co-cultivo con células OP9 desde el día 18 al 32.

Los resultados obtenidos muestran como la condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) produce un incremento de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺ respecto al control y al resto de condiciones, siendo significativo ($p < 0.001$) este incremento y alcanzando su máximo a día 25 de la diferenciación (Figura 65A).

Cuando representamos la cinética del número de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺, observamos como a días más tempranos de la diferenciación no se produce ningún efecto con respecto al control. En cambio, a partir de día 25 del cultivo, la condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) aumenta la producción de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺, siendo significativo ($p < 0.001$) este incremento respecto al control (Figura 65B).

A



B

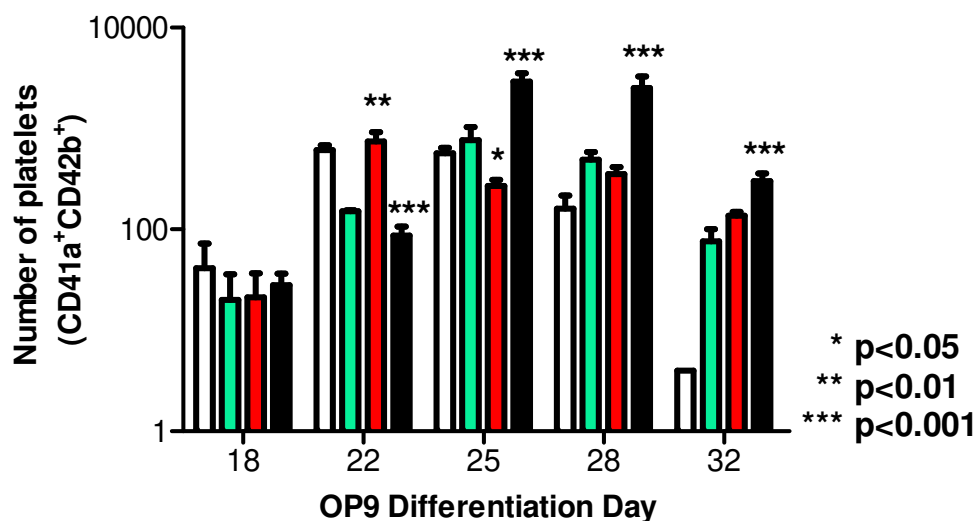


Figura 65. Análisis de células CD41a⁺CD42b⁺ de linaje megacariocítico derivadas de la línea celular H9. A. Cinética de obtención de megacariocitos CD41a⁺CD42b⁺ a lo largo de la diferenciación. La condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) incrementa la formación de células CD41a⁺CD42b⁺ respecto al control y al resto de condiciones experimentales. B. Cinética de formación de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺ a lo largo de la diferenciación. No se observa efecto a días tempranos de la diferenciación con respecto al control. En cambio, a partir de día 25 la condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) incrementa la formación de células CD41a⁺CD42b⁺ respecto al control y al resto de condiciones experimentales. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

2.3. Estudio del efecto combinado de la hipoxia y la expresión de SCL en la diferenciación megacariocítica de hPSC.

En base a los datos obtenidos sobre el efecto positivo de la hipoxia en la diferenciación megacariocítica de hESC, quisimos potenciar estos resultados al combinarlos con la expresión ectópica de SCL, regulador esencial de la megacariopoyesis. Para estudiar el efecto combinado de la hipoxia y SCL, se empleó la línea AND1 SCL, previamente utilizada para la optimización de la formación de megacariocitos y reportada como una mejor opción a otras líneas hESC en la obtención de células $CD41a^+CD42b^+$ ²⁴⁶⁻²⁴⁷.

El procedimiento a seguir en la diferenciación de AND1 SCL hacia megacariocitos fue el mismo que con la línea H9. AND1 SCL se cultivó bajo diferentes condiciones de O_2 y a día 15 se analizó la obtención de células $CD34^+$, que posteriormente se cultivaron con células OP9 para dar lugar a células $CD41a^+CD42b^+$, cuya expresión se analizó durante los días 18, 22, 25, 28 y 32.

2.3.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$

A día 15 del cultivo celular, se analizó la viabilidad celular y la expresión de progenitores hematopoyéticos $CD34^+$.

Los datos resultantes muestran que la hipoxia causa una reducción significativa ($p < 0.0001$) de la viabilidad celular de la línea AND1 SCL respecto al control. El 2% O_2 , reduce la viabilidad celular de los cultivos en mayor medida (Figura 66A). Por el contrario, la hipoxia aumenta significativamente ($p < 0.0001$) la generación de progenitores $CD34^+$, siendo mayor el incremento al 2% O_2 (Figura 66B). Por tanto, la hipoxia reduce la viabilidad celular del cultivo pero seleccionando progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ más funcionales. Estos resultados confirman los anteriormente obtenidos en la línea H9.

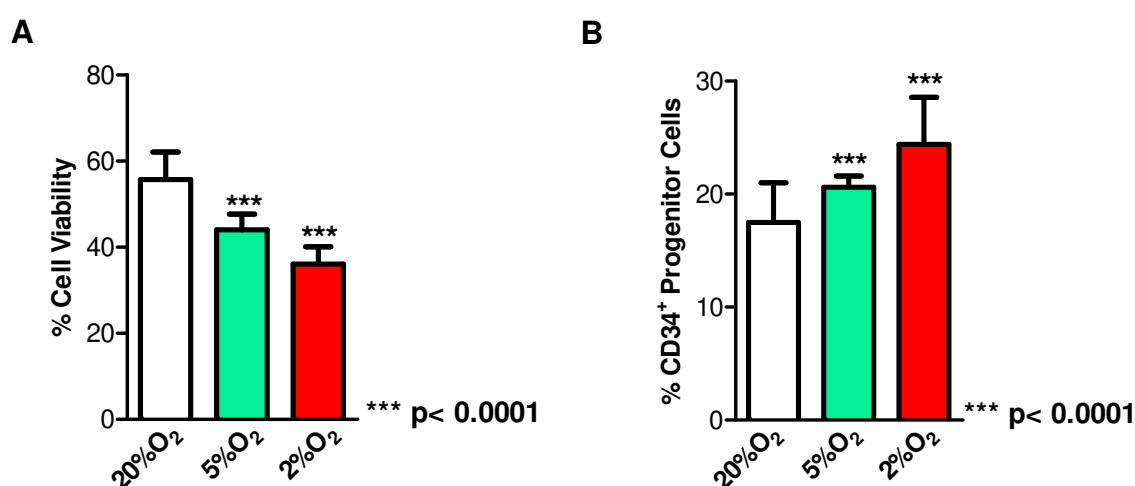


Figura 66. Análisis de la viabilidad celular y la generación de progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ derivados de AND1 SCL. A. La hipoxia causa una reducción de la viabilidad celular del cultivo, en especial al 2% O_2 . B. La hipoxia selecciona progenitores $CD34^+$ más eficientes. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

2.3.2. Formación de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺

A lo largo de la diferenciación megacariopoyética se examinó la generación de células CD41a⁺CD42b⁺ de la línea AND1 SCL.

La figura 67A representa la cinética de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺ analizadas durante la diferenciación. Los resultados obtenidos muestran que la hipoxia reduce la formación de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺ a días tempranos de la diferenciación, respecto al control. En cambio, a partir de día 28 la hipoxia tiende a aumentar ligeramente la obtención de células CD41a⁺CD42b⁺, siendo significativo ($p < 0.001$) este incremento respecto al control. Estos resultados son opuestos a lo que esperábamos obtener tras combinar la hipoxia y la expresión de SCL.

Por otro lado, cuando analizamos el número de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺, observamos que la hipoxia tiende a aumentar ligeramente la obtención de estas células de forma significativa a partir de día 28 ($p < 0.001$), como ocurría en las células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺. La condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) y el 5% O₂ parecen tener más efecto de manera significativa ($p < 0.05$, $p < 0.001$) a días tempranos de la diferenciación (Figura 67B).

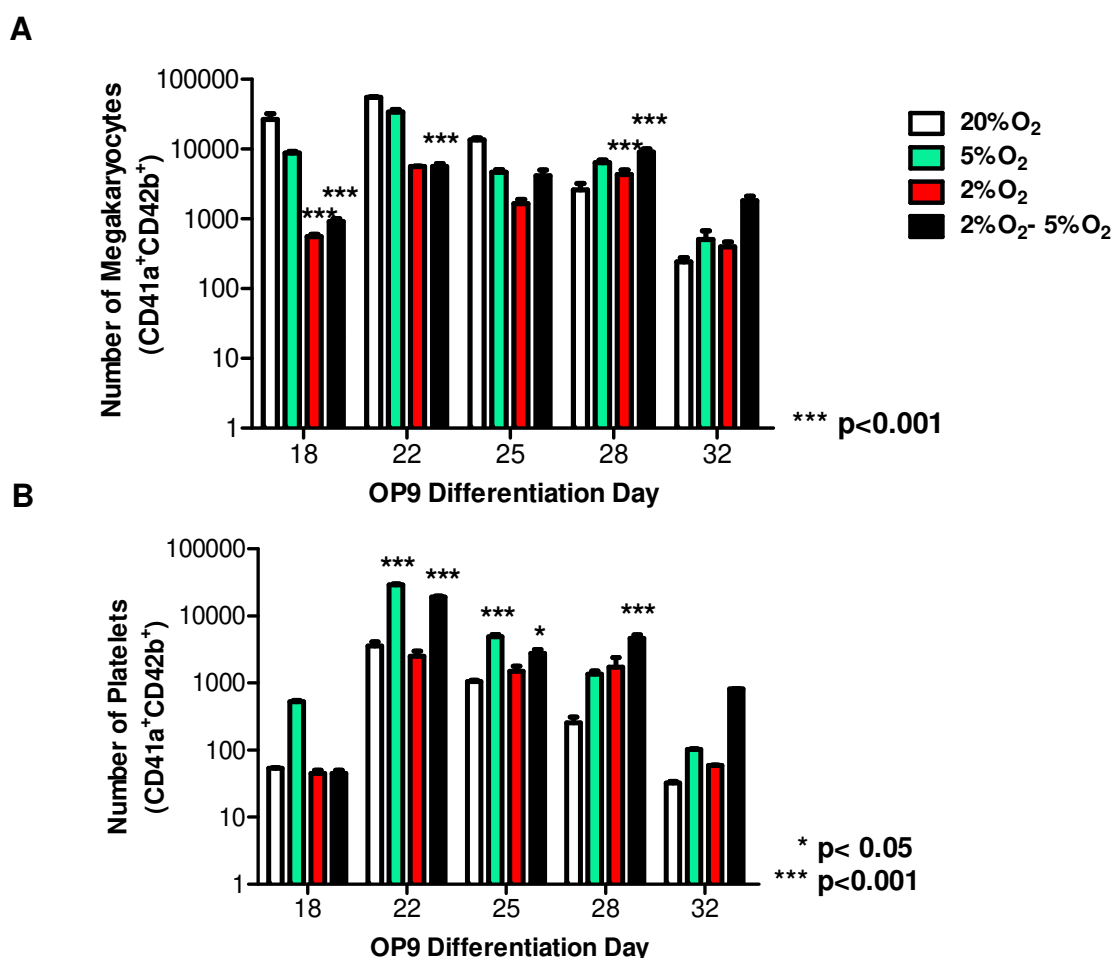


Figura 67. Análisis de células CD41a⁺CD42b⁺ derivadas de AND1 SCL. A. Cinética de obtención de megacariocitos CD41a⁺CD42b⁺ a lo largo de la diferenciación. B. Cinética de formación de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺ durante la diferenciación. Los resultados representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Los datos obtenidos al combinar las bajas tensiones de O_2 y la expresión de SCL durante la formación de megacariocitos $CD41a^+CD42b^+$, sugieren que la expresión de SCL se ve afectada por la hipoxia, y esta es la razón por la que se reduce la formación de células $CD41a^+CD42b^+$. Hay trabajos que reportan la degradación de SCL bajo condiciones de hipoxia en otros tipos celulares⁵⁰⁶, lo que nos llevó a pensar que SCL podría estar degradándose cuando AND1 SCL era expuesta a bajas tensiones de O_2 durante la diferenciación. Para determinar la expresión de la proteína SCL realizamos la técnica de western blot.

2.3.3. Análisis de la degradación de SCL por hipoxia

Para evaluar si la proteína SCL es degradada bajo hipoxia, se cultivó la línea AND1 SCL durante 6 días al 2% O_2 y al 5% O_2 .

Los resultados obtenidos muestran una reducción de la expresión proteica de SCL bajo condiciones de hipoxia, siendo mayor durante el paso del tiempo. Bajo la condición más restrictiva, al 2% O_2 , la degradación proteica es aún más acentuada, perdiéndose por completo la expresión de SCL a partir del tercer día (Figura 68).

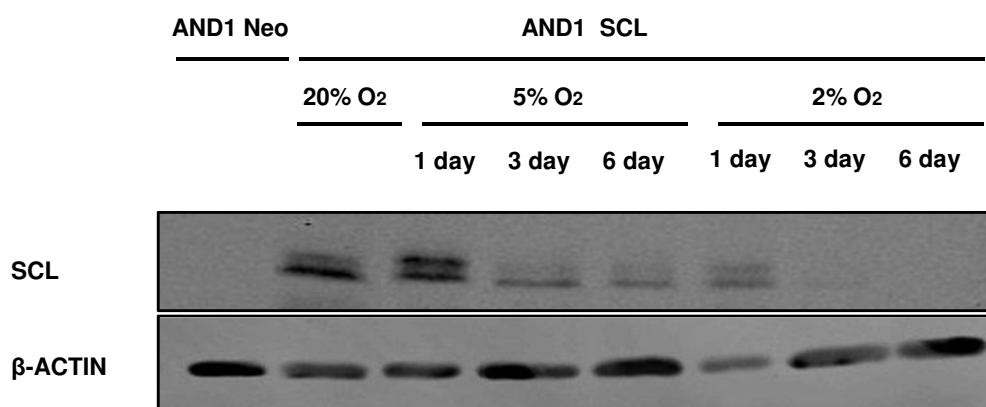


Figura 68. Degradación de la proteína SCL bajo condiciones de hipoxia. Imagen de la expresión proteica de SCL obtenida por western blot. La hipoxia acelera la degradación de SCL con el paso del tiempo, especialmente el 2% O_2 .

Además, mostramos una cuantificación relativa de la proteína SCL al 5% O_2 y al 2% O_2 . Los datos obtenidos, significativos respecto al control ($p < 0.001$), confirman los resultados ya observados en la imagen de Western Blot (Figura 69). Estos datos constatan nuestra teoría sobre la pérdida de expresión de SCL bajo condiciones de hipoxia.

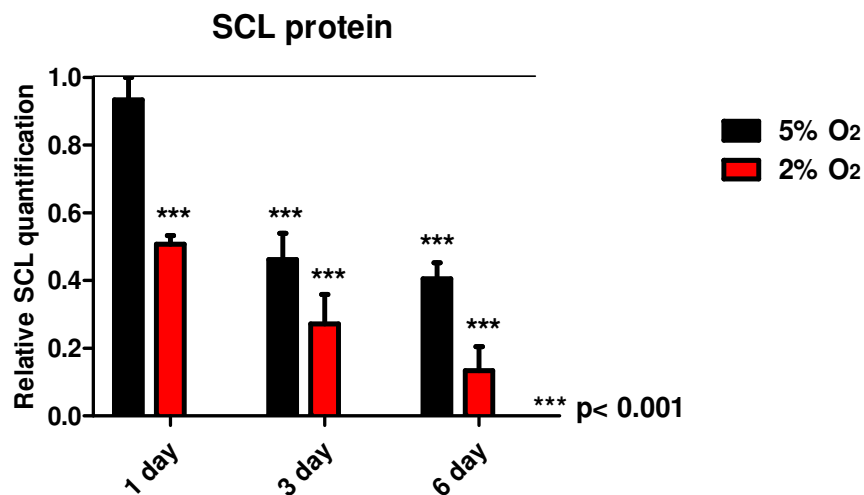


Figura 69. Cuantificación relativa de la proteína SCL en condiciones de hipoxia. Estos datos confirman los resultados observados en la imagen anterior. SCL es degradado bajo condiciones de hipoxia. Los resultados representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes.

Para complementar los resultados obtenidos, analizamos las posibles vías de degradación de SCL usando varios inhibidores que afectan a la fosforilación de la proteína (PD 98059 y LY 294002) y a su degradación por el proteosoma (MG132). La línea AND1 SCL fue cultivada al 2% O₂ durante 24h, en presencia de los inhibidores de la ruta transcripcional de SCL.

La imagen obtenida por western blot, muestra que PD 98059 (inhibidor de MAPK-K1) y MG132 (Inhibidor de la degradación del proteosoma) rescatan la expresión de la proteína SCL. En cambio, LY 294002 (inhibidor de PI3K) no produce ningún efecto en la expresión de SCL. Por tanto, comprobamos que SCL es activado por fosforilación mediada por MAPK-K1, causando su degradación por el proteosoma (Figura 70).

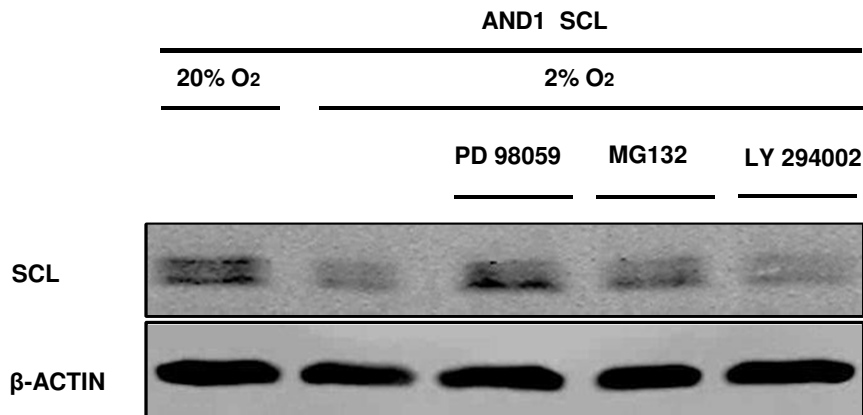


Figura 70. Análisis de las vías de degradación de la ruta transcripcional de SCL. La imagen obtenida por western blot muestra que los inhibores PD 98059 y MG 132 rescatan la función de la proteína

Para completar estos resultados, representamos la cuantificación relativa de SCL, cuyos datos confirman los resultados ya observados en la imagen por western blot, PD 98059 y MG132 inhiben el efecto de la hipoxia en la ruta transcripcional de SCL, rescatando su expresión proteica de forma significativa ($p < 0.01$) (Figura 71).

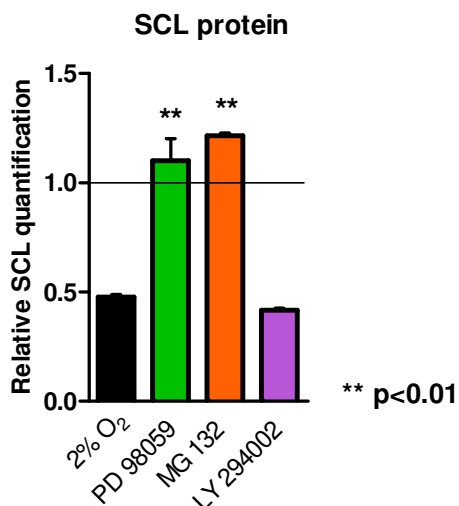


Figura 71. Cuantificación relativa de la proteína SCL en condiciones de hipoxia. Los datos obtenidos confirman que SCL es fosforilada por MAPK-K1 y activada para ser degradada por el proteosoma bajo condiciones de hipoxia. Los resultados representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Tras confirmar que SCL también es degradado por hipoxia en hPSC, podemos concluir que la reducción de la obtención de megacariocitos CD41a⁺CD42b⁺ en la línea AND1 SCL se debe a la degradación de la proteína al ser sometida a condiciones de hipoxia.

Objetivo 3. Generar y validar modelos humanos de enfermedades hematopoyéticas a partir de hPSC.

Una de las posibles aplicaciones de las hiPSC es la generación de modelos de enfermedad permitiendo a los investigadores profundizar en el estudio de la evolución de dicha enfermedad y el diseño de nuevos fármacos para su tratamiento. Por eso, decidimos completar el desarrollo de este proyecto llevando a cabo la generación y validación de dos modelos de trastornos plaquetarios a partir de las células de sus propios pacientes.

3.1. Generación de un modelo humano del Trastorno plaquetario familiar con neoplasia mieloide asociada (FPDMM).

Dado que uno de los objetivos de este proyecto es el estudio del papel de *RUNX1* en la hematopoyesis, decidimos profundizar en el estudio de este gen llevando a cabo la generación de un modelo humano de FPDMM causado por mutaciones en el *locus RUNX1*. Para ello realizamos la reprogramación celular de las PBMC de una paciente que porta la mutación p.Thr196Ala en el exón 6 de *RUNX1*.

La reprogramación celular se realizó a partir del aislamiento de las PBMC de la paciente, que posteriormente fueron transducidas con los SeV que portan los factores de reprogramación de Yamanaka¹²⁻¹³ y cultivadas días después sobre hMSC para su expansión. Desde el día 4 hasta el día 20 post-transducción, las células se cultivaron a 37 °C, 5% O₂ y 5% de CO₂. A partir del día 13 post-transducción, las primeras colonias de hiPSC comenzaron a emerger. A partir del día 20, las células se cultivaron a 37 °C, 20% O₂ y 5% de CO₂, y días más tarde se aplicaron temperaturas de 39 °C para eliminar por completo los SeV termosensibles, permitiendo así la selección y expansión de diversos clones supervivientes durante el proceso de reprogramación.

3.1.1. Selección y expansión clonal post-transducción con SeV

Una vez que las PBMC son transducidas con los SeV portando los factores de reprogramación OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC comienza el proceso de transformación de células somáticas a hiPSC, atravesando diferentes estadios tempranos y tardíos hasta la maduración definitiva de las hiPSC.

La figura 72 muestra un diagrama de la transición del proceso de reprogramación celular, desde la transducción de las PBMC de la paciente hasta la formación y maduración de las colonias hiPSC. Junto al diagrama se muestran fotografías representativas de los diferentes estadios de la reprogramación tomadas a microscopía óptica. Las PBMC, células pequeñas redondeadas y brillantes se convierten en intermediarios tempranos, células más alargadas y con morfología irregular que posteriormente se transforman en intermediarios tardíos e iPSC inmaduras adquiriendo una morfología de colonia pluripotente hasta que finalmente maduran y originan las colonias iPSC con bordes definidos y estructura pluripotente.

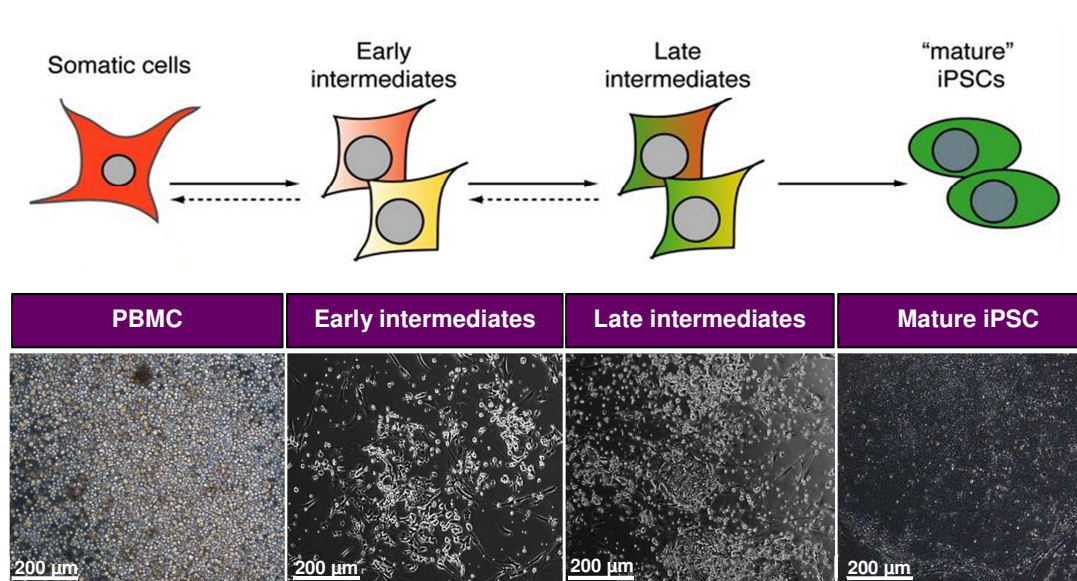


Figura 72. Transición de PBMC a iPSC maduras durante la reprogramación celular. Las PBMC se transforman en colonias iPSC maduras después de la transducción con SeV que portan los factores de reprogramación. A partir de día 13 post-transducción comienzan a aparecer las primeras colonias hiPSC de la paciente con la morfología típica de una célula hPSC.

A partir del día 22 post-transducción, se llevó a cabo la selección y expansión de 6 clones de hiPSC de la paciente: clon 2, 8, 32, 69, 70 y 73. La figura 73 muestra imágenes representativas de la morfología de las colonias hiPSC de los clones seleccionados. Todos los clones muestran una morfología y estructura pluripotente.

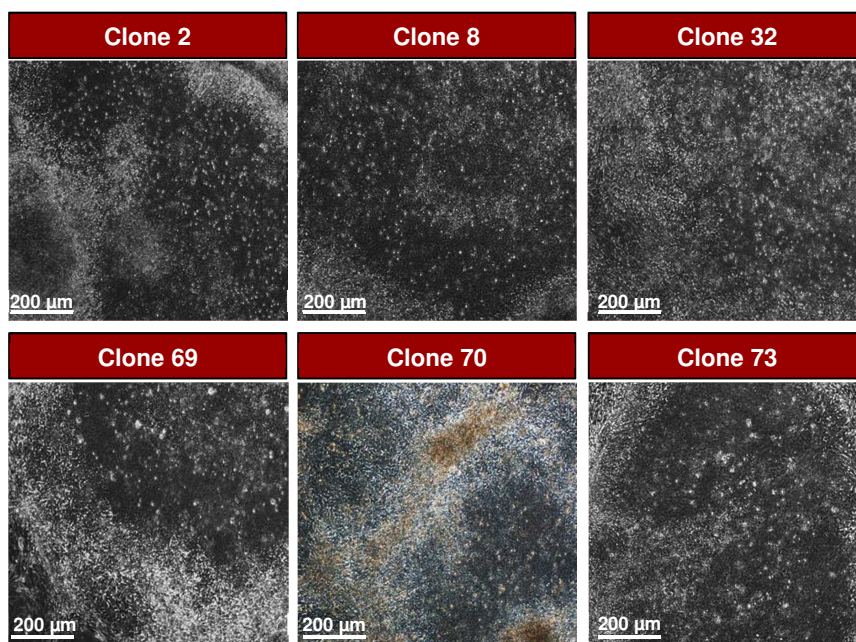


Figura 73. Imágenes representativas de los clones iPSC establecidos y seleccionados durante la reprogramación celular de la paciente.

Finalmente, seleccionamos el clon 73 para el establecimiento de la línea hiPSC de FPDMM (FPD-PBMC-iPSC4F73). Una vez establecida la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 en cultivo, se desarrollaron diversas técnicas para llevar a cabo la caracterización de la línea celular.

3.1.2. Análisis mutacional del *locus RUNX1*

Tras aislar el ADN genómico de las PBMC de la paciente, de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 y de línea control PBMC1-iPS4F1 se realizó un análisis de secuenciación para determinar la presencia de la mutación p.Thr196Ala en el exón 6 del *locus RUNX1*. Los electroferogramas resultantes de la secuenciación confirmaron la presencia de la mutación heterocigota en las PBMC de la paciente y en la línea celular FPD-PBMC-iPSC4F73 generada (Figura 74).

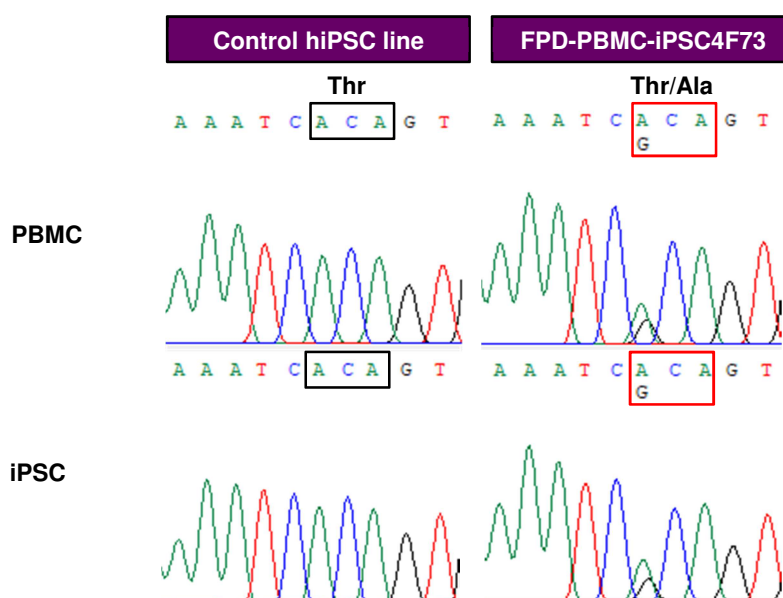


Figura 74. Análisis de secuenciación de la línea celular FPD-PBMC-iPSC4F73. Electroferogramas resultantes de la secuenciación confirman la variante p.Thr196Ala en las PBMC de la paciente y en la línea celular generada. En la imagen se remarca con un cuadrado negro la secuencia silvestre y con un cuadrado rojo la secuencia mutada.

3.1.3. Análisis de STR

Para determinar la identidad genética de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 y las PBMC de la paciente, se realizó un análisis de polimorfismo comparando 15 *loci* y el marcador Amelogenina para identificar el género de las líneas celulares.

Los datos resultantes verificaron que la línea hiPSC generada conservaba el perfil genético e idéntico a las PBMC de la paciente con FPDMM.

La tabla 3.1.3 muestra los 15 *loci* analizados en ambas muestras para determinar la huella genética y el marcador Amelogenina.

Tabla 3.1.3. Análisis de STR de las células originales de la paciente (FPD-PBMC) y la línea generada (FPD-PBMC-iPSC4F73). Los datos resultantes confirman la identidad genética de ambas muestras celulares.

Loci	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1P0	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	AMEL
FPD-PBMC	13, 16	28, 33.2	9, 11	10, 11	15, 18	6, 9	11, 12	10, 13	18, 19	11, 14	15, 17	11, 11	16, 19	11, 12	19, 27	X X
FPD-iPSC	13, 16	28, 33.2	9, 11	10, 11	15, 18	6, 9	11, 12	10, 13	18, 19	11, 14	15, 17	11, 11	16, 19	11, 12	19, 27	X X

Una vez comprobado que la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 preservaba la identidad genética de las células originales, las PBMC de la paciente, se procedió a verificar el silenciamiento de los SeV y los factores de reprogramación.

3.1.4. Silenciamiento de los factores de reprogramación

Se analizó el silenciamiento de los factores de reprogramación exógenos por PCR de las línea FPD-PBMC-iPSC4F73, la línea PBMC1-iPS4F1 (control negativo) y las PBMC a día 4 post-transducción (control positivo). La imagen resultante muestra la pérdida completa de la expresión exógena de SeV, c-MYC, KOS y KLF4 (Figura 75).

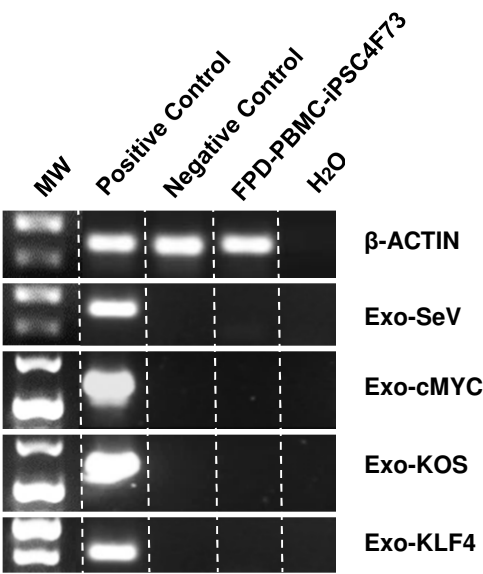


Figura 75. Análisis del silenciamiento de los genes de reprogramación por RT-PCR. La línea FPD-PBMC-iPSC4F73 muestra pérdida completa de expresión de SeV y de los factores exógenos c-MYC, KOS y KLF4. β -ACTIN fue usada como control de carga.

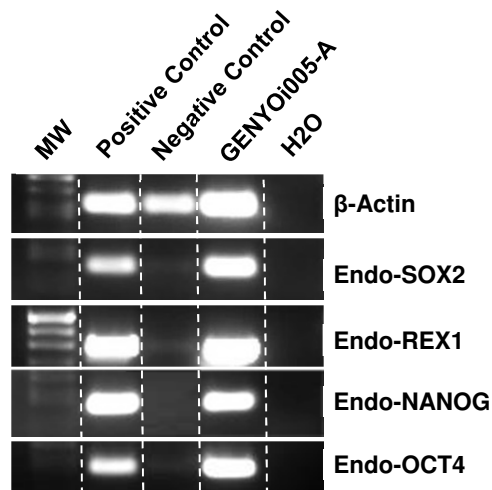
A continuación, se realizaron estudios de pluripotencia, tanto a nivel de expresión génica por RT-PCR como a nivel de expresión proteica por citometría de flujo, y así comprobar que la reprogramación de las células somáticas de la paciente ha sido eficiente, generando líneas hiPSC con capacidad de pluripotencia. Además, se realizaron ensayos de la actividad fosfatasa alcalina, una técnica cualitativa y cuantitativa indicadora de la pluripotencialidad de las células.

3.1.5. Estudio de pluripotencia

En primer lugar, se analizó la expresión endógena de los genes *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG* de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 mediante RT-PCR. La línea PBMC1-iPSC4F1 se utilizó como control positivo y las PBMC de la paciente como control negativo. La imagen resultante confirmó que la línea hiPSC generada había adquirido la capacidad pluripotente al expresar los genes endógenos de pluripotencia (Figura 76A).

Por otro lado, se estudió la expresión de marcadores celulares de pluripotencia característicos como SSEA3, SSEA4, TRA1-81, TRA 1-60 y OCT3/4 por citometría de flujo. Tras el análisis, los datos resultantes muestran que la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 expresa SSEA4, TRA1-81, TRA 1-60 y OCT3/4 en un porcentaje mayor del 75%. En cambio, la expresión de SSEA3 se reduce a un 37% (Figura 76B).

A



B

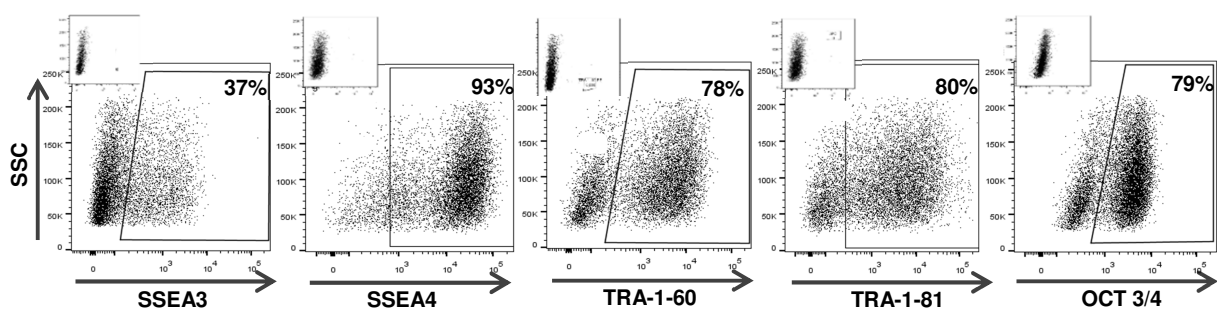


Figura 76. Estudio de pluripotencia de línea celular FPD-PBMC-iPSC4F73. A. Expresión de los genes endógenos de pluripotencia OCT3/4, SOX2, REX1 y NANOG por RT-PCR. B. Expresión de los marcadores de pluripotencia SSEA3, SSEA4, TRA1-81, TRA 1-60 y OCT3/4 por citometría de flujo.

3.1.6. Análisis de la actividad enzimática fosfatasa alcalina

Tras cultivar las células FPD-PBMC-iPSC4F73 durante 5 días a 37°C, se determinó la actividad enzimática para la fosfatasa alcalina mediante Alkaline phosphatase detection kit. La línea celular hiPSC mostró actividad positiva para la tinción de fosfatasa alcalina, adquiriendo un color rosado, indicativo de la actividad enzimática (Figura 77).

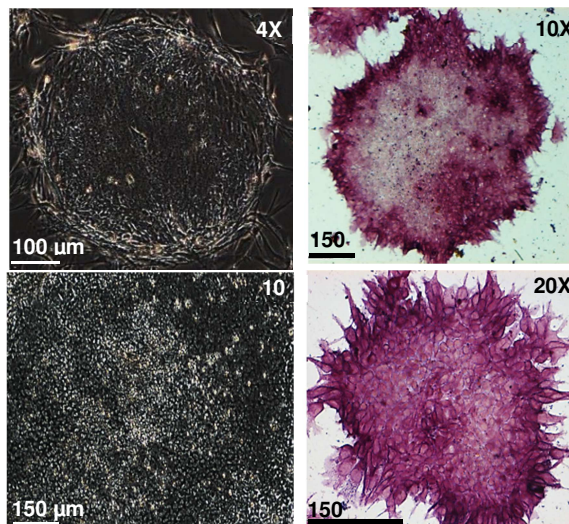


Figura 77. Análisis de la actividad enzimática fosfatasa alcalina. A la izquierda, se muestra imágenes del cultivo celular obtenidas por microscopía óptica. A la derecha, se muestra imágenes resultantes del ensayo para la fosfatasa alcalina obtenidas en el Microdisector Láser Zeiss PALM Microbeam.

Una vez confirmada la pluripotencia de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73, se llevaron a cabo análisis citogenéticos para comprobar que la línea presentaba un cariotipo normal, en este caso 46 XX.

3.1.7. Estudio citogenético por bandeo GTG

El análisis cromosómico de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 mediante la técnica de bandeo GTG confirmó que presentaba un cariotipo normal, 46 XX (Figura 78).

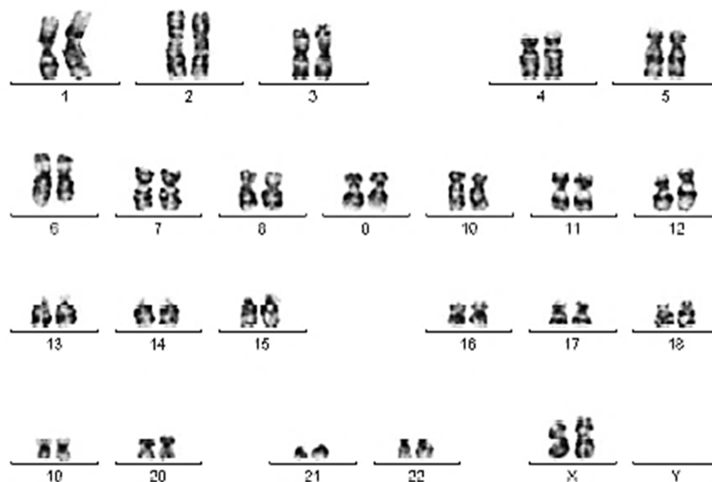


Figura 78. Cariotipado de la línea celular FPD-PBMC-iPSC4F73. La línea celular presenta un cariotipo normal, 46 XX.

Posteriormente, se llevaron a cabo otras técnicas de pluripotencialidad de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 mediante ensayos de diferenciación *in vitro* e *in vivo*, para comprobar que la línea hiPSC generada tiene la capacidad de diferenciarse hacia las tres capas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo).

3.1.8. Ensayos de diferenciación *in vitro*

Para testar la capacidad de diferenciación *in vitro* de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 a las 3 capas germinales del embrión, realizamos ensayos de formación de EBs. A los 16 días de cultivo, los EBs se colectaron para llevar a cabo análisis histológicos e inmunocitoquímicos. La figura 75 muestra imágenes representativas del cultivo de EBs obtenidas por microscopía óptica junto con las imágenes resultantes del análisis histológico por H&E e inmunocitoquímico por β -III-tubulina (ectodermo), vimentina (mesodermo) y CKAE1-EA3 (endodermo). Los resultados confirman positividad para la expresión de los marcadores celulares específicos de las tres capas germinales del embrión, confirmando la capacidad de diferenciación *in vitro* de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 (Figura 79).

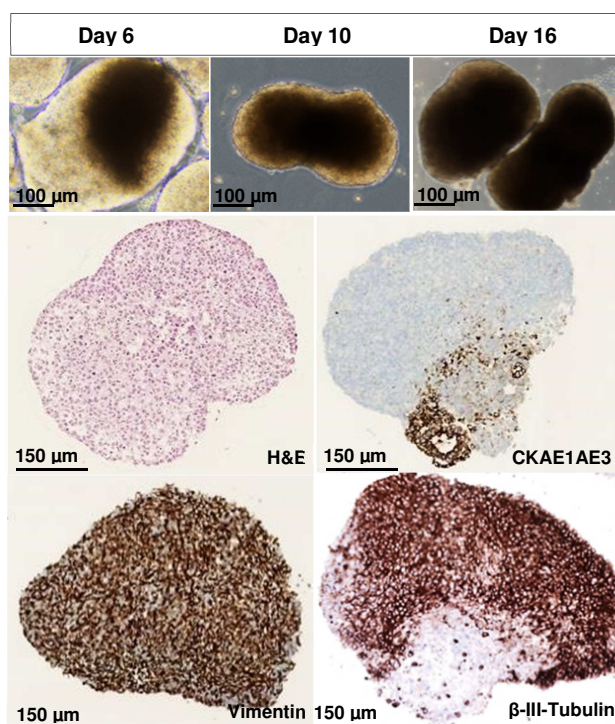


Figura 79. Formación de EBs *in vitro*. En la parte superior se muestran imágenes del cultivo de EBs durante 16 días. En la parte inferior se muestran las tinciones inmunocitoquímicas de endodermo (CKAE1-AE3), mesodermo (Vimentina) y ectodermo (β -III-Tubulina). Los resultados confirman que la línea FPD-PBMC-iPSC4F73 posee capacidad de diferenciación *in vitro* a las 3 capas germinales del embrión.

Tras confirmar la capacidad de diferenciación *in vitro* de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73, se realizaron ensayos de diferenciación *in vivo* en ratones inmunodeficientes mediante la formación de teratomas.

3.1.9. Ensayos de diferenciación *in vivo*

Se realizaron ensayos de formación de teratomas en ratones inmunodeficientes para estudiar la capacidad de diferenciación *in vivo* de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73. A las 10 semanas post-implantación, se colectaron los teratomas para ser analizados tanto por técnicas histológicas como inmunocitoquímicas. Las imágenes resultantes mostraron positividad para la tinción H&E y para la inmunotinción β -III-tubulina, vimentina y CKAE1-EA3. Además, se muestran estructuras específicas de las tres capas germinales: epitelio ciliado (endodermo), cartílago (mesodermo) y rosetas neurales (ectodermo) (Figura 80).

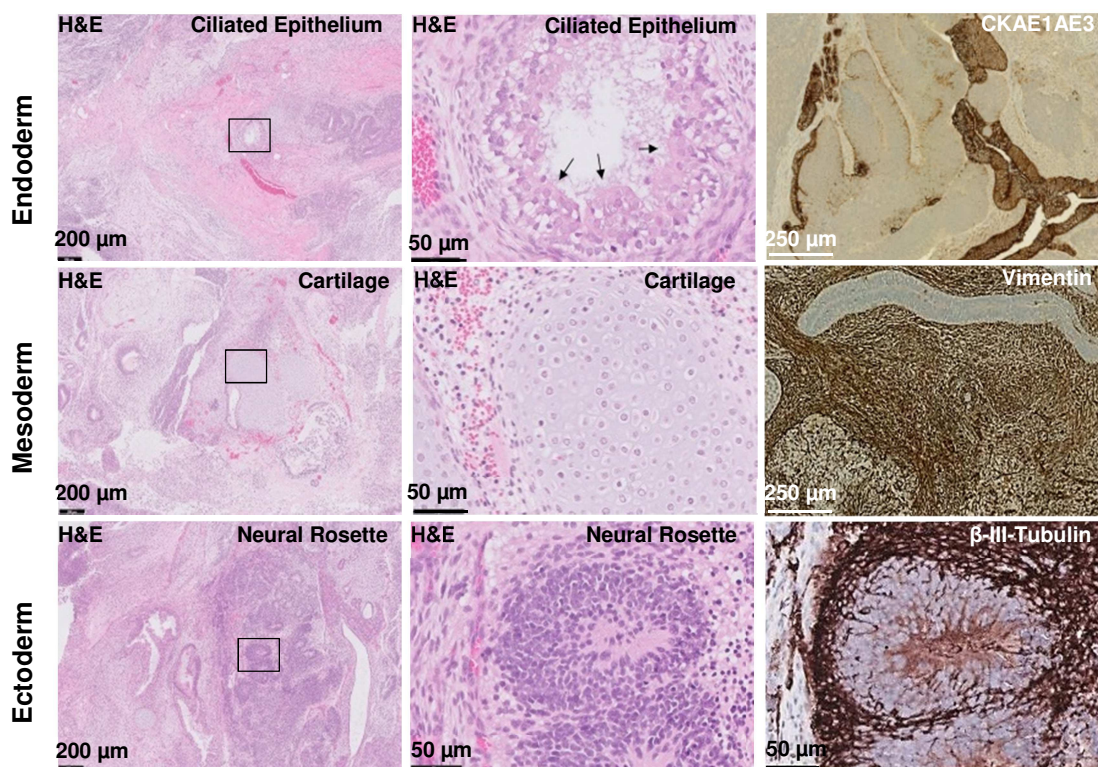


Figura 80. Ensayos de diferenciación *in vivo* por formación de teratomas. Las secciones histológicas obtenidas tras la extracción de teratomas en ratones NOD/LtSz-scid interleukin-2R γ ^{-/-} muestran positividad para CKAE1-AE3 (endodermo), Vimentina (mesodermo) y β -III-Tubulina (ectodermo).

Tras finalizar con éxito la caracterización celular de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73, podemos concluir que hemos logrado generar un modelo humano de FPDMM que presenta una mutación no descrita, lo cual nos permitirá estudiar el desarrollo de la enfermedad y los efectos que produce en ella esta mutación. La generación de este modelo nos permitirá en un futuro aplicar nuevas terapias para el tratamiento de esta enfermedad, como la corrección fenotípica mediante terapia génica o ensayo de nuevos fármacos.

3.2. Validar el rescate génico del modelo humano del Síndrome de Bernard-Soulier (BSS).

Mediante la reprogramación celular de las PBMC de varios pacientes con BSS que presentan diferentes mutaciones en *GP9*, hemos logrado generar varios modelos humanos de BSS⁶⁶⁻⁶⁸.

En este proyecto, nos centramos en la línea generada BSS2-PBMC-iPS4F24 que porta la mutación p.Asn45Ser⁶⁶. Esta línea fue rescatada fenotípicamente mediante terapia génica con lentivirus que expresaban de forma ectópica el gen silvestre. El siguiente paso fue la validación del rescate génico del modelo BSS y para ello se requiere la comprobación de la eficacia de la transducción lentiviral, la verificación de que las líneas transducidas mantienen su capacidad pluripotente y la generación de células de linaje megacariocítico que confirmen el rescate fenotípico de la mutación.

3.2.1. Expresión del gen *GP9*

Se determinó la expresión de *GP9* por PCR tras la transducción lentiviral de la línea BSS2-PBMC-iPS4F24. La imagen resultante obtenida por electroforesis mostró expresión del gen *GP9*, por tanto se confirmó que la transducción de la línea celular BSS2-PBMC-iPS4F24 había sido eficiente (Figura 81).

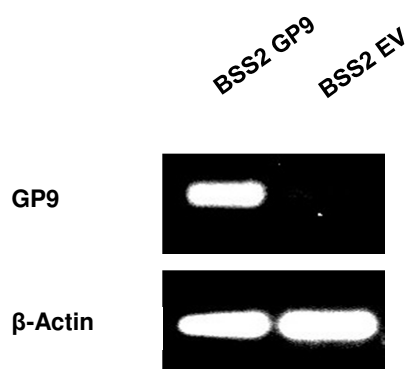


Figura 81. Expresión génica de *GP9* en la línea celular BSS2 GP9. La imagen resultante confirma que la línea BSS2 GP9 ha sido transducida eficientemente al expresar *GP9*, respecto al control.

Posteriormente, tras verificar la expresión de *GP9* en la línea BSS2 GP9, se procedió a analizar la pluripotencia de la línea control BSS2 EV y BSS2 GP9 para comprobar que conservaban la pluripotencia de la línea original BSS2-PBMC-iPS4F24, característica fundamental para llevar a cabo la formación de megacariocitos mediante un protocolo de diferenciación específico a linaje megacariocítico.

3.2.2. Pluripotencia de las líneas BSS2

Por una parte, se comprobó que las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 mantenían la pluripotencia mediante el análisis de la expresión endógena de los genes de pluripotencia *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG* por RT-PCR. La imagen resultante confirmó que las líneas hiPSC expresaban los genes de pluripotencia (Figura 82).

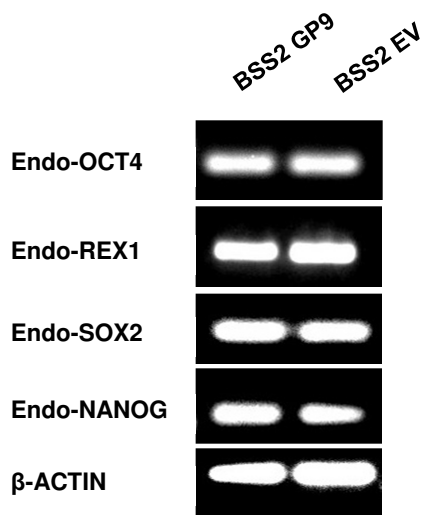
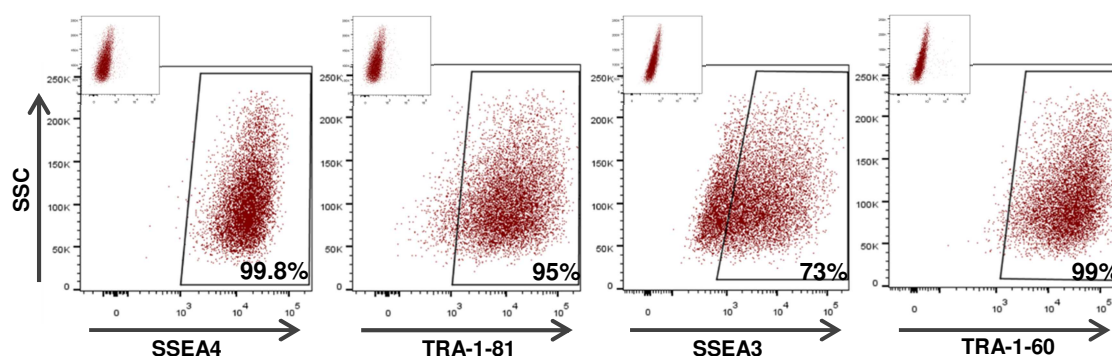


Figura 82. Análisis de pluripotencia de las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 por RT-PCR. Las líneas celulares expresan los genes de pluripotencia *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG*.

Por otro lado, mediante citometría de flujo, se analizó la pluripotencia a nivel de proteína de las líneas celulares BSS2 EV y BSS2 GP9 midiendo la expresión de los marcadores celulares SSEA4, SSEA3, TRA-1-81 y TRA-1-60.

Los resultados obtenidos de la citometría mostraron una expresión mayor del 80% para los marcadores de pluripotencia SSEA4, TRA-1-81 y TRA-1-60. En cambio, la expresión de SSEA3 fue más reducida, mayor del 70% en la línea control del paciente y en torno al 30% en la línea BSS2 GP9 (Figura 83).

BSS2 EV



BSS2 GP9

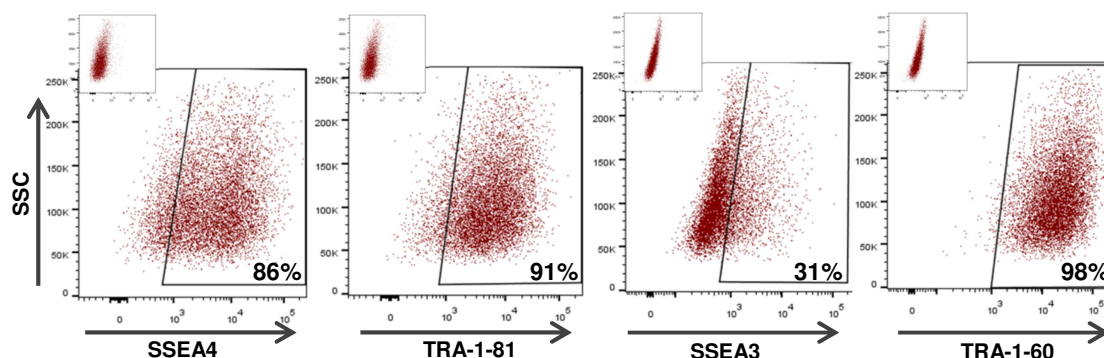


Figura 83. Pluripotencia de las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 po citometría de flujo. Las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 expresan los marcadores de pluripotencia SSEA4, SSEA3, TRA-1-81 y TRA-1-60.

Una vez comprobada la pluripotencia de las líneas, se llevaron a cabo las pertinentes diferenciaciones megacariocíticas para validar el rescate fenotípico de la línea BSS2 GP9 mediante el uso de un protocolo de diferenciación más actual y eficiente que el protocolo anterior basado en la formación de EBs y co-cultivo con células OP9³⁷⁶. Este protocolo está basado en la transducción lentiviral de hPSC mediante la expresión ectópica de TF esenciales en el proceso de megacariopoyesis³⁸⁰. Las células se mantuvieron en cultivo durante un mes en un medio definido (CellGRO SCGM) en combinación con diferentes citoquinas hematopoyéticas. Se llevaron a cabo análisis de citometría durante los días 9, 20, 26 y 30 de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺, los progenitores megacariocíticos CD34⁺CD41a⁺ y de las células megacariocíticas CD41a⁺CD42a⁺.

3.2.3. Diferenciación a células de linaje megacariocítico

Los pacientes con BSS carecen de la proteína GPIX/CD42a, por tanto para validar el rescate génico de la línea BSS2 GP9 se llevó a cabo la diferenciación a células progenitoras $CD34^+$, a progenitores megacariocíticos y a células de linaje megacariocítico tanto de la línea rescatada (BSS2 GP9) como de la línea control del paciente (BSS2 EV). Como control positivo de la diferenciación empleamos la línea control sana (iBOB) que fue cedida por el laboratorio del Dr. Ouwehand (University of Cambridge).

3.2.3.1. Obtención de células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$

Durante la diferenciación a megacariocitos, se analizó la formación de progenitores hematopoyéticos $CD34^+$.

La figura 84 muestra un diagrama de la formación de células $CD34^+$ a partir de hPSC junto con gráficos de puntos de la obtención de células hematopoyéticas $CD34^+$ por citometría de flujo.

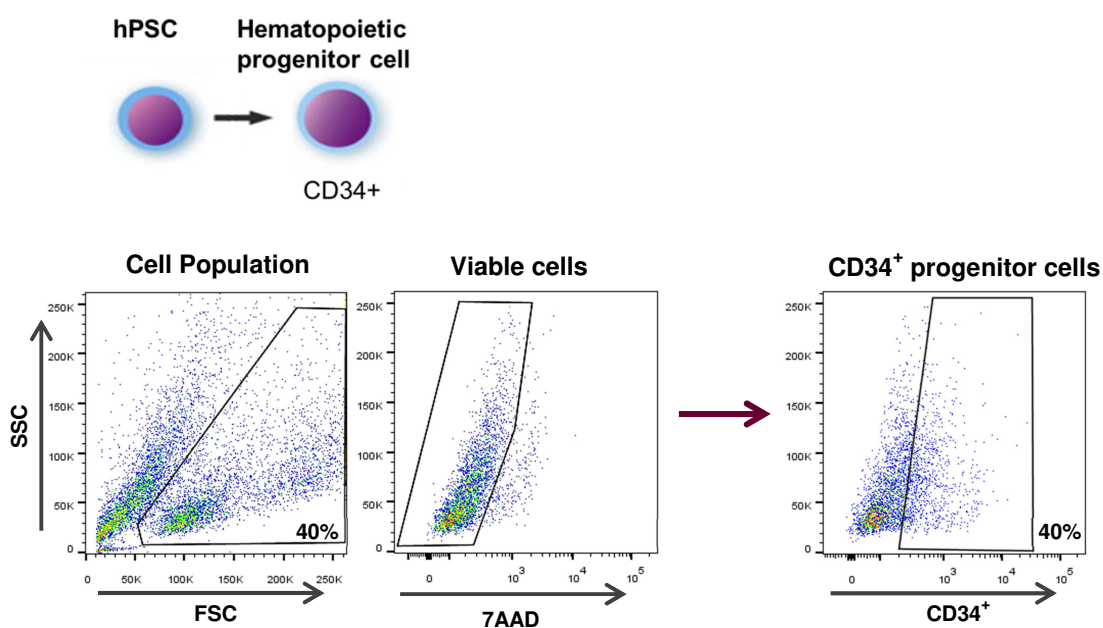


Figura 84. Células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$. Diagrama de la obtención de progenitores $CD34^+$ e imágenes representativas obtenidas por citometría de flujo

Cuando analizamos la cinética de obtención de progenitores $CD34^+$ observamos que la línea celular rescatada, BSS2 GP9, produce más células progenitoras $CD34^+$ a días tempranos de la diferenciación, respecto a la línea control del paciente, BSS2 EV y respecto a la línea control sana, iBOB. A partir de día 20, la formación de progenitores hematopoyéticos $CD34^+$ de la línea BSS2 GP9 es ligeramente mayor a la línea BSS2 EV, alcanzado su máximo a día 20 de la diferenciación.

A partir de día 30, la obtención de progenitores $CD34^+$ se reduce significativamente con respecto a la línea control el paciente ($p<0.01$). En cambio, respecto a la línea control sana, el porcentaje obtenido de células $CD34^+$ es más reducido en ambas líneas, BSS2 EV y BSS2 GP9 (Figura 85).

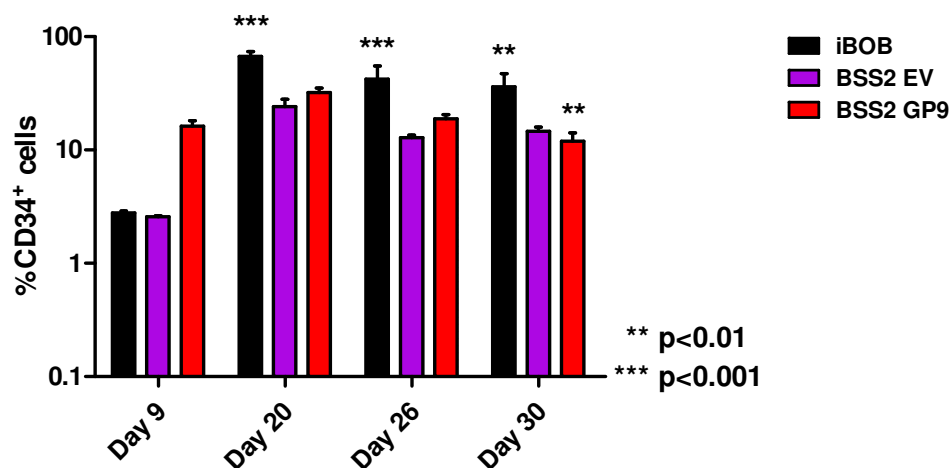


Figura 85. Formación de células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$. Cinética de obtención de células $CD34^+$. BSS2 GP9 produce más células $CD34^+$ respecto a la línea BSS2 EV. En cambio, respecto a la línea iBOB, la obtención de células $CD34^+$ es más reducida tanto en BSS2 EV como en BSS2 GP9. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. La estadística se ha realizado respecto a la línea control del paciente, BSS2 EV.

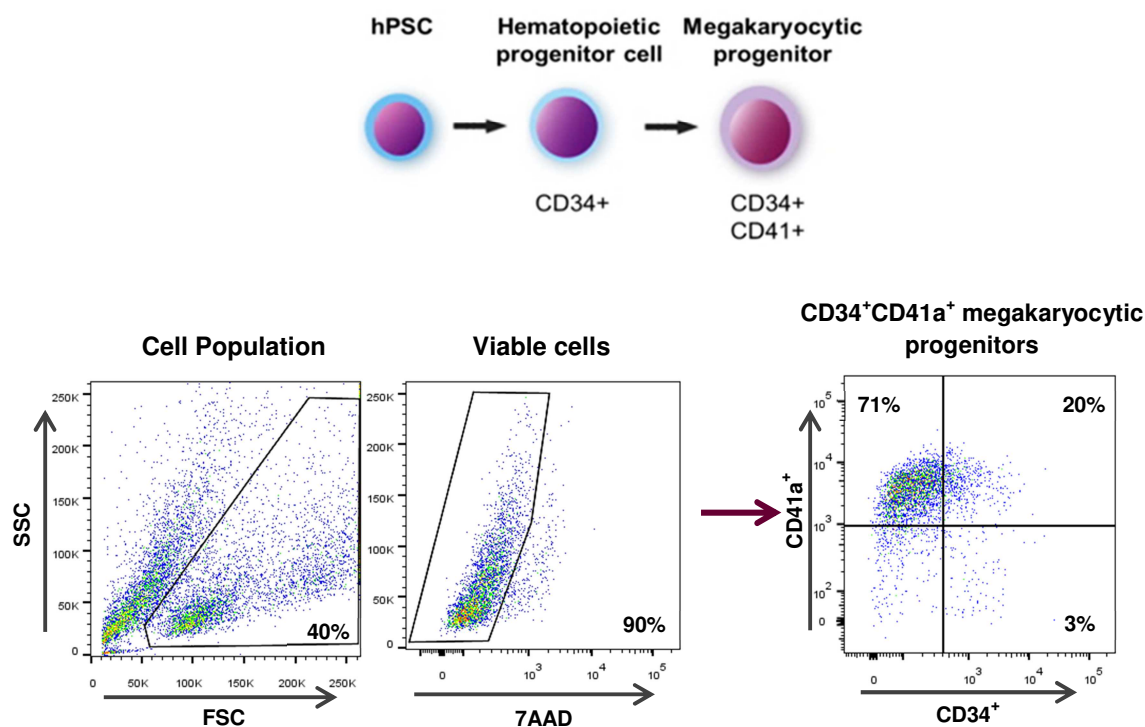
3.2.4.2. Obtención de progenitores megacariocíticos $CD34^+CD41a^+$

Durante la diferenciación terminal a células de linaje megacariocítico, se analizó la expresión de progenitores megacariocíticos $CD34^+CD41a^+$.

La figura 86A muestra un diagrama de la obtención de estos progenitores junto con imágenes representativas de la expresión de $CD34^+CD41a^+$ obtenidas por citometría de flujo.

La figura 86B muestra la cinética de producción de los progenitores megacariocíticos $CD34^+CD41a^+$. Observamos que la línea rescatada produce más células $CD34^+CD41a^+$ a días tempranos de la diferenciación alcanzando su máximo a día 20 ($p<0.01$), respecto a la línea control del paciente. A partir de día 26, la línea BSS2 GP9 disminuye la formación de progenitores megacariocíticos de forma significativa ($p<0.05$), respecto al control BSS2 EV. Si comparamos la obtención de progenitores megacariocíticos con la línea control sana, observamos que a día 9 la expresión es mayor en BSS2 EV y en BSS2 GP9. En cambio, a partir de día 20 la expresión de $CD34^+CD41a^+$ es menor con respecto al control sano.

A



B

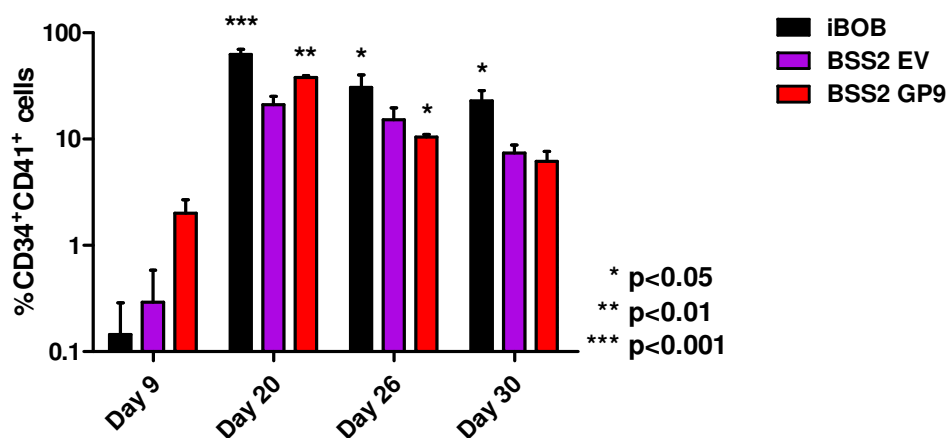


Figura 86. Formación de células progenitoras megacariocíticas CD34⁺CD41a⁺. A. Diagrama representativo de la formación de CD34⁺CD41a⁺ y gráficos de puntos de la obtención de progenitores megacariocíticos por citometría de flujo. B. Cinética de producción de los progenitores megacariocíticos CD34⁺CD41a⁺ obtenidos durante la diferenciación. BSS2 GP9 aumenta la formación de progenitores megacariocíticos respecto a BSS2 EV alcanzando su máximo a día 20, y disminuyendo a partir de día 26. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. Estadística respecto a la línea control del paciente, BSS2 EV.

3.2.4.3. Formación de células CD41a⁺CD42a⁺ de linaje megacariocítico

A lo largo de la diferenciación, se analizó la expresión de células de linaje megacariocítico CD41a⁺CD42a⁺.

La figura 87 muestra un diagrama representativo de la obtención de células CD41a⁺CD42a⁺ junto con imágenes representativas por citometría de flujo de la expresión de CD41a⁺CD42a⁺ tanto de la línea control del paciente (BSS2 EV) como de la línea rescatada (BSS2 GP9). Las imágenes resultantes de la citometría muestran como la línea BSS2 EV no produce células doble positivo por la ausencia de expresión de CD42a. En cambio, la línea BSS2 GP9 origina células CD41a⁺CD42a⁺, lo que sugiere que se ha logrado el rescate fenotípico esperado.

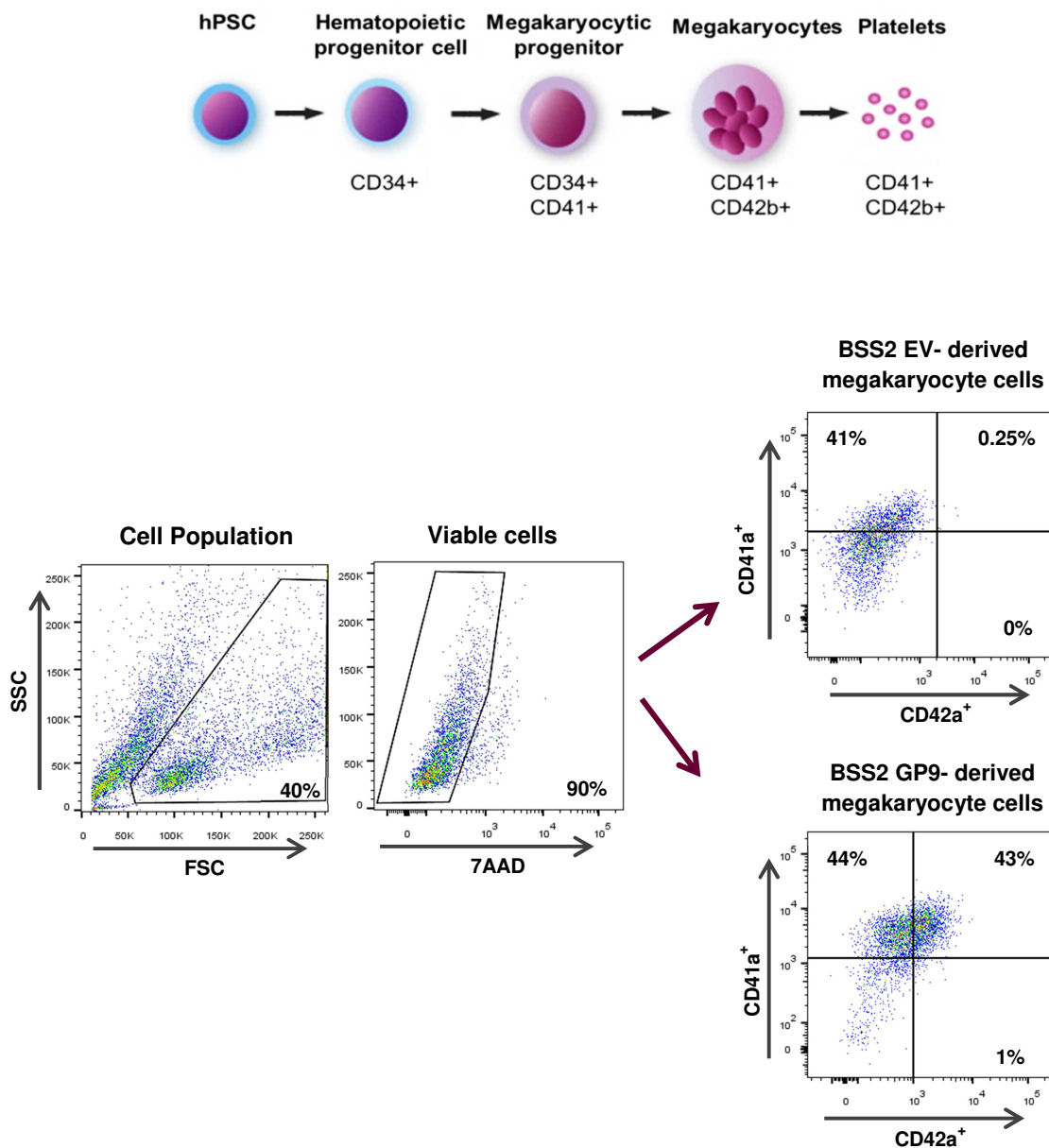
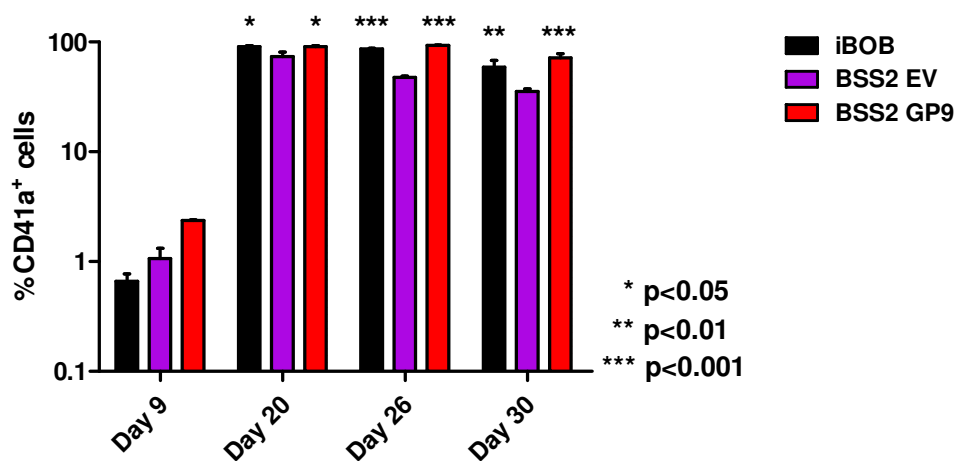


Figura 87. Obtención de células de linaje megacariocítico CD41a⁺CD42a⁺. Diagrama de la obtención de células CD41a⁺CD42a⁺ e imágenes representativas de la formación de células CD41a⁺CD42a⁺ obtenidas por citometría de flujo.

En primer lugar analizamos la expresión de células $CD41a^+$, y comprobamos que la línea control del paciente no presenta problema para originar células $CD41a^+$, alcanzando su máximo a día 20 y disminuyendo su producción a días posteriores. La línea rescatada, BSS2 GP9 presenta una mayor producción de células $CD41a^+$ respecto a BSS2 EV y de forma significativa a día 20 ($p<0.05$) y a días 26 y 30 ($p<0.001$). Además, la producción de células $CD41a^+$ de BSS2 GP9 es similar a la línea control sana, iBOB (Figura 88A).

Por otra parte, cuando analizamos la obtención de células $CD42a^+$ para comprobar si la línea rescatada recupera la expresión de GPIX/CD42a, observamos que la línea BSS2 EV no tiene la capacidad de generar este tipo de células por su deficiencia en *GP9*. En cambio, la línea BSS2 GP9 logra recuperar el fenotipo, siendo capaz de producir células $CD42a^+$ respecto a la línea BSS2 EV y de forma significativa ($p<0.001$). Además, el rescate de la línea BSS2 GP9 ha sido lo suficientemente efectivo como para producir células $CD42a^+$ de forma similar a la línea control sana iBOB (Figura 88B).

A



B

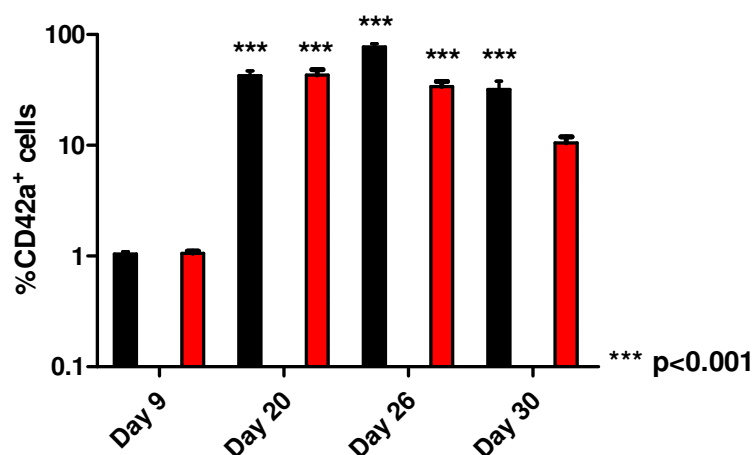


Figura 88. Obtención de células de linaje megacariocítico $CD41a^+$ y $CD42a^+$. A. Cinética de formación de células $CD41a^+$. BSS2 GP9 produce más cantidad de células $CD41a^+$ respecto a BSS2 EV y de forma similar respecto a iBOB. B. Obtención de células $CD42a^+$. La línea BSS2 EV no produce células $CD42a^+$ debido a la mutación que presenta en *GP9*. En cambio, la línea rescatada sí expresa de forma eficiente la proteína CD42a y de forma similar a iBOB. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. Estadística respecto a la línea BSS2 EV.

Por último, cuando analizamos la formación de células doble positivo $CD41a^+CD42a^+$, observamos que la línea BSS2 GP9 genera células $CD41a^+CD42a^+$ de forma significativa a día 20 ($p<0.001$) y a día 26 ($p<0.05$), con respecto al control del paciente, que no presenta células doble positivo por su ausencia de expresión de CD42a. Al comparar la línea rescatada con el control sano podemos ver como a días tempranos de la diferenciación la formación de $CD41a^+CD42a^+$ es muy similar, alcanzando su máximo a día 20. Por tanto, podemos concluir que el rescate génico de la línea celular BSS2 GP9 ha sido eficiente pudiendo rescatar la expresión de la proteína GPIX respecto al control del paciente (Figura 89).

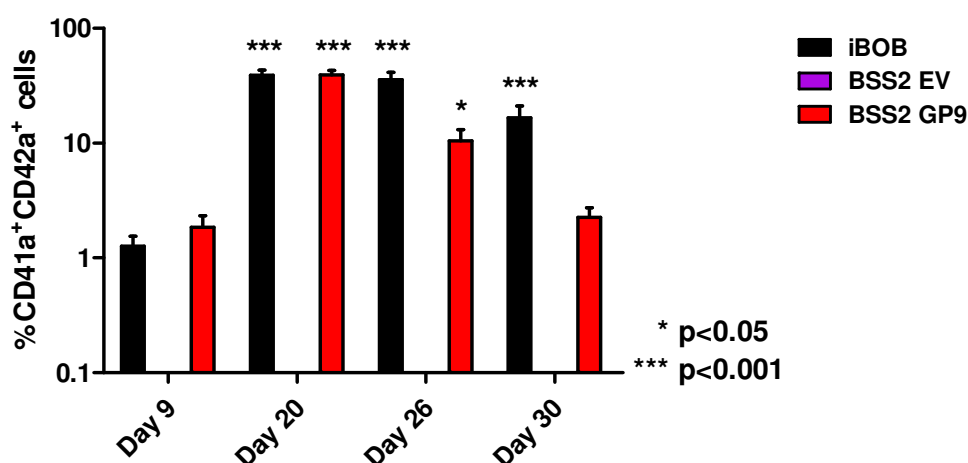


Figura 89. Obtención de células de linaje megacariocítico doble positivo $CD41a^+CD42a^+$. La línea BSS2 EV no expresa células con doble marcaje por la ausencia de CD42a. BSS2 GP9 sí expresa células $CD41a^+CD42a^+$, lo que sugiere que el rescate génico ha sido eficiente. Los datos representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes. Estadística respecto a la línea BSS2 EV.

3.2.5. Expresión de la proteína GPIX

La técnica ImageStream se usó para visualizar la expresión de la proteína GPIX presente en la superficie de la membrana celular de células $CD41a^+CD42a^+$ durante la diferenciación a megacariocitos. Esta metodología combina la microscopía óptica junto con la citometría de flujo y por tanto, nos permitía visualizar la expresión de la proteína GPIX.

A día 20, se colectaron las células de BSS2 EV y BSS2 GP9 para ser analizadas por Amnis ImageStream^x Mk II Imaging Flow Cytometer.

Las imágenes resultantes muestran la morfología redondeada de la célula (brightfield), la expresión de CD41a, la expresión de CD42a, el núcleo celular de color azul por la tinción Hoescht y la célula con el marcaje total (Merge). Observamos expresión de CD42a en la línea rescatada, BSS2 GP9, respecto al control que solo muestra expresión de CD41a (Figura 90).

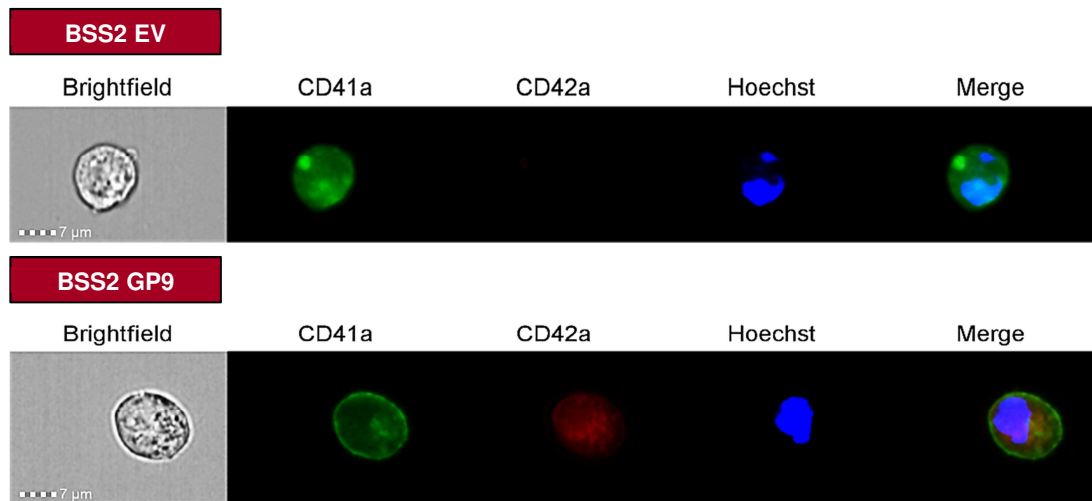


Figura 90. Expresión de las proteínas CD41a y CD42a en la membrana celular de las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 mediante Amnis ImageStreamX Mk II Imaging Flow Cytometer. La línea BSS2 GP9 muestra expresión de CD42a en la membrana celular respecto a la línea BSS2 EV que solo muestra expresión de CD41a.

En base a nuestros resultados, podemos concluir que la terapia génica aplicada a la línea BSS2 GP9 por transducción lentiviral expresando de forma ectópica el gen *GP9* silvestre ha logrado rescatar el fenotipo de la mutación causante del modelo BSS2, logrando producir células megacariocíticas CD42a⁺.

DISCUSIÓN

Los procesos biológicos responsables del desarrollo del sistema hematopoyético han sido principalmente estudiados en modelos de ratón o pez cebra. A partir de estos modelos animales hemos obtenido la mayoría del conocimiento actual sobre el proceso de la hematopoyesis. La comprensión del desarrollo del sistema hematopoyético humano es de gran relevancia biológica y clínica. Necesitamos entender los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo y el mantenimiento de las células hematopoyéticas para conocer la biología de la hematopoyesis. La extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales no es siempre apropiada porque existen grandes diferencias entre individuos de diferente especie. Por este motivo, las hPSC suponen el mejor modelo celular para estudiar los mecanismos que gobiernan la embriogénesis humana. El estudio de los factores y los procesos que dirigen el desarrollo hematopoyético en hPSC supone un gran avance en la comprensión de la biología del desarrollo hematopoyético humano. Este conocimiento es crucial para el estudio de la biología de enfermedades hematopoyéticas y para mejorar las terapias celulares actuales, como el trasplante de médula ósea, y en un futuro la generación eficiente de células hematopoyéticas funcionales capaces de reconstituir el sistema hematopoyético de pacientes. Además, las hPSC no sólo permiten el ensayo *in vitro* de diferentes fármacos para el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas, sino que también permiten la generación de modelos humanos de enfermedad a partir de células derivadas de los propios pacientes. La reprogramación celular ha supuesto uno de los grandes avances en la investigación reciente en el campo de la medicina regenerativa.

RUNX1 es un regulador clave de la hematopoyesis que se requiere para el funcionamiento normal del sistema hematopoyético^{142, 189}. Presenta distintas isoformas que se generan por *splicing* alternativo, siendo las más estudiadas las isoformas *RUNX1a*, *RUNX1b* y *RUNX1c*. Nuestro estudio demuestra que la sobreexpresión de cada una de las diferentes isoformas de *RUNX1* modifica la hematopoyesis embrionaria, lo que sugiere que cada isoforma tiene una función específica en el desarrollo del sistema hematopoyético.

En primer lugar, llevamos a cabo la transducción viral de la línea original PBMC1-iPS4F1 mediante la expresión de las tres isoformas de *RUNX1*. Una vez comprobada que la transducción lentiviral había sido efectiva, verificamos la expresión proteica de las diferentes isoformas y posteriormente, la pluripotencia de las líneas generadas, característica fundamental que permite a las hPSC poder diferenciarse a cualquier linaje celular del organismo. Cuando llevamos a cabo la diferenciación hematopoyética de las isoformas comprobamos que mostraban diferentes patrones de diferenciación. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos que reportan un patrón diferencial de expresión de las isoformas de *RUNX1* durante la diferenciación de hESC a células hematopoyéticas^{169, 513}.

Al analizar la generación de progenitores endoteliales, observamos que las tres isoformas analizadas presentan una mayor producción a días tempranos de la diferenciación hematopoyética, sin embargo a días posteriores su producción disminuye, tal y como ocurre en el desarrollo de la hematopoyesis humana. En cambio, cuando analizamos la generación de HEP, observamos que la isoforma *RUNX1a* incrementa la producción de estos progenitores durante la diferenciación hematopoyética respecto al control. De igual manera, cuando observamos la diferenciación a células progenitoras hematopoyéticas CD41a⁺CD45⁺, *RUNX1a* aumenta la producción de estas células respecto al control. En cambio, el resto de las isoformas solo presenta mayor generación de progenitores CD41a⁺CD45⁺ a días tempranos de la diferenciación respecto al control. Cuando analizamos la aparición de los MEP, observamos que las líneas iPS4F1-*RUNX1a* y iPS4F1-*RUNX1c* producen más células progenitoras CD41a⁺CD235a⁺ a días tempranos de la diferenciación

respecto al control. En cambio la isoforma *RUNX1b* no produce ningún efecto en la generación de estas células respecto al control. Por tanto, según nuestros resultados concluimos que la isoforma *RUNX1a* incrementa en mayor porcentaje la producción de HEP y progenitores hematopoyéticos, con respecto al control y al resto de las isoformas.

Estudios previos sobre la isoforma *RUNX1a* apoyan los resultados obtenidos en este proyecto. La expresión forzada de *RUNX1a* humano en células hematopoyéticas primitivas de ratón incrementa la expansión de progenitores hematopoyéticos con capacidad de diferenciación multilinaje. Además, la expresión de *RUNX1a* en estas células mejoró el mantenimiento del potencial progenitor primitivo tanto *in vitro* como *in vivo*⁵¹⁴. Otro estudio reporta que la expresión ectópica de *Runx1a* en células de ratón se asocia con la sobre-regulación de genes esenciales en el desarrollo de las HSC como *Hoxa9*, *Meis1*, *Stat1* y *Ski*, por lo que actúa regulando el mantenimiento y expansión *in vitro* e *in vivo* de los progenitores hematopoyéticos y células hematopoyéticas⁵¹⁵. Estudios más recientes, avalan que la isoforma *RUNX1a* potencia el linaje hematopoyético a partir de hESC y hiPSC. En un sistema definido de diferenciación a hematopoyesis, la expresión ectópica de *RUNX1a* en hPSC facilita la aparición de progenitores hematopoyéticos con capacidad de diferenciación a múltiples linajes hematopoyéticos⁵¹⁶.

Por otra parte, se ha reportado que la isoforma *RUNX1b* disminuye la capacidad de formar progenitores hematopoyéticos. Estudios previos en ratón demuestran que la isoforma *Runx1b* presenta una reducida capacidad para formar progenitores hematopoyéticos, respecto a la isoforma *Runx1a* y a su línea control^{169, 514}. Estudios más recientes, muestran que la sobre-expresión de *RUNX1b* reduce la hematopoyesis derivada de hESC. La obtención de células CD34⁺CD43⁺ y células CD34⁺CD45⁺ se encuentra más reducida a días tardíos de la diferenciación respecto a la línea control, sugiriendo que se llega a producir un bloqueo en la diferenciación hematopoyética cuando se induce la expresión ectópica de la isoforma *RUNX1b* en hESC⁵¹⁷. Nuestros resultados apoyan esta teoría, ya que comprobamos como la formación de progenitores hematopoyéticos disminuye a días tardíos respecto al control, siendo mucho más evidente en la producción de los MEP. En cambio, la producción de progenitores endoteliales CD34⁺VE-CAD⁺KDR⁺ a días tardíos de la diferenciación sí es mayor respecto al control. Estos resultados apoyan la teoría de un posible bloqueo en la diferenciación hematopoyética al forzar la expresión de *RUNX1b*.

Por otro lado, existen varios trabajos que reportan que la isoforma *RUNX1c* regula la diferenciación hematopoyética de hESC, sobre todo la generación de HEP a partir del endotelio hemogénico^{243-244, 518}. Previamente, nuestro grupo reportó que *RUNX1c* es la primera isoforma en inducir la formación de los HEP derivados de hESC, y posteriormente comienzan a expresarse las isoformas *RUNX1a* y *RUNX1b* al mismo nivel²⁴⁴. Los datos obtenidos en este proyecto confirman los resultados descritos por Navarro-Montero *et al*²⁴⁴, ya que durante la formación de células CD34⁺CD43⁺ en la diferenciación de hiPSC la isoforma *RUNX1c* promueve una mayor expresión de HEP a días tempranos con respecto a la línea control y al resto de las isoformas, que igualan su nivel de producción a partir de día 8 del cultivo, siendo posteriormente la isoforma *RUNX1a* la que incrementa la producción de HEP a partir de día 11 respecto al resto de las isoformas. Por el contrario, durante la hematopoyesis embrionaria en ratones se ha observado que las isoformas que emergen a partir del promotor P2 (*Runx1a* y *Runx1b*) se expresan antes que las del promotor P1 (*Runx1c*) tanto *in vitro* como *in vivo*²⁰⁵⁻²⁰⁶. Es probable que la regulación del uso de los distintos promotores esté sujeta a diferencias específicas de especie. Parece ser que en ratón las isoformas *Runx1a* y *Runx1b* se expresan pronto en el desarrollo y su expresión se mantiene

constante o aumenta ligeramente mientras que *Runx1c* comienza a expresarse después de *Runx1a* y *Runx1b* con un aumento repentino para luego mantenerse y erigirse como la isoforma que domina en la hematopoyesis fetal y adulta²⁰⁶. Por lo tanto, no se observa un patrón de expresión conservado de las distintas isoformas durante el desarrollo hematopoyético a lo largo de la evolución.

Analizando más en detalle el papel de las isoformas de *RUNX1*, realizamos ensayos de formación de colonias hematopoyéticas, donde se estudia la capacidad clonogénica de las células progenitoras derivadas de las líneas iPS4F1-RUNX1a, iPS4F1-RUNX1b y iPS4F1-RUNX1c durante la diferenciación hematopoyética. Los resultados muestran que la isoforma *RUNX1a* reduce la formación de colonias hematopoyéticas con respecto al control. Esto sugiere que la diferenciación hematopoyética de esta isoforma está más incrementada y avanzada hacia linajes terminales que el resto de las líneas celulares. En cambio, la isoforma *RUNX1b* no produce progenitores capaces de formar colonias hematopoyéticas. Estos resultados ya se han reportado en estudios anteriores. Como hemos mencionado anteriormente, la expresión forzada de *RUNX1b* disminuye la formación de progenitores hematopoyéticos y por tanto se reduce la capacidad de producir colonias hematopoyéticas^{514, 517}. Por otra parte, la isoforma *RUNX1c* incrementa la producción de colonias hematopoyéticas respecto al control, apoyando nuestros resultados ya descritos en Navarro-Montero *et al*²⁴⁴.

A modo de conclusión de este primer objetivo podemos decir que la isoforma *RUNX1a* induce una mayor producción de HEP y células progenitoras hematopoyéticas CD41a⁺CD45⁺ y CD41a⁺CD235a⁺ respecto al resto de isoformas. Por otro lado, la isoforma *RUNX1b* promueve una mayor producción de progenitores endoteliales durante la diferenciación y una mayor producción de HEP y progenitores hematopoyéticos CD41a⁺CD45⁺ a días tempranos de la diferenciación. En cambio, induce una disminución en la generación de MEP. Sin embargo, la isoforma *RUNX1c* induce la generación de HEP, MEP y progenitores CD41a⁺CD45⁺ a días tempranos de la diferenciación. Estos resultados abren un nuevo camino en la investigación del papel de la isoforma *RUNX1a* en la hematopoyesis humana, ya que hasta ahora las isoformas más estudiadas en humanos han sido *RUNX1b* y *RUNX1c*. Dilucidar el papel de estas isoformas en la regulación del sistema hematopoyético humano, en especial *RUNX1a* y *RUNX1c* ampliará el conocimiento del papel de *RUNX1* en la hematopoyesis humana, que hasta ahora ha sido poco estudiado.

Por otra parte, comprender cómo el microambiente fisiológico de la médula ósea regula la actividad de las HSC es fundamental para conocer la biología de las células hematopoyéticas. Además, nos permitirá desarrollar estrategias más eficaces para generar de forma eficiente células hematopoyéticas funcionales que ayuden a reconstituir el sistema hematopoyético *in vivo*. Una de las grandes estrategias es la generación eficiente de megacariocitos y plaquetas *in vitro* para tratar a pacientes que sufren enfermedades hematopoyéticas, sobre todo aquellas que afectan al número y a la función de las plaquetas. Durante años se ha intentado generar megacariocitos y plaquetas funcionales *in vitro* a partir de HSC o de hPSC, pero de momento no se ha conseguido ningún protocolo lo suficientemente eficiente como para producir células de linaje megacariocítico a gran escala y poder aplicarse a la clínica.

Para poder llevar a cabo una producción adecuada es esencial conocer el desarrollo de estas células en la médula ósea. La médula ósea es un tejido muy hipóxico a pesar de su alta vascularidad. El nicho de la médula ósea presenta diferentes concentraciones de O₂, desde el entorno más hipóxico en torno al 1% O₂ en el nicho osteoblástico, hasta la zona de mayor concentración de O₂ en torno al 8% O₂ en el

nicho vascular^{276, 519}. Las diferentes tensiones de O₂ son fundamentales para el desarrollo de la megacariopoyesis y trombopoyesis humana, ya que el crecimiento y formación de los megacariocitos se da en el nicho osteoblástico a bajas concentraciones de O₂ mientras que la maduración ocurre en el nicho vascular donde se liberan las plaquetas a una mayor concentración de O₂^{253, 276, 279}.

Además, debemos destacar el papel fundamental que ejerce el factor de transcripción HIF en todo el mecanismo hipóxico, ya que regula una amplia gama de respuestas celulares y sistémicas frente a la baja tensión de O₂. La hipoxia induce la expresión de genes *HIF*, imprescindibles en las repuestas adaptativas de diversos tipos celulares a la hipoxia²⁸³⁻²⁸⁴. Se ha descrito su implicación de forma favorable en el cultivo de HSC derivadas de cordón umbilical⁵²⁰⁻⁵²¹, en los cultivos de células endoteliales⁵²⁰, de células estromales mesenquimales⁵²²⁻⁵²³, hPSC⁵²⁰ y mESC⁵²⁴ bajo condiciones de hipoxia. Asimismo, estudios previos reportan que las bajas concentraciones de O₂ mejoran el mantenimiento y expansión de las HSC derivadas de cordón umbilical^{522, 525-527}. Además, se ha comprobado una mejora en la diferenciación de mESC y hPSC a células de las 3 capas germinales del embrión. Se ha visto que las mESC bajo hipoxia y mediante la regulación de *Hif1α* potencian su diferenciación a células de endodermo y de pulmón⁵²⁸, estimulan la progresión y actividad osteogénica⁵²⁹, mejoran la capacidad de diferenciación a cardiomiocitos al potenciar la expresión de genes implicados en el desarrollo cardíaco⁵³⁰⁻⁵³¹, ayudan a incrementar la diferenciación a células de linaje neural en combinación con varias citoquinas⁵³²⁻⁵³³ e inducen a hematopoyesis en combinación con TPO⁵³⁴. Por otra parte, el empleo de las bajas condiciones de O₂ también produce un incremento en la generación de células de linaje eritroide a partir de células CD34⁺ humanas en combinación de testosterona⁵²⁶ o mediante la expresión de microARNs⁵³⁵.

En base a los datos recopilados, hipotetizamos que la diferenciación de hPSC a megacariocitos y plaquetas *in vitro* mimetizando el ambiente fisiológico de médula ósea podría ayudar a incrementar la formación de estas células.

Para verificar nuestra hipótesis, y así avanzar en la optimización de los protocolos de diferenciación megacariocítica, hemos estudiado el efecto de la hipoxia en la diferenciación de hESC a megacariocitos y plaquetas CD41a⁺CD42b⁺ empleando la línea celular H9, ampliamente utilizada en nuestro laboratorio para el estudio de la hematopoyesis embrionaria^{240, 244-245}. Para llevar a cabo la diferenciación a megacariocitos utilizamos un protocolo basado en la formación de EBs y co-cultivo con células OP9³⁷⁶. Las células OP9 son ampliamente usadas en las diferenciaciones a células hematopoyéticas derivadas de hESC. Estas células poseen factores que ayudan al desarrollo de la megacariopoyesis y la trombopoyesis³⁷⁵⁻³⁷⁷. Para analizar el efecto de la hipoxia en la megacariopoyesis de la línea H9 aplicamos varias condiciones de O₂ (2% O₂ y 5% O₂) durante el cultivo celular, respecto a las condiciones actuales de cultivo en normoxia (20% O₂). Para simular el ambiente fisiológico de la médula ósea, el cultivo de EBs se realizó al 2% O₂ y el co-cultivo con células OP9 al 5% O₂.

Los resultados obtenidos muestran una reducción de la viabilidad celular, en especial bajo la condición más restrictiva, al 2% O₂. Estos datos ya se habían reportado en estudios previos realizados con células CD34⁺ humanas de cordón umbilical, cultivadas bajo condiciones de hipoxia y trasplantadas a ratones inmunodeficientes. En estos estudios también se observa una disminución en la viabilidad celular de los cultivos bajo hipoxia, en especial al 1% O₂ y al 3% O₂ respecto a los controles al 20% O₂⁵²¹⁻⁵²².

Por el contrario, los resultados obtenidos con respecto a la formación de células progenitoras CD34⁺ indican que la hipoxia induce una selección de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ más eficientes, especialmente la condición al 2% O₂, respecto al control al 20% O₂. De forma similar estudios anteriores demostraron que el cultivo al 5% O₂ de células CD34⁺ humanas derivadas de cordón umbilical incrementaba el trasplante *in vivo*, utilizando ratones NOD/SCID⁵³⁶. También se ha reportado una mejor expansión de células CD34⁺ humanas derivadas de cordón umbilical y cultivadas al 1% O₂ respecto a cultivos al 20% O₂⁵²⁶ y además, una mayor expansión de células CD34⁺ de cordón umbilical humano y capacidad de formación de colonias hematopoyéticas en cultivos al 5% O₂⁵²⁷.

Cuando analizamos la generación del número de células CD41a⁺CD42b⁺ de linaje megacariocítico, observamos que la condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) incrementa la formación de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺ respecto al control al 20% O₂. Por otro lado, al analizar el número de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺, observamos que a días más tempranos de la diferenciación megacariocítica no se produce ningún efecto con respecto al control, pero en cambio, a partir de día 25 del cultivo la condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) aumenta la producción de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺. Hay estudios que reportan una mayor producción de células hematopoyéticas derivadas de hPSC al emplear bajas condiciones de O₂ en sus protocolos de diferenciación durante ciertos días del cultivo celular²²⁵ y una mayor generación de células de linaje megacariocítico²²⁶.

En base a estos resultados, podemos concluir que los cultivos de hPSC usando bajas concentraciones de O₂ potencian la diferenciación hematopoyética, en especial la megacariopoyesis y trombopoyesis, ya que mimetizan las condiciones fisiológicas que encontramos en médula ósea. Por tanto, los resultados obtenidos confirman nuestra hipótesis sobre que la mimetización del ambiente fisiológico de médula ósea incrementa la obtención de células CD41a⁺CD42b⁺ derivadas de hPSC. Estos resultados podrían tener diversas aplicaciones en biotecnología, ya que las plaquetas son células anucleadas y su modificación genética no tendría repercusión en el individuo, además de su producción a gran escala a partir de hPSC para futuras aplicaciones en clínica. De hecho, hay varias compañías biotecnológicas cuyo objetivo es generar eritrocitos y plaquetas humanas *in vitro* a partir de hiPSC para medicina transfusional como la compañía japonesa Megakaryon Corporation (Kyoto, Japón). Esta empresa biotecnológica se encarga de producir plaquetas humanas a partir de hiPSC desarrollando tecnologías que permitan su obtención a gran escala de forma segura y a bajo coste para ser producidas a demanda como tratamientos en medicina clínica.

Para profundizar en la optimización de la generación de megacariocitos derivados de hPSC, quisimos estudiar el efecto combinado de la hipoxia y de SCL en la diferenciación megacariocítica de hPSC. Como se ha mencionado anteriormente, SCL es uno de los reguladores fundamentales del desarrollo de la hematopoyesis normal, del mantenimiento de las HSC y la diferenciación terminal de linaje eritroide y megacariocítico³⁰⁵. Además, su papel en la regulación de la hematopoyesis y megacariopoyesis ha sido muy estudiado en nuestro laboratorio²⁴⁵⁻²⁴⁷. En Toscano *et al*²⁴⁷ reportamos que la expresión constitutiva de SCL incrementa la megacariopoyesis derivada de hPSC. Por esta razón, proponíamos que la combinación de la expresión ectópica de SCL junto con el papel de la hipoxia incrementaría la diferenciación megacariocítica de hPSC. Para estudiar si el efecto combinado de ambos mejoraba la formación de megacariocitos y plaquetas CD41a⁺CD42b⁺, llevamos a cabo la diferenciación a células megacariocíticas de la misma línea celular, AND1 SCL,

empleada en Toscano *et al*²⁴⁷ y reportada como mejor candidata para potenciar la obtención de células CD41a⁺CD42b⁺²⁴⁷. Empleamos el protocolo de diferenciación utilizado con H9 y aplicamos las mismas condiciones de O₂ descritas anteriormente. Los resultados obtenidos muestran un descenso de la viabilidad celular de los cultivos tras ser expuestos a bajas concentraciones de O₂, especialmente al 2% O₂. Estos datos confirmaban los resultados obtenidos anteriormente en la línea H9. Por otra parte, se observa un incremento en la formación de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ bajo condiciones de hipoxia, al igual que ocurría en la línea H9, pero en este caso, el porcentaje de células CD34⁺ obtenidas es mayor bajo hipoxia, lo que sugiere que SCL induce una mayor formación de progenitores CD34⁺. Además, la hipoxia, en especial la condición más severa, promueve una selección más eficiente de progenitores CD34⁺, como ya se ha reportado en varios estudios con células CD34⁺ humanas de cordón umbilical⁵²⁶⁻⁵²⁷.

Cuando analizamos la formación del número de megacariocitos, observamos que la hipoxia disminuye la obtención de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺ hasta día 28 de la diferenciación, respecto al control. En cambio, a días tardíos de la diferenciación las concentraciones bajas de O₂ tienden a incrementar ligeramente la formación de células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺, en especial la condición fisiológica. Estos resultados son opuestos a lo que esperábamos obtener tras combinar las bajas tensiones de O₂ y la expresión forzada de SCL en hPSC. Lo que nos llevó a pensar que la expresión de SCL en hPSC podría verse afectada por la hipoxia. Por otra parte, cuando analizamos la producción de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺, observamos que las bajas tensiones de O₂ tienden a aumentar ligeramente la formación de estas células a partir de día 28 respecto al control, tal y como sucedía con las células megacariocíticas CD41a⁺CD42b⁺. Aunque, en este caso la condición fisiológica (2% O₂- 5% O₂) y el 5% O₂ inducen ligeramente la obtención de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺ a días tempranos de la diferenciación, con respecto al control. Estos resultados indican que la hipoxia podría estar promoviendo una selección de plaquetas CD41a⁺CD42b⁺ al igual que ocurre con la obtención de progenitores hematopoyéticos CD34⁺, a pesar de que a días tempranos de la diferenciación se vea reducida la formación de células CD41a⁺CD42b⁺ megacariocíticas por la posible inhibición de la expresión de SCL a causa de las bajas tensiones de O₂. Aun así, necesitaríamos más estudios para poder confirmar esta teoría.

En base a los resultados obtenidos en la diferenciación megacariocítica de la línea AND1 SCL, estudiamos la posible degradación de SCL bajo condiciones de hipoxia. Estudios anteriores habían demostrado que SCL es degradado bajo condiciones de hipoxia en células endoteliales⁵⁰⁶. Además, en la diferenciación de progenitores hematopoyéticos humanos a células eritroides sometidos a bajas concentraciones de O₂ se ha observado una reducción de la expresión de TF implicados en el desarrollo de células de linaje eritroide como EKLF, GATA1 y SCL⁵⁰⁷. Para confirmar que la reducción del número de células megacariocíticas maduras (CD41a⁺CD42b⁺) tras combinar la hipoxia y la expresión ectópica de SCL podría estar ocasionada por la degradación de la proteína SCL al estar expuesta a bajas condiciones de O₂, analizamos la expresión proteica de SCL durante 6 días de cultivo al 20% O₂, 5% O₂ y 2% O₂. Nuestros resultados confirmaron la reducción de la expresión de la proteína SCL bajo condiciones de hipoxia. La expresión de SCL disminuye con el tiempo de exposición a las bajas condiciones de O₂, en especial al 2% O₂, llegándose a perder por completo la expresión al tercer día del cultivo. Nuestros resultados confirman los datos ya reportados en los artículos mencionados. En Tang *et al*⁵⁰⁶ analizan la

expresión proteica de SCL en células endoteliales durante 24h al 20% O₂ y al 1% O₂. Al 1% O₂ se observa una pérdida casi completa de la expresión proteica a las 24h. En Rogers *et al.*⁵⁰⁷ diferencian HPC humanas a células eritroides y analizan la expresión de *EKLF*, *GATA1* y *SCL* al 10% O₂, 7% O₂, 5% O₂ y 2% O₂ durante 8 días. Al 2% O₂, la expresión de *SCL* se ve más reducida en comparación al resto de condiciones. Además, miden la expresión de la proteína SCL en células progenitoras eritroides al 20% O₂ y al 5% O₂ durante 12 días y observan la pérdida de expresión de SCL a lo largo de los días al 5% O₂. Por otra parte, en células endoteliales se demuestra que la degradación de SCL se lleva a cabo mediante la fosforilación por MAPK activada por las bajas concentraciones de O₂ que conducen a la degradación de la proteína por el proteosoma, y para ello emplean varios inhibidores de la ruta transcripcional de SCL⁵⁰⁶.

En base a esta bibliografía y para completar nuestro estudio sobre la degradación de SCL en hipoxia, analizamos las posibles vías de degradación de la proteína en la línea AND1 SCL bajo condiciones de hipoxia utilizando varios inhibidores de diferentes rutas de señalización que pueden regular la actividad transcripcional de SCL. Cultivamos la línea celular AND1 SCL al 20% O₂ y al 2% O₂ durante 24h y utilizamos los inhibidores PD98059 (inhibidor MAPK) y LY 294002 (inhibidor PI3K) para evitar la fosforilación de SCL y MG132 para inhibir la degradación proteica por el proteosoma. Tras analizar la expresión proteica mediante western blot, observamos que PD98059 y MG132 recuperan la expresión de la proteína SCL. Por tanto, nuestros resultados confirman los datos reportados anteriormente por Tang *et al.*⁵⁰⁶ En conclusión, la proteína SCL en hPSC también es fosforilada mediante MAPK-K1, inducida por las bajas concentraciones de O₂, y posteriormente es degradada por el proteosoma. Estos datos avalan la reducción de la obtención de células CD41a⁺CD42b⁺ en AND1 SCL bajo condiciones de hipoxia. Como se conocen los residuos de SCL que son fosforilados por MAPK-K1, una posibilidad podría ser realizar mutagénesis dirigida de los mismos y ver si estos mutantes de SCL se vuelven independientes de las condiciones de hipoxia. A continuación, se tendría que evaluar si potencian la diferenciación megacariocítica de hPSC. De esta manera se podría combinar los efectos positivos tanto de la hipoxia como de SCL en un mismo protocolo de diferenciación.

En base a los resultados obtenidos de nuestro segundo objetivo, podemos concluir que la hipoxia, especialmente las tensiones de O₂ que imitan el ambiente fisiológico de la médula ósea, ayuda a incrementar la diferenciación a megacariocitos y plaquetas. Por otra parte la sobre-expresión de TF implicados en el desarrollo del linaje megacariocítico también potencia la formación de células megacariocíticas maduras (CD41a⁺CD42b⁺). Para combinar ambos efectos y potenciar la diferenciación y generación de células hematopoyéticas derivadas de hPSC habrá que tener en cuenta como las bajas tensiones de O₂ afectan a la estabilidad proteica y a la ruta transcripcional de dichos factores.

La tercera parte de nuestro estudio se ha centrado en el uso de hiPSC de pacientes con enfermedades congénitas que ocasionan trombocitopenias para generar modelos humanos de estas enfermedades. La generación de estos modelos permite estudiar la biología y los mecanismos moleculares involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, así como el componente genético responsable de la progresión de la enfermedad. La falta de modelos experimentales humanos adecuados ralentiza la investigación sobre estas enfermedades y el avance en el descubrimiento de nuevas terapias, ya que los modelos animales que se han generado sobre algunas

enfermedades no aportan suficientes datos por las diferencias existentes entre especies.

En este proyecto hemos llevado a cabo la generación de varios modelos humanos de dos trastornos plaquetarios hereditarios: FPDMM y BSS. Ambos trastornos presentan muy baja prevalencia y se caracterizan por trombocitopenias y sangrados. La producción de plaquetas funcionales *in vitro* supondría un gran avance en el tratamiento de estos pacientes, ya que sustituiría las transfusiones constantes que necesitan estos pacientes y reduciría el riesgo de aloinmunización, además de constituir un sistema independiente de donante.

Hemos generado un modelo humano de FPDMM, un trastorno hereditario causado por mutaciones en el gen *RUNX1* y caracterizado por presentar trombocitopenia, función plaquetaria anormal y predisposición a desarrollar otros trastornos plaquetarios o neoplasias mieloides^{381, 432}. Llevamos a cabo la reprogramación celular de una paciente con FPDMM que presenta la mutación p.Thr196Ala en el exón 6 del gen *RUNX1*. Esta mutación es nueva y aún no había sido descrita su patología en FPDMM. Su detección se realizó a partir de un proyecto colaborativo con el Hospital Clínico Universitario de Salamanca y el Centro de Hemodonación de Murcia. En este proyecto realizamos la reprogramación celular de las PBMC de la paciente mediante la transducción con SeV que portan los factores de reprogramación de Yamanaka, Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc¹²⁻¹³ usando CytoTune®-iPS 2.0 Reprogramming kit. Las células se cultivaron en medio StemSpan™ SFEM sobre una capa de hMSC y posteriormente se adaptaron al medio hESC. Desde el día 4 hasta el día 20 post-transducción, las células se cultivaron a 37°C, 5% O₂ y 5% CO₂, ya que previamente en nuestro laboratorio comprobamos que las células reprogramadas de pacientes crecían y formaban colonias hiPSC de manera más eficiente en cultivos al 5% O₂. Además, otros trabajos reportan las ventajas de la hipoxia durante el proceso de reprogramación para incrementar la eficiencia en la derivación de iPSC, tanto en células de ratón como en células humanas. Se ha demostrado que el cultivo al 5% O₂ aumenta la eficiencia de reprogramación de células de fibroblastos de ratón a miPSC y células de fibroblastos humanos a hiPSC⁵³⁷. Estos resultados indican que el uso de la hipoxia es una estrategia eficaz para incrementar la eficiencia de reprogramación.

A partir de día 13 post-transducción comenzaron a emerger las primeras colonias hiPSC y una vez establecidas en cultivo, a día 20 post-transducción se trasladaron a las condiciones de cultivo estándar (37°C, 20% O₂ y 5% CO₂). Las PBMC atraviesan distintas fases durante la reprogramación celular hasta que finalmente se convierten en iPSC maduras. Durante estas fases de transición va cambiando su estructura y morfología celular. En un principio, las PBMC son células pequeñas redondeadas y brillantes, cuando son transducidas con los SeV y los factores de reprogramación se transforman en intermediarios tempranos adquiriendo una morfología más alargada e irregular hasta que con el tiempo se convierten en intermediarios tardíos o iPSC inmaduras con una morfología más típica de colonia pluripotente, y finalmente cuando maduran las colonias presentan la estructura pluripotente característica con bordes más definidos y redondeados. En este proyecto hemos observado todos estos cambios estructurales y morfológicos durante la reprogramación celular y los hemos plasmado mediante fotografías representativas tomadas a microscopía óptica durante las diferentes fases del protocolo de reprogramación.

Una vez establecidas las colonias hiPSC maduras, se llevó a cabo la selección y expansión de seis clones (2, 8, 32, 69, 70 y 73) de hiPSC de la paciente, que fueron sometidos a un cultivo de 39 °C durante 5 días para eliminar por completo los SeV termosensibles. Un mes después de la transducción de las PBMC, comenzamos el proceso de caracterización celular de los clones seleccionados y adaptados al cultivo celular en medio definido E8. Finalmente, para el establecimiento de la línea hiPSC de FPDMM seleccionamos el clon 73 (FPD-PBMC-iPSC4F73) y desarrollamos diversas técnicas genéticas y funcionales requeridas para llevar a cabo la caracterización de la línea celular.

Las técnicas genéticas empleadas para completar la caracterización celular se llevaron a cabo mediante análisis de secuenciación que determinaron la presencia de la mutación p.Thr196Ala, en el exón 6 de *RUNX1*, y mediante análisis STR que confirmaron el origen genético de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73. Posteriormente, realizamos análisis moleculares que determinaron la pérdida de expresión de los factores de reprogramación exógenos empleados durante la reprogramación celular y la ganancia de expresión endógena de los genes de pluripotencia *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG*. Además, por técnicas de citometría de flujo se confirmó la expresión de los marcadores celulares de pluripotencia SSEA3, SSEA4, TRA1-81, TRA 1-60 y *OCT3/4*. Los marcadores celulares más comunes para determinar la pluripotencia de hPSC son SSEA3, SSEA4, TRA1-81 y TRA 1-60. Durante la reprogramación celular la expresión de SSEA3 y SSEA4 precede a la expresión de TRA-1-60 y TRA-1-81, que se detectan en etapas posteriores de la reprogramación¹⁷. Por eso, los factores más importantes son TRA-1-60 y TRA-1-81 que marcan estados más avanzados de pluripotencia, junto con SSEA4. Como factores endógenos se destaca la importancia de la expresión de *OCT3/4*, *SOX2* y *NANOG*¹⁷⁻¹⁸.

La adquisición de la capacidad de pluripotencia de la nueva línea hiPSC generada es una característica fundamental para confirmar la eficiencia del proceso de reprogramación celular. Como complemento al estudio de pluripotencia de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73, realizamos ensayos funcionales que determinaron la actividad fosfatasa alcalina en las células hiPSC. En hPSC la fosfatasa alcalina se expresa a altos niveles y por esto, es una técnica muy utilizada como marcador clave de la pluripotencia de las células. En experimentos de reprogramación, esta técnica se emplea para la detección temprana de las hiPSC. Incluso, puede emplearse para identificar las iPSC emergentes tras 14 días post-traducción y así seleccionar las iPSC para su expansión aproximadamente unos 21 días después de la traducción viral con los factores de reprogramación. Además, en algunos casos, el número de colonias positivas para la fosfatasa alcalina representa la eficiencia de reprogramación. Los ensayos de fosfatasa alcalina pueden usarse durante todo el proceso de expansión clonal de las iPSC, así como para colonias ya establecidas^{20, 538}.

Tras confirmar la pluripotencia de la línea FPD-PBMC-iPSC4F73, se procedió a analizar el cariotipo celular mediante técnicas de citogenética que determinaron que la nueva línea hiPSC generada presentaba un cariotipo normal, en este caso 46 XX.

Por último, realizamos ensayos funcionales de diferenciación a las tres capas germinales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo), *in vitro* mediante la formación de EBs e *in vivo* mediante la formación de teratomas en ratones inmunodeficientes. La formación de EBs para testar la pluripotencia y diferenciación a las tres capas germinales es una alternativa a la formación de teratomas *in vivo*. Es una técnica más rentable, controlada y reproducible en comparación a los ensayos *in vivo* con ratones^{24, 539}. Para testar la formación de teratomas, generalmente, se emplean ratones sanos inmunodeficientes. Los ratones NOG son uno de los modelos más usados para testar la formación de tumores, junto con los ratones SCID, NOD-SCID y *nude*. Además, son ampliamente usados en estudios de experimentación animal y de trasplantes de células humanas⁵⁴⁰. La capacidad de diferenciación *in vivo* de cualquier línea hPSC se confirma si el teratoma es capaz de desarrollar tejidos derivados de cada una de las capas germinales embrionarias. La tinción con anticuerpos específicos de las tres capas germinales del embrión permite una identificación más detallada de los tipos de tejido que presentan las muestras de teratoma^{25, 510}.

Ambos ensayos funcionales confirmaron la expresión de marcadores celulares de endodermo (CKAE1-AE3), mesodermo (vimentina) y ectodermo (β -III-Tubulina). Además, hallamos estructuras específicas de las tres capas germinales como el epitelio ciliado (endodermo), el cartílago (mesodermo) y las rosetas neurales (ectodermo).

En conjunto, todos estos resultados demuestran la generación y caracterización celular de manera eficiente de un modelo humano de FPDMM reprogramado a partir de las PBMC de la propia paciente, presentando una mutación no descrita en *RUNX1*⁵⁴¹. Este modelo nos servirá para el estudio de la biología de la enfermedad, en concreto para analizar cómo afecta la mutación p.Thr196Ala al progreso de la enfermedad. Mediante la realización de diferenciaciones hematopoyéticas y megacariocíticas podremos dilucidar el papel de esta mutación en la evolución de la enfermedad. Además, este modelo nos permitirá en un futuro aplicar nuevas terapias para el tratamiento del FPDMM, como la corrección fenotípica mediante terapia génica por lentivirus o la técnica CRISPR-Cas9 introduciendo una copia silvestre de *RUNX1* y validando posteriormente el rescate génico del modelo mediante la generación de megacariocitos *in vitro*. Además, enlazando con nuestro primer objetivo podremos evaluar la función de las diferentes isoformas en el modelo generado de FPDMM, en concreto las isoformas *RUNX1a* y *RUNX1c* que nos aportan datos más interesantes y relevantes durante la diferenciación hematopoyética de las hPSC. Previamente, ya se ha reportado la generación de otras líneas hiPSC de pacientes con FPDMM, que además se han rescatado fenotípicamente mediante la expresión del gen silvestre *RUNX1*⁴⁵¹ o mediante la edición génica del gen *RUNX1* mutado⁴⁵²⁻⁴⁵³. Un estudio más actual sobre la generación de hiPSC de pacientes con FPDMM y corregidas posteriormente por terapia génica, ha identificado a *NOTCH4* como un gen diana de *RUNX1*. Se ha demostrado que la inactivación de *NOTCH4* por CRISPR-Cas9 potencia la megacariopoyesis en las líneas hiPSC de FPDMM⁴⁵⁴. Estos estudios muestran resultados prometedores en la corrección fenotípica de las líneas hiPSC de FPDMM. Por tanto, en base a estos estudios y la novedad de nuestro modelo de FPDMM sería interesante realizar el rescate fenotípico de la mutación y su posterior validación mediante diferenciaciones a linaje megacariocítico, lo que supondría un gran avance en la investigación de este trastorno plaquetario y una posible terapia para pacientes con dicha mutación.

Adicionalmente, hemos generado varios modelos humanos de BSS causados por diferentes mutaciones que afectan al gen *GP9*⁶⁶⁻⁶⁸. BSS es una enfermedad rara causada por la deficiencia congénita del complejo glicoproteico GPIb-IX-V debida a mutaciones en los genes *GP1BA*, *GP1BB* o *GP9* y se caracteriza por presentar trombocitopenia, plaquetas de mayor tamaño y sangrados severos⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁶. En nuestro laboratorio hemos generado tres modelos celulares de BSS mediante la reprogramación celular de las PBMC de tres pacientes con diferentes mutaciones en *GP9*⁶⁶⁻⁶⁸.

En este proyecto nos centramos en el estudio del modelo BSS2-PBMC-iPS4F24 (BSS2) descrito en Lopez-Onieva *et al*⁶⁶ que ha sido rescatado por terapia génica mediante transducción lentiviral portando el gen silvestre *GP9* para corregir la mutación p.Asn45Ser. A consecuencia, del rescate génico del modelo BSS2 se generaron 2 líneas celulares, la línea rescatada (BSS2 GP9) y la línea control del paciente (BSS2 EV). Por tanto, se procedió a comprobar mediante técnicas moleculares la eficiencia de la transducción lentiviral analizando la expresión de *GP9* silvestre. Los resultados mostraron expresión de *GP9* en la línea rescatada, BSS2 GP9, con respecto a la línea control del paciente, BSS2 EV. Tras comprobar que la transducción lentiviral de la línea original BSS2 había sido eficiente, se determinó la pluripotencia de ambas líneas mediante análisis de expresión de los genes endógenos de pluripotencia (*OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG*) por RT-PCR y de expresión de los marcadores celulares de superficie SSEA4, SSEA3, TRA-1-81 y TRA-1-60 por citometría de flujo. Los resultados mostraron que las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 mantenían la capacidad de pluripotencia al expresar los genes endógenos *OCT3/4*, *SOX2*, *REX1* y *NANOG*, y los marcadores de superficie SSEA4, SSEA3, TRA-1-81 y TRA-1-60.

Una vez que confirmamos la pluripotencia de las líneas celulares, llevamos a cabo la validación del rescate génico del modelo BSS2 mediante la diferenciación a linaje megacariocítico empleando un protocolo de diferenciación más actual y novedoso descrito por Moreau *et al*³⁸⁰ que permite la obtención a gran escala de megacariocitos. Escogimos este protocolo de diferenciación en lugar del protocolo anteriormente usado para estudiar los efectos de la hipoxia y de SCL en la diferenciación a megacariocitos reportado en Lu *et al*³⁷⁶, porque se ha reportado una mayor eficiencia en la generación de células megacariocíticas empleando este protocolo, además de ser un protocolo que elimina el empleo de suero y componentes animales^{227, 380}, lo que supone un importante avance en la optimización de protocolos más eficientes en la generación de células megacariocíticas que puedan ser aplicados en clínica en un futuro.

El protocolo descrito por Moreau *et al*³⁸⁰ se basa en la transducción lentiviral de hiPSC expresando de forma ectópica GATA1, SCL y FLI1. Cultivamos las líneas BSS2 EV, BSS2 GP9 y iBOB (línea control sana)⁵¹¹ durante 30 días en medio definido CellGRO en combinación con diferentes citoquinas hematopoyéticas y analizamos durante los días 9, 20, 26 y 30 la obtención de progenitores hematopoyéticos CD34⁺, progenitores megacariocíticos CD34⁺CD41a⁺ y células megacariocíticas CD41a⁺CD42a⁺. Los resultados muestran que la línea BSS2 GP9, incrementa la obtención de progenitores CD34⁺ a días tempranos de la diferenciación con respecto a las líneas BSS2 EV e iBOB. A partir de día 20, la línea BSS2 GP9 reduce la diferencia en cuanto a la obtención de células CD34⁺ con respecto a los controles, siendo ligeramente mayor respecto a la línea BSS2 EV. En cambio, a partir de día 30, la formación de progenitores CD34⁺ disminuyó respecto a la línea BSS2 EV. Si comparamos la obtención de progenitores hematopoyéticos con la línea control sana iBOB, observamos que la formación de células CD34⁺ de las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9

disminuye ligeramente. Estos datos apoyan el fenotipo del paciente con una formación normal de células progenitoras hematopoyéticas. Estudios actuales sobre la generación de hiPSC de pacientes de BSS con mutaciones en los genes *GP1BA* y *GP1BB* reportan datos similares. La formación de progenitores CD34⁺ de las líneas generadas de BSS es de forma similar a la obtención de progenitores hematopoyéticos en la línea control⁴⁹⁸.

De igual manera, cuando analizamos la formación de progenitores megacariocíticos, observamos que la línea rescatada produce más células CD34⁺CD41a⁺ a días tempranos de la diferenciación, con un máximo de expresión a día 20 respecto a la línea control del paciente. A partir de día 26, la línea BSS2 GP9 disminuye ligeramente la formación de progenitores megacariocíticos con respecto a la línea BSS2 EV. Al igual que ocurre con los progenitores hematopoyéticos, si comparamos la obtención de los progenitores megacariocíticos de la línea iBOB con las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9 se observa una formación de progenitores CD34⁺CD41a⁺ ligeramente mayor por parte de la línea iBOB. Estos resultados continúan apoyando el fenotipo del paciente con una formación normal de células progenitoras megacariocíticas. Estudios previos en modelos de ratón de BSS, reportan resultados similares. Los modelos de ratón con deficiencias en *Gplbβ*⁵⁴² o en *Gplbα*⁵⁴³ no inhiben la formación de progenitores megacariocíticos ni la capacidad clonogénica de estos progenitores a pesar de la ausencia del complejo *Gplb-IX-V*. El número de colonias procedentes de los progenitores megacariocíticos, así como de otras colonias hematopoyéticas es similar en los modelo de ratón de BSS y en los modelos de ratón sanos⁵⁴²⁻⁵⁴³.

Cuando examinamos la formación de células megacariocíticas CD41a⁺, observamos que efectivamente la línea BSS2 EV origina células CD41a⁺, con un máximo de producción a día 20 de la diferenciación. A partir de día 26, se aprecia una disminución en la formación de células CD41a⁺. Por otra parte, la línea BSS2 GP9 presenta una producción ligeramente mayor de células CD41a⁺ respecto a la línea BSS2 EV y de forma significativa. Si comparamos la obtención de células CD41a⁺ con la línea control sana iBOB, observamos que la producción de células CD41a⁺ de la línea BSS2 EV es ligeramente menor. En cambio, la formación de células megacariocíticas CD41a⁺ de la línea BSS2 GP9 es muy similar a la línea iBOB. Hasta ahora, observamos que el fenotipo del paciente se sigue conservando, ya que la producción de células CD41a⁺ tampoco se ve afectada a pesar de la ausencia del complejo glicoproteico *GPIb-IX-V*.

Por otro lado, al evaluar la obtención de células CD42a⁺, observamos que la línea BSS2 EV no genera este tipo de células por su deficiencia en *GPIX*. En cambio, la línea BSS2 GP9 sí es capaz de expresar células CD42a⁺ respecto a la línea BSS2 EV, logrando rescatar el fenotipo del paciente. Además, la expresión de CD42a⁺ es muy similar a la línea iBOB hasta el día 20 del cultivo, comenzando a disminuir a partir de día 26. Estos datos sugieren que el rescate de la línea original BSS2 por edición génica ha logrado recuperar la expresión de *GPIX* rescatando el fenotipo del paciente. Estudios previos sobre la generación de modelos de BSS causados por mutaciones en el gen *GP1BA* o *GP1BB* y sus respectivos rescates fenotípicos avalan nuestros resultados. Modelos de ratón de BSS con deficiencias en el gen *Gp1bb* generan células CD41a⁺, al igual que los modelos sanos. La diferencia es que los megacariocitos derivados de los progenitores del modelo BSS no logran formar proplaquetas en comparación a los sanos⁵⁴². También se han reportado estos resultados en modelos humanos recientes de hiPSC de pacientes de BSS con deficiencias en *GPIbα* y *GPIbβ*, generando células CD41a⁺ pero no células CD42b/*GPIbα*, además de una formación deficiente de proplaquetas. El rescate génico de estos modelos por

transducción lentiviral expresando los genes silvestres logra rescatar el fenotipo de los pacientes generando células CD42b⁴⁹⁸.

Por último, examinamos la formación de células doble positivo CD41a⁺CD42a⁺ de linaje megacariocítico y observamos que la línea rescatada forma células CD41a⁺CD42a⁺ con respecto a la línea control del paciente. La línea BSS2 EV no genera células megacariocíticas CD41a⁺CD42a⁺ por la deficiencia que presenta en GPIX. De igual manera que ocurría con la formación de células CD42a⁺, si comparamos la línea rescatada con la línea control sana, observamos que la formación de células CD41a⁺CD42a⁺ es prácticamente igual hasta día 20 de la diferenciación, comenzando a disminuir a partir de día 26. Estos datos confirman el rescate fenotípico del modelo BSS2 y también la eficiencia del protocolo de diferenciación empleado para generar células megacariocíticas. Para complementar estos datos, durante la diferenciación a células de linaje megacariocítico realizamos la técnica ImageStream que nos permitía obtener imágenes visuales de la expresión proteica de GPIX (CD42a) en la membrana de células CD41a⁺CD42a⁺. Las imágenes resultantes muestran las células viables captadas por citometría con una morfología redondeada, el núcleo de la célula de color azul por la tinción Hoescht y la expresión de CD41a y CD42a en la membrana celular de las líneas BSS2 EV y BSS2 GP9. En la línea rescatada se observa expresión de la proteína CD42a respecto a la línea control del paciente que solo presenta expresión de CD41a. El uso de esta técnica nos permitió confirmar de manera visual el rescate de la línea BSS2 GP9.

Estos resultados son avalados por estudios previos con modelos de ratón de BSS con deficiencias en Gplb β mostrando una reducción del número de megacariocitos maduros en comparación con modelos sanos de ratón⁵⁴². Por otra parte, estudios con modelos murinos de BSS rescatados por la expresión transgénica de los genes humanos silvestres también logran recuperar el fenotipo normal logrando generar un número de plaquetas cercano a los modelos sanos y disminuyendo el tiempo de sangrado de la cola⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁷. Un estudio más reciente, similar al nuestro y basado en modelos humanos de pacientes de BSS con deficiencias en *GP1BA* y *GP1BB* reporta el rescate fenotípico de las líneas generadas por terapia génica mediante lentivirus que expresan los genes silvestres. Durante la diferenciación a megacariocitos las líneas rescatadas expresan CD42b, además logran reducir el tamaño de las plaquetas generadas⁴⁹⁸.

Aunque los modelos murinos pueden representar algunos de los fenotipos humanos de BSS, no siempre muestran los cambios patológicos y clínicos que se observan en humanos. Por tanto, es de gran importancia clínica generar modelos humanos de BSS para poder desarrollar futuras terapias génicas en pacientes. Nuestros resultados pueden emplearse como una aproximación curativa de pacientes con BSS que presentan deficiencias en el gen *GP9*, ya que hemos logrado recuperar la expresión de la proteína GPIX por terapia génica lentiviral expresando el gen silvestre, y además hemos generado células de linaje megacariocítico. Asimismo, nuestro modelo celular de hiPSC derivadas de pacientes de BSS puede ser útil para revelar la contribución de GPIX en la funcionalidad del complejo GPIB-IX-V.

CONCLUSIONES

1. Las isoformas del RUNX1 desempeñan funciones diferentes durante la diferenciación hematopoyética de hiPSC *in vitro*.
2. La sobre-expresión de RUNX1a en hiPSC promueve:
 - a. Un aumento en la generación de HEP y progenitores hematopoyéticos CD41a⁺CD45⁺ durante la diferenciación.
 - b. Un aumento de MEP (CD41a⁺CD235a⁺) a días tempranos de la diferenciación.
 - c. Una disminución del potencial clonogénico debido a su estado avanzado a linajes terminales.
3. La sobre-expresión de RUNX1b en hiPSC provoca:
 - a. Un aumento en la formación de progenitores endoteliales durante la diferenciación.
 - b. Un aumento en la generación de HEP y progenitores hematopoyéticos CD41a⁺CD45⁺ a días tempranos de la diferenciación.
 - c. Una disminución en la generación de MEP durante la diferenciación.
 - d. Un bloqueo en la formación de colonias hematopoyéticas.
4. La sobre-expresión de RUNX1c en hiPSC aumenta:
 - a. La generación de HEP, progenitores hematopoyéticos CD41a⁺CD45⁺ y progenitores CD41a⁺CD235a⁺ a días tempranos de la diferenciación.
 - b. El potencial clonogénico y estimula la especificación hacia granulocitos y monocitos.
5. Las diferentes condiciones de hipoxia reducen la viabilidad celular de las hESC durante la diferenciación megacariocítica *in vitro*.
6. La hipoxia promueve la selección de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ durante la diferenciación de hESC a células de linaje megacariocítico.
7. La condición fisiológica (2% O₂-5% O₂) incrementa la formación de células megacariocíticas maduras (CD41a⁺CD42b⁺) y plaquetas a partir de hESC.
8. En hESC que sobre-expresan SCL, las diferentes condiciones de hipoxia reducen la formación de células megacariocíticas maduras (CD41a⁺CD42b⁺) y plaquetas.
9. Las condiciones de hipoxia inducen la degradación de SCL por el proteosoma de manera dependiente de la fosforilación de MAPK.

10. Se ha generado y caracterizado una nueva línea hiPSC de FPDMM por la reprogramación celular de PBMC de una paciente que posee la variante p.Thr196Ala en el gen *RUNX1*
11. Se ha generado un modelo humano de BSS rescatado por transducción lentiviral del gen humano *GP9* wildtype (BSS2 GP9).
12. La línea celular BSS2 EV y la línea celular rescatada BSS2 GP9 presentan una producción similar de progenitores hematopoyéticos CD34⁺ y progenitores megacariocíticos CD34⁺CD41a⁺ durante la diferenciación megacariocítica *in vitro*.
13. La línea celular rescatada BSS2 GP9 genera más progenitores CD41a⁺ que la línea celular BSS2 EV.
14. La línea celular BSS2 EV no progresa hasta progenitores megacariocíticos CD42a⁺ y células megacariocíticas maduras CD41a⁺CD42a⁺ durante la diferenciación megacariocítica *in vitro*, recapitulando el fenotipo de BSS.
15. La línea celular rescatada BSS2 GP9 origina tanto progenitores CD42a⁺ como células megacariocíticas maduras (CD41a⁺CD42a⁺), logrando recuperar la expresión de GPIX (CD42a) en la superficie celular.

CONCLUSIONS

1. RUNX1 isoforms play different roles during *in vitro* hematopoietic differentiation of hiPSC.
2. In hiPSC RUNX1a overexpression promotes:
 - a. An increase in the generation of HEP and CD41a⁺CD45⁺ hematopoietic progenitors.
 - b. An increase in MEP (CD41a⁺CD235a⁺) at early days of *in vitro* differentiation.
 - c. A decrease in clonogenic potential due to its advanced status to terminal hematopoietic lineages.
3. RUNX1b over-expression causes:
 - a. An increase in the formation of endothelial progenitors during differentiation.
 - b. An increase in the generation of HEP and CD41a⁺CD45⁺ hematopoietic progenitors at early days of *in vitro* differentiation.
 - c. A decrease in the generation of MEP (CD41a⁺CD235a⁺) at early days.
 - d. A blockage in the formation of hematopoietic colonies.
4. RUNX1c over-expression increases:
 - a. Generation of HEP, CD41a⁺CD45⁺ hematopoietic progenitors and MEP (CD41a⁺CD235a⁺) at early days.
 - b. Clonogenic potential and stimulates hematopoietic specification towards granulocytes and monocytes.
5. All experimental hypoxic conditions reduce the cellular viability of hESC during *in vitro* megakaryocytic differentiation.
6. Hypoxia promotes the selection of CD34⁺ hematopoietic progenitors during megakaryocytic differentiation from hESC.
7. The physiological condition (2% O₂- 5% O₂) increases the formation of mature megakaryocytic cells (CD41a⁺CD42b⁺) and platelets from hESC.
8. In SCL-overexpressing hESC, all experimental hypoxic conditions reduce the generation of mature megakaryocytic cells (CD41a⁺CD42b⁺) and platelets.
9. Under hypoxic conditions, SCL is degraded by the proteasome in a MAPK-dependent manner.

10. A new hiPSC line of FPDMM has been generated and characterized by cell reprogramming of PBMC of a FPDMM patient with carrying a p.Thr196Ala variant in *RUNX1* gene.
11. A human model of rescued BSS has been generated by lentiviral transduction of the wildtype *GP9* human gene (BSS2 GP9).
12. Both hiPSC cell lines BSS2 EV and BSS2 GP9 have a similar production of CD34⁺ hematopoietic progenitors and CD34⁺CD41a⁺ megakaryocytic progenitors during *in vitro* megakaryocytic differentiation.
13. BSS2 GP9 cell line produces more CD41a⁺ progenitor cells than the BSS2 EV cell line.
14. BSS2 EV cell line does not progress to generate CD42a⁺ or mature megakaryocytes (CD41a⁺CD42a⁺) during megakaryocytic differentiation, recapitulating the BSS phenotype.
15. BSS2 GP9 cell line originates both CD42a⁺ and mature megakaryocytes (CD41a⁺CD42a⁺), managing to recover the expression of GPIX (CD42a) on the cell surface.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boklage C. Chapter 2: Human Embryogenesis. In: Embryogenesis. Ken-Ichi Sato, ed Croatia: InTech, 2012;1–27.
2. Chiras. Human Biology, Ninth Edition. Corona, CA, U.S.A: Jones & Bartlett Learning, 2018.
3. Marieb, Elaine N. Human Anatomy & Physiology, Sixth Edition. New York: Benjamin Cummings, 2003.
4. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969;221:632–635.
5. Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Fertilization and Cleavage in vitro of Preovulator Human Oocytes. *Nature* 1970;227:1307–1309.
6. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366.
7. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, et al. Human pre-implantation embryo development. *Development* 2012;139:829–841.
8. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–156.
9. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634–7638.
10. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–1147.
11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
12. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.
13. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917–1920.
14. Niwa H. Chapter 7. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. In: *Essentials of Stem Cell Biology*, Third Edition. Lanza R, Atala A, eds. Boston: Academic Press, 2014:81–94.
15. Heng J-CD, Ng H-H. Transcriptional regulation in embryonic stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2010;695:76–91.
16. Hammachi F, Morrison GM, Sharov AA, et al. Transcriptional Activation by Oct4 Is Sufficient for the Maintenance and Induction of Pluripotency. *Cell Reports* 2012;1:99–109.
17. Abujarour R, Valamehr B, Robinson M, et al. Optimized Surface Markers for the Prospective Isolation of High-Quality hiPSCs using Flow Cytometry Selection. *Sci Rep* 2013;3.
18. Bharathan SP, Manian KV, Aalam SMM, et al. Systematic evaluation of markers used for the identification of human induced pluripotent stem cells. *Biol Open* 2017;6:100–108.
19. Lu H-E, Tsai M-S, Yang Y-C, et al. Selection of alkaline phosphatase-positive induced pluripotent stem cells from human amniotic fluid-derived cells by feeder-free system. *Experimental Cell Research* 2011;317:1895–1903.

20. Singh U, Quintanilla RH, Grecian S, et al. Novel Live Alkaline Phosphatase Substrate for Identification of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev* 2012;8:1021–1029.
21. Benn P.A, Perle, M.A. Charter 4: Chromosome staining and banding techniques. In: *Human Cytogenetics: Constitutional Analysis : a Practical Approach*, Third edition. Rooney DE, Czepulkowski B, eds. London, UK: Oxford University Press, 2001.
22. Lichtman MA, Shafer JA, Felgar RE, et al. *Lichtman's atlas of hematology*. New York, USA: The McGraw-Hill Companies, 2016.
23. A map of human genome variation from population scale sequencing. *Nature* 2010;467:1061–1073.
24. Schell JP. Chapter 23: Spontaneous Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells via Embryoid Body Formation. In: *Human Stem Cell Manual, Second Edition*. Loring JF, Peterson SE, eds. Boston: Academic Press, 2012:363–373.
25. Nelakanti RV, Kooreman NG, Wu JC. Teratoma Formation: A Tool for Monitoring Pluripotency in Stem Cell Research. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2015;32:4A.8.1–4A.8.17.
26. Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells. *Cell* 2017;168:473–486.e15.
27. Gómez-Salvago Sánchez C. Sobre la aplicación extensiva de las funciones del Banco Nacional de Líneas Celulares Embrionarias y Adultas a las Líneas Celulares IPS: una interpretación a la luz del art. 3.1 del Código Civil. *Revista de Bioética Y Derecho* 2014:3–20.
28. Meregalli M, Farini A, Torrente Y. Chapter 17: Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases. In: *Stem Cells in Clinic and Research*. Gholamrezanezhad A, ed. Johns Hopkins University, United States of America: InTech, 2011:437–468.
29. Stephenson E, Jacquet L, Miere C, et al. Derivation and propagation of human embryonic stem cell lines from frozen embryos in an animal product-free environment. *Nat Protoc* 2012;7:1366–1381.
30. Taei A, Hassani S-N, Eftekhari-Yazdi P, et al. Enhanced generation of human embryonic stem cells from single blastomeres of fair and poor-quality cleavage embryos via inhibition of glycogen synthase kinase β and Rho-associated kinase signaling. *Hum Reprod* 2013;28:2661–2671.
31. Zdravkovic T, Nazor KL, Larocque N, et al. Human stem cells from single blastomeres reveal pathways of embryonic or trophoblast fate specification. *Development* 2015;142:4010–4025.
32. Mai Q, Yu Y, Li T, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Research* 2007;17:1008–1019.
33. Turovets N, Semechkin A, Kuzmichev L, et al. Chapter 4: Derivation of human parthenogenetic stem cell lines. *Human Pluripotent Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Schwartz PH, Wesselschmidt RL, eds. United States of America. Humana Press, 2011;767:37–54.
34. Yu Z, Han B. Advantages and limitations of the parthenogenetic embryonic stem cells in cell therapy. *Journal of Reproduction and Contraception* 2016;27:118–124.
35. Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* 2013;153:1228–1238.

36. Deuse T, Wang D, Stubbendorff M, et al. SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. *Cell Stem Cell* 2015;16:33–38.
37. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* 2009;324:797–801.
38. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010;7:618–630.
39. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* 2009;85:348–362.
40. Zhou W, Freed CR. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 2009;27:2667–2674.
41. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011;8:409–412.
42. Park HY, Noh EH, Chung H-M, et al. Efficient generation of virus-free iPS cells using liposomal magnetofection. *Plos One* 2012;7:e45812.
43. Smith ZD, Nachman I, Regev A, et al. Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat Biotechnol* 2010;28:521–526.
44. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010;24:2239–2263.
45. De Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: A new source for cell-based therapeutics? *Journal of Controlled Release* 2014;185:37–44.
46. Barad L, Schick R, Zeevi-Levin N, et al. Human Embryonic Stem Cells vs Human Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiac Repair. *Canadian Journal of Cardiology* 2014;30:1279–1287.
47. Fox JG, Barthold S, Davisson M, et al., editors. *The Mouse in Biomedical Research, Volume 3: Normative Biology, Husbandry, and Models*. Second edition. Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2006.
48. Schmid M. *Vertebrate Genomes. Volume 2: Genome Dynamics*. First edition. Volff J-N ed. Basel; New York: S. Karger, 2006.
49. Khanna R, Burrows SR. Human immunology: a case for the ascent of non-furry immunology. *Immunology & Cell Biology* 2011;89:330–331.
50. Kurreck J, Stein CA. *Molecular Medicine: An Introduction*. John Wiley & Sons, 2015.
51. Kaitin KI. Obstacles and Opportunities in New Drug Development. In: *Clinical Pharmacology & Therapeutics. Innovations in Drug Development*. Scott A. Waldman, ed. New Jersey, USA 2008; 83:2:210–212.
52. Cayo MA, Mallanna SK, Di Furio F, et al. A Drug Screen using Human iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Reveals Cardiac Glycosides as a Potential Treatment for Hypercholesterolemia. *Cell Stem Cell* 2017;20:478–489.e5.

53. Del Álamo JC, Lemons D, Serrano R, et al. High throughput physiological screening of iPSC-derived cardiomyocytes for drug development. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863:1717–1727.
54. Yahata N, Asai M, Kitaoka S, et al. Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 2011;6:e25788.
55. Brender JD, Shinde MU, Zhan FB, et al. Maternal residential proximity to chlorinated solvent emissions and birth defects in offspring: a case-control study. *Environ Health* 2014;13.
56. Palmer JA, Smith AM, Egnash LA, et al. Establishment and assessment of a new human embryonic stem cell-based biomarker assay for developmental toxicity screening. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2013;98:343–363.
57. Kameoka S, Babiarz J, Kolaja K, et al. A high-throughput screen for teratogens using human pluripotent stem cells. *Toxicol Sci* 2014;137:76–90.
58. Sharma A, McKeithan WL, Serrano R, et al. Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity. *Nat Protoc* 2018;13:3018–3041.
59. Pei Y, Peng J, Behl M, et al. Comparative Neurotoxicity Screening in Human iPSC-derived Neural Stem Cells, Neurons and Astrocytes. *Brain Res* 2016;1638:57–73.
60. Sirenko O, Hesley J, Rusyn I, et al. High-Content Assays for Hepatotoxicity Using Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells. *Assay Drug Dev Technol* 2014;12:43–54.
61. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009;461:402–406.
62. Briggs JA, Sun J, Shepherd J, et al. Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells Model Genetic and Neural Developmental Features of Down Syndrome Etiology. *STEM CELLS* 2013;31:467–478.
63. Murray A, Letourneau A, Canzonetta C, et al. Brief Report: Isogenic Induced Pluripotent Stem Cell Lines From an Adult With Mosaic Down Syndrome Model Accelerated Neuronal Ageing and Neurodegeneration: Isogenic iPSC Model from Mosaic Down Syndrome. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 2015;33.
64. Devine MJ, Ryten M, Vodicka P, et al. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus. *Nat Commun* 2011;2:440.
65. Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011;8:267–280.
66. Lopez-Onieva L, Machuca C, Lamolda M, et al. Generation of a human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a Bernard-Soulier syndrome patient with the mutation p.Asn45Ser in the GPIX gene. *Stem Cell Res* 2016;17:603–606.
67. Lopez-Onieva L, Montes R, Lamolda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a Bernard-Soulier syndrome patient carrying a W71R mutation in the GPIX gene. *Stem Cell Res* 2016;16:692–695.
68. Lopez-Onieva L, Lamolda M, Montes R, et al. Induced pluripotent stem cells derived from Bernard-Soulier Syndrome patient's peripheral blood cells with a p.Phe55Ser mutation in the GPIX gene. *Stem Cell Res* 2017;20:10–13.

69. Tan Q, Lui PPY, Rui YF, et al. Comparison of Potentials of Stem Cells Isolated from Tendon and Bone Marrow for Musculoskeletal Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A* 2012;18:840–851.
70. Schwartz SD, Hubschman J-P, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012;379:713–720.
71. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015;385:509–516.
72. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine* 2017;376:1038–1046.
73. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther* 2013;21:1424–1431.
74. Perales M-A, Abutalib SA, Bollard C, editors. *Cell and Gene Therapies*. First edition. S.I.: Springer, 2018.
75. Tan Peng H., Xue Shao-An, Manunta Maria, et al. Effect of Vectors on Human Endothelial Cell Signal Transduction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006;26:462–467.
76. Malik P, Arumugam PI, Yee J-K, et al. Successful correction of the human Cooley's anemia beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector flanked by the chicken hypersensitive site 4 chromatin insulator. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1054:238–249.
77. Brown BD, Cantore A, Annoni A, et al. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* 2007;110:4144–4152.
78. Palfi S, Gurruchaga JM, Ralph GS, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet* 2014;383:1138–1146.
79. Valori CF, Ning K, Wyles M, et al. Systemic Delivery of scAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy. *Science Translational Medicine* 2010;2:35ra42–35ra42.
80. Alton EFWF, Beekman JM, Boyd AC, et al. Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2017;72:137–147.
81. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *The Journal of Gene Medicine* 2018;20:e3015.
82. Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, et al. Reversal of type 1 diabetes via islet β cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC Med* 2012;10:3.
83. Li L, Li F, Gao F, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves type 1 diabetes mellitus. *Cell Tissue Res* 2016;364:345–355.
84. Grealish S, Diguët E, Kirkeby A, et al. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* 2014;15:653–665.

85. Povsic TJ, Henry TD, Traverse JH, et al. The RENEW Trial: Efficacy and Safety of Intramyocardial Autologous CD34(+) Cell Administration in Patients With Refractory Angina. *JACC Cardiovasc Interv* 2016;9:1576–1585.
86. Song WK, Park K-M, Kim H-J, et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Reports* 2015;4:860–872.
87. Mehat MS, Sundaram V, Ripamonti C, et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology* 2018;125:1765–1775.
88. El-Badawy A, El-Badri N. Clinical Efficacy of Stem Cell Therapy for Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2016;11.
89. Guhr A, Kobold S, Selmann S, et al. Recent Trends in Research with Human Pluripotent Stem Cells: Impact of Research and Use of Cell Lines in Experimental Research and Clinical Trials. *Stem Cell Reports* 2018;11:485–496.
90. Daley GQ, Hyun I, Apperley JF, et al. Setting Global Standards for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2016 ISSCR Guidelines. *Stem Cell Reports* 2016;6:787–797.
91. Silberstein LE, Anastasi J. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Elsevier Health Sciences, 2017.
92. Moore MAS, Metcalf D. Ontogeny of the Haemopoietic System: Yolk Sac Origin of In Vivo and In Vitro Colony Forming Cells in the Developing Mouse Embryo. *British Journal of Haematology* 1970;18:279–296.
93. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. *Cell* 1996;86:897–906.
94. Silver L, Palis J. Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* 1997;89:1154–1164.
95. Ciau-Uitz A, Patient R, Medvinsky A, et al. Ontogeny of the Hematopoietic System In: *Encyclopedia of Immunobiology*. Volume 1. Ratcliffe, M.J.H ed. Oxford: Oxford Academic Press, 2016;1-14.
96. Haar JL, Ackerman GA. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec* 1971;170:199–223.
97. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. Fourth edition. Elsevier Health Sciences, 2008.
98. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 2015;518:547–551.
99. McGrath KE, Frame JM, Fromm GJ, et al. A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the β -globin locus in the mammalian embryo. *Blood* 2011;117:4600–4608.
100. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996;86:897–906.
101. Boisset J-C, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, et al. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 2010;464:116–120.

102. Taoudi S, Gonneau C, Moore K, et al. Extensive hematopoietic stem cell generation in the AGM region via maturation of VE-cadherin+CD45+ pre-definitive HSCs. *Cell Stem Cell* 2008;3:99–108.
103. Rybtsov S, Sobiesiak M, Taoudi S, et al. Hierarchical organization and early hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region. *J Exp Med* 2011;208:1305–1315.
104. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 2011;138:1017–1031.
105. Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, et al. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 2005;8:365–375.
106. Ivanovs A, Rybtsov S, Anderson RA, et al. CD43 but Not CD41 Marks the First Hematopoietic Stem Cells in the Human Embryo. *Blood* 2014;124:4330–4330.
107. Vodyanik MA, Thomson JA, Slukvin II. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood* 2006;108:2095–2105.
108. Luis TC, Killmann NM-B, Staal FJT. Signal transduction pathways regulating hematopoietic stem cell biology: introduction to a series of Spotlight Reviews. *Leukemia* 2012;26:86–90.
109. Baron MH, Isern J, Fraser ST. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* 2012;119:4828–4837.
110. Wilson A, Laurenti E, Oser G, et al. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell* 2008;135:1118–1129.
111. Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* 2014;141:4656–4666.
112. Will B, Vogler TO, Bartholdy B, et al. Satb1 regulates the self-renewal of hematopoietic stem cells by promoting quiescence and repressing differentiation commitment. *Nat Immunol* 2013;14:437–445.
113. Staber PB, Zhang P, Ye M, et al. Sustained PU.1 levels balance cell-cycle regulators to prevent exhaustion of adult hematopoietic stem cells. *Mol Cell* 2013;49:934–946.
114. Ye M, Zhang H, Amabile G, et al. C/EBPα controls acquisition and maintenance of adult haematopoietic stem cell quiescence. *Nat Cell Biol* 2013;15:385–394.
115. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014;505:327–334.
116. Wang L, Benedito R, Bixel MG, et al. Identification of a clonally expanding haematopoietic compartment in bone marrow. *EMBO J* 2013;32:219–230.
117. Brenet F, Kermani P, Spektor R, et al. TGFβ restores hematopoietic homeostasis after myelosuppressive chemotherapy. *Journal of Experimental Medicine* 2013;210:623–639.
118. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, et al. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *PNAS* 2003;100:11842–11849.
119. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, et al. Distinct Hematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGFβ1. *Cell Stem Cell* 2010;6:265–278.

120. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* 2013;154:1112–1126.
121. Busch K, Klapproth K, Barile M, et al. Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature* 2015;518:542–546.
122. Notta F, Zandi S, Takayama N, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* 2016;351:aab2116.
123. Cheng H, Zheng Z, Cheng T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein Cell* 2019.
124. Goodell MA, Nguyen H, Shroyer N. Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015;16:299–309.
125. Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell* 2015;163:1663–1677.
126. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 2013;15:533–543.
127. Bresnick, Emery H., editor. Hematopoiesis. Volume 118. First edition. Madison, USA: Academic Press, 2016.
128. Chou ST, Khandros E, Bailey LC, et al. Graded repression of PU.1/Sfpi1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate. *Blood* 2009;114:983–994.
129. Suzuki M, Moriguchi T, Ohneda K, et al. Differential contribution of the Gata1 gene hematopoietic enhancer to erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* 2009;29:1163–1175.
130. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4.
131. Lee D, Park C, Lee H, et al. ER71 acts downstream of BMP, Notch and Wnt signaling in blood and vessel progenitor specification. *Cell Stem Cell* 2008;2:497–507.
132. Nostro MC, Cheng X, Keller GM, et al. Wnt, Activin, and BMP Signaling Regulate Distinct Stages in the Developmental Pathway from Embryonic Stem Cells to Blood. *Cell Stem Cell* 2008;2:60–71.
133. Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 1999;22:361–365.
134. Lugus JJ, Park C, Ma YD, et al. Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1+ mesoderm. *Blood* 2009;113:563–566.
135. Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* 2002;3:127–136.
136. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004;18:99–115.
137. Bertrand JY, Cisson JL, Stachura DL, et al. Notch signaling distinguishes 2 waves of definitive hematopoiesis in the zebrafish embryo. *Blood* 2010;115:2777–2783.
138. Jang IH, Lu Y-F, Zhao L, et al. Notch1 acts via Foxc2 to promote definitive hematopoiesis via effects on hemogenic endothelium. *Blood* 2015;125:1418–1426.

139. Lam EYN, Hall CJ, Crosier PS, et al. Live imaging of Runx1 expression in the dorsal aorta tracks the emergence of blood progenitors from endothelial cells. *Blood* 2010;116:909–914.
140. Swiers G, Baumann C, O'Rourke J, et al. Early dynamic fate changes in haemogenic endothelium characterized at the single-cell level. *Nat Commun* 2013;4:2924.
141. Liting X, Gerstein R, Socolovsky M, et al. Deletion Of Core Binding Factors Runx1 and Runx2 Leads To Perturbed Hematopoiesis In Multiple Lineages. *Blood* 2013;122:46–46.
142. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 2009;457:887–891.
143. Kataoka H, Hayashi M, Nakagawa R, et al. Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1+PDGFR α + primitive mesoderm. *Blood* 2011;118:6975–6986.
144. Göttgens B, Nastos A, Kinston S, et al. Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *The EMBO Journal* 2002;21:3039–3050.
145. Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009;457:892–895.
146. Nottingham WT, Jarratt A, Burgess M, et al. Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood* 2007;110:4188–4197.
147. Gao X, Johnson KD, Chang Y-I, et al. Gata2 cis-element is required for hematopoietic stem cell generation in the mammalian embryo. *J Exp Med* 2013;210:2833–2842.
148. Wilson, N. K. et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* 7, 532–44 (2010).
149. Taoudi S, Bee T, Hilton A, et al. ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification. *Genes Dev* 2011;25:251–262.
150. Iacovino M, Chong D, Szatmari I, et al. HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium. *Nat Cell Biol* 2011;13:72–78.
151. Wilkinson AC, Göttgens B. Transcriptional regulation of haematopoietic stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2013;786:187–212.
152. Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* 2007;130:470–483.
153. Lizama CO, Hawkins JS, Schmitt CE, et al. Repression of arterial genes in hemogenic endothelium is sufficient for haematopoietic fate acquisition. *Nat Commun* 2015;6:7739.
154. Gandillet A, Serrano AG, Pearson S, et al. Sox7-sustained expression alters the balance between proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors at the onset of blood specification. *Blood* 2009;114:4813–4822.
155. Costa G, Mazan A, Gandillet A, et al. SOX7 regulates the expression of VE-cadherin in the haemogenic endothelium at the onset of haematopoietic development. *Development* 2012;139:1587–1598.

156. Lilly AJ, Costa G, Largeot A, et al. Interplay between SOX7 and RUNX1 regulates hemogenic endothelial fate in the yolk sac. *Development* 2016;143:4341–4351.
157. Liang HC-Y, Zúñiga-Pflücker JC. Hematopoiesis: from start to immune reconstitution potential. *Stem Cell Res Ther* 2015;6.
158. Gergen JP, Wieschaus EF. The localized requirements for a gene affecting segmentation in *Drosophila*: analysis of larvae mosaic for runt. *Dev Biol* 1985;109:321–335.
159. Kania MA, Bonner AS, Duffy JB, et al. The *Drosophila* segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev* 1990;4:1701–1713.
160. Miyoshi, H. et al. t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10431–4 (1991).
161. Zhang S, Xiao Z, Luo J, et al. Dose-Dependent Effects of Runx2 on Bone Development. *J Bone Miner Res* 2009;24:1889–1904.
162. Kawane T, Qin X, Jiang Q, et al. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep* 2018;8:1–17.
163. Levanon D, Bernstein Y, Negreanu V, et al. Absence of Runx3 expression in normal gastrointestinal epithelium calls into question its tumour suppressor function. *EMBO Mol Med* 2011;3:593–604.
164. Appel E, Weissmann S, Salzberg Y, et al. An ensemble of regulatory elements controls Runx3 spatiotemporal expression in subsets of dorsal root ganglia proprioceptive neurons. *Genes Dev* 2016;30:2607–2622.
165. Nakamura S, Senzaki K, Yoshikawa M, et al. Dynamic regulation of the expression of neurotrophin receptors by Runx3. *Development* 2008;135:1703–1711.
166. Levanon D, Glusman G, Bangsow T, et al. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor RUNX1/AML1. *Gene* 2001;262:23–33.
167. Ghazi MC, Bernstein Y, Negreanu V, et al. Expression of the human acute myeloid leukemia gene AML1 is regulated by two promoter regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1935–1940.
168. Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, et al. Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2762–2769.
169. Challen GA, Goodell MA. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2010;38:403–416.
170. Imai Y, Kurokawa M, Tanaka K, et al. TLE, the Human Homolog of Groucho, Interacts with AML1 and Acts as a Repressor of AML1-Induced Transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;252:582–589.
171. Lam K, Zhang D-E. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:1120–1139.

172. van der Kouwe E, Staber PB. RUNX1-ETO: Attacking the Epigenome for Genomic Instable Leukemia. *Int J Mol Sci* 2019;20.
173. Zeng C, McNeil S, Pockwinse S, et al. Intranuclear targeting of AML/CBF α regulatory factors to nuclear matrix-associated transcriptional domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1585–1589.
174. Kim WY, Sieweke M, Ogawa E, et al. Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *EMBO J* 1999;18:1609–1620.
175. Pencovich N, Jaschek R, Tanay A, et al. Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models. *Blood* 2011;117:e1–e14.
176. Goldfarb AN. Megakaryocytic Programming by a Transcriptional Regulatory Loop: A Circle Connecting RUNX1, GATA-1, and P-TEFb. *J Cell Biochem* 2009;107:377–382.
177. Huang H, Yu M, Akie TE, et al. Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development. *Mol Cell Biol* 2009;29:4103–4115.
178. Petrovick MS, Hiebert SW, Friedman AD, et al. Multiple Functional Domains of AML1: PU.1 and C/EBP α Synergize with Different Regions of AML1. *Mol Cell Biol* 1998;18:3915–3925.
179. Hu Z, Gu X, Baraoidan K, et al. RUNX1 regulates corepressor interactions of PU.1. *Blood* 2011;117:6498–6508.
180. Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, et al. CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF α 2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 1996;16:1231–1240.
181. Wilson NK, Schoenfelder S, Hannah R, et al. Integrated genome-scale analysis of the transcriptional regulatory landscape in a blood stem/progenitor cell model. *Blood* 2016;127:e12-23.
182. Beck D, Thoms JAI, Perera D, et al. Genome-wide analysis of transcriptional regulators in human HSPCs reveals a densely interconnected network of coding and noncoding genes. *Blood* 2013;122:e12-22.
183. Imai Y, Kurokawa M, Yamaguchi Y, et al. The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol* 2004;24:1033–1043.
184. Biggs JR, Peterson LF, Zhang Y, et al. AML1/RUNX1 Phosphorylation by Cyclin-Dependent Kinases Regulates the Degradation of AML1/RUNX1 by the Anaphase-Promoting Complex. *Mol Cell Biol* 2006;26:7420–7429.
185. Huang G, Shigesada K, Ito K, et al. Dimerization with PEBP2 β protects RUNX1/AML1 from ubiquitin–proteasome-mediated degradation. *EMBO J* 2001;20:723–733.
186. Zhao X, Jankovic V, Gural A, et al. Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. *Genes Dev* 2008;22:640–653.
187. de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC, et al. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J* 2000;19:2465–2474.

188. Li Z, Chen MJ, Stacy T, et al. Runx1 function in hematopoiesis is required in cells that express Tek. *Blood* 2006;107:106–110.
189. Lacaud G, Gore L, Kennedy M, et al. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. *Blood* 2002;100:458–466.
190. Yokomizo T, Hasegawa K, Ishitobi H, et al. Runx1 is involved in primitive erythropoiesis in the mouse. *Blood* 2008;111:4075–4080.
191. Potts KS, Sargeant TJ, Markham JF, et al. A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse embryo. *Blood* 2014;124:2725–2729.
192. North TE, Stacy T, Matheny CJ, et al. Runx1 Is Expressed in Adult Mouse Hematopoietic Stem Cells and Differentiating Myeloid and Lymphoid Cells, But Not in Maturing Erythroid Cells. *STEM CELLS* 2004;22:158–168.
193. Wang Q, Stacy T, Binder M, et al. Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3444–3449.
194. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, et al. AML1, the Target of Multiple Chromosomal Translocations in Human Leukemia, Is Essential for Normal Fetal Liver Hematopoiesis. *Cell* 1996;84:321–330.
195. Thurston G. Complementary actions of VEGF and Angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat* 2002;200:575–580.
196. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000;102:199–209.
197. Cai X, Gaudet JJ, Mangan JK, et al. Runx1 Loss Minimally Impacts Long-Term Hematopoietic Stem Cells. *PLOS ONE* 2011;6:e28430.
198. Tober J, Yzaguirre AD, Piwarzyk E, et al. Distinct temporal requirements for Runx1 in hematopoietic progenitors and stem cells. *Development* 2013;140:3765–3776.
199. Dzierzak E, Speck NA. Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2008;9:129–136.
200. Cai Z, de Bruijn M, Ma X, et al. Haploinsufficiency of AML1 affects the temporal and spatial generation of hematopoietic stem cells in the mouse embryo. *Immunity* 2000;13:423–431.
201. North T, Gu TL, Stacy T, et al. Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 1999;126:2563–2575.
202. Yokomizo T, Yamada-Inagawa T, Yzaguirre AD, et al. Whole-mount three-dimensional imaging of internally localized immunostained cells within mouse embryos. *Nat Protoc* 2012;7:421–431.
203. Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, et al. Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12359–12363.
204. Niki M, Okada H, Takano H, et al. Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5697–5702.

205. Bee T, Liddiard K, Swiers G, et al. Alternative Runx1 promoter usage in mouse developmental hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis* 2009;43:35–42.
206. Sroczynska P, Lancrin C, Kouskoff V, et al. The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic hematopoiesis. *Blood* 2009;114:5279–5289.
207. Lam EYN, Chau JYM, Kalev-Zylinska ML, et al. Zebrafish runx1 promoter-EGFP transgenics mark discrete sites of definitive blood progenitors. *Blood* 2009;113:1241–1249.
208. Yan M, Kanbe E, Peterson LF, et al. A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis. *Nat Med* 2006;12:945–949.
209. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4917–4921.
210. Nucifora G, Begy CR, Kobayashi H, et al. Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4004–4008.
211. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood* 2017;129:2070–2082.
212. Osato M, Asou N, Abdalla E, et al. Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood* 1999;93:1817–1824.
213. Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C, et al. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood* 2000;96:2862–2869.
214. Langabeer SE, Gale RE, Rollinson SJ, et al. Mutations of the AML1 gene in acute myeloid leukemia of FAB types M0 and M7. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:24–32.
215. Harada H, Harada Y, Niimi H, et al. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 2004;103:2316–2324.
216. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23:166–175.
217. Ben-Ami O, Friedman D, Leshkowitz D, et al. Addition of t(8;21) and inv(16) Acute Myeloid Leukemia to Native RUNX1. *Cell Reports* 2013;4:1131–1143.
218. Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, et al. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science* 2014;345:1509–1512.
219. Wagner JE, Brunstein CG, Boitano AE, et al. Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell* 2016;18:144–155.
220. Knapp DJHF, Hammond CA, Miller PH, et al. Dissociation of Survival, Proliferation, and State Control in Human Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2017;8:152–162.

221. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10716–10721.
222. Vodyanik MA, Slukvin II. Hematoendothelial differentiation of human embryonic stem cells. *Curr Protoc Cell Biol* 2007;Chapter 23:Unit 23.6.
223. Choi K-D, Vodyanik M, Slukvin II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2011;6:296–313.
224. Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, et al. OP9 bone marrow stroma cells differentiate into megakaryocytes and platelets. *PLOS ONE* 2013;8:e58123.
225. Uenishi G, Theisen D, Lee J-H, et al. Tenascin C promotes hematoendothelial development and T lymphoid commitment from human pluripotent stem cells in chemically defined conditions. *Stem Cell Reports* 2014;3:1073–1084.
226. Feng Q, Shabrani N, Thon JN, et al. Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2014;3:817–831.
227. Moreau T, Evans AL, Vasquez L, et al. Large-scale production of megakaryocytes from human pluripotent stem cells by chemically defined forward programming. *Nature Communications* 2016;7:11208.
228. Zambidis ET, Peault B, Park TS, et al. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* 2005;106:860–870.
229. Ye Z, Zhan H, Mali P, et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 2009;114:5473–5480.
230. Liu Y, Wang Y, Gao Y, et al. Efficient generation of megakaryocytes from human induced pluripotent stem cells using food and drug administration-approved pharmacological reagents. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:309–319.
231. Bai H, Xie Y-L, Gao Y-X, et al. The balance of positive and negative effects of TGF- β signaling regulates the development of hematopoietic and endothelial progenitors in human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2013;22:2765–2776.
232. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 2008;3:85–98.
233. Tian X, Woll PS, Morris JK, et al. Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells* 2006;24:1370–1380.
234. Pick M, Azzola L, Mossman A, et al. Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis. *Stem Cells* 2007;25:2206–2214.
235. Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 2004;103:2504–2512.
236. Wang C, Tang X, Sun X, et al. TGF β inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. *Cell Res* 2012;22:194–207.

237. Kennedy M, Awong G, Sturgeon CM, et al. T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep* 2012;2:1722–1735.
238. Rafii S, Kloss CC, Butler JM, et al. Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood* 2013;121:770–780.
239. Ayllón V, Bueno C, Ramos-Mejía V, et al. The Notch ligand DLL4 specifically marks human hematoendothelial progenitors and regulates their hematopoietic fate. *Leukemia* 2015;29:1741–1753.
240. Ramos-Mejía V, Navarro-Montero O, Ayllón V, et al. HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood* 2014;124:3065–3075.
241. Doulatov S, Vo LT, Chou SS, et al. Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell* 2013;13:459–470.
242. Ran D, Shia W-J, Lo M-C, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood* 2013;121:2882–2890.
243. Real P, Menendez P, Navarro-Montero O, et al. RUNX1c regulates hematopoietic specification of human embryonic stem cells. *Experimental Hematology* 2014;42:S16.
244. Navarro-Montero O, Ayllon V, Lamolda M, et al. RUNX1c Regulates Hematopoietic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Possibly in Cooperation with Proinflammatory Signaling. *Stem Cells* 2017;35:2253–2266.
245. Real PJ, Ligerio G, Ayllon V, et al. SCL/TAL1 Regulates Hematopoietic Specification From Human Embryonic Stem Cells. *Mol Ther* 2012;20:1443–1453.
246. Menendez P, Toscano M, Navarro-Montero O, et al. SCL/TAL1-mediated transcriptional network enhances megakaryocytic specification of human embryonic stem cells. *Experimental Hematology* 2014;42:S50.
247. Toscano MG, Navarro-Montero O, Ayllon V, et al. SCL/TAL1-mediated transcriptional network enhances megakaryocytic specification of human embryonic stem cells. *Mol Ther* 2015;23:158–170.
248. Zhou Y, Zhang Y, Chen B, et al. Overexpression of GATA2 Enhances Development and Maintenance of Human Embryonic Stem Cell-Derived Hematopoietic Stem Cell-like Progenitors. *Stem Cell Reports* 2019;13:31–47.
249. Ackermann M, Liebhaber S, Klusmann J-H, et al. Lost in translation: pluripotent stem cell-derived hematopoiesis. *EMBO Mol Med* 2015;7:1388–1402.
250. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani RA, et al. Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *The Journal of Cell Biology* 1999;147:1299–1312.
251. Eckly A, Heijnen H, Pertuy F, et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood* 2014;123:921–930.
252. Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol* 2000;28:3–16.

253. Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic Visualization of Thrombopoiesis Within Bone Marrow. *Science* (New York, NY) 2007;317:1767–1770.
254. Daly ME. Determinants of platelet count in humans. *Haematologica* 2011;96:10–13.
255. Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, et al. Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *British Journal of Haematology* 2013;161:245–254.
256. Strassel C, Gachet C, Lanza F. On the Way to in vitro Platelet Production. *Front Med* 2018;5.
257. Roy GC. Micro-Organisms or Granules of Bizzozero in the Blood. *Ind Med Gaz* 1882;17:110.
258. Thon JN, Macleod H, Begonja AJ, et al. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun* 2012;3:852.
259. Michelson AD, editor. *Platelets*. 3 Edition. London; Waltham, MA: Academic Press, 2013.
260. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996;84:289–297.
261. Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, et al. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. *J Exp Med* 1998;188:267–276.
262. Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8.
263. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004;103:2096–2104.
264. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, et al. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem* 2004;279:44250–44257.
265. Maynard DM, Heijnen HFG, Horne MK, et al. Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007;5:1945–1955.
266. Hangge P, Stone J, Albadawi H, et al. Hemostasis and nanotechnology. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* 2017;7:S267-S275–S275.
267. Siljander PR-M, Munnix ICA, Smethurst PA, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* 2004;103:1333–1341.
268. Mattheij NJA, Gilio K, van Kruchten R, et al. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem* 2013;288:13325–13336.
269. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7–25.
270. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425:836–841.
271. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, et al. In vivo imaging of Tregs providing immune privilege to the hematopoietic stem cell niche. *Nature* 2011;474:216–219.

272. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841–846.
273. Li W, Johnson SA, Shelley WC, et al. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp Hematol* 2004;32:1226–1237.
274. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* 2004;10:64–71.
275. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, et al. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J* 2001;81:685–696.
276. Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, et al. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:5431–5436.
277. Hermitte F, Brunet de la Grange P, Belloc F, et al. Very low O₂ concentration (0.1%) favors G₀ return of dividing CD34⁺ cells. *Stem Cells* 2006;24:65–73.
278. Ivanović Z, Dello Sbarba P, Trimoreau F, et al. Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* 2000;40:1482–1488.
279. Laluppa JA, Papoutsakis ET, Miller WM. Oxygen tension alters the effects of cytokines on the megakaryocyte, erythrocyte, and granulocyte lineages. *Exp Hematol* 1998;26:835–843.
280. Chen S, Su Y, Wang J. ROS-mediated platelet generation: a microenvironment-dependent manner for megakaryocyte proliferation, differentiation, and maturation. *Cell Death Dis* 2013;4:e722.
281. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2010;7:380–390.
282. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997;272:22642–22647.
283. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, et al. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271:C1172–1180.
284. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003;17:271–273.
285. Kocabas F, Zheng J, Thet S, et al. Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood* 2012;120:4963–4972.
286. Zhang CC, Sadek HA. Hypoxia and Metabolic Properties of Hematopoietic Stem Cells. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:1891–1901.
287. Debili N, Louache F, Vainchenker W. Isolation and Culture of Megakaryocyte Precursors. In: Platelets and Megakaryocytes. Gibbins JM, Mahaut-Smith MP, eds. Humana Press, 2004:293–308.
288. Psaila B, Barkas N, Iskander D, et al. Single-cell profiling of human megakaryocyte-erythroid progenitors identifies distinct megakaryocyte and erythroid differentiation pathways. *Genome Biol* 2016;17.

289. Lee E, Godara P, Haylock D. Biomanufacture of human platelets for transfusion: Rationale and approaches. *Exp Hematol* 2014;42:332–346.
290. Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, et al. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood* 2017;129:3332–3343.
291. McCarty JM, Sprugel KH, Fox NE, et al. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* 1995;86:3668–3675.
292. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:5884–5889.
293. Fielder PJ, Hass P, Nagel M, et al. Human Platelets as a Model for the Binding and Degradation of Thrombopoietin. *Blood* 1997;89:2782–2788.
294. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, et al. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood* 1996;87:439–446.
295. Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, et al. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood* 1996;87:4544–4551.
296. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, et al. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:1195.
297. Luoh S-M, Stefanich E, Solar G, et al. Role of the Distal Half of the c-Mpl Intracellular Domain in Control of Platelet Production by Thrombopoietin In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20:507.
298. Oudenrijn SVD, Bruin M, Folman CC, et al. Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 2000;110:441–448.
299. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, et al. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001;97:139–146.
300. Zhang B, Zehnder JL. ROS: novel regulators of thrombopoiesis. *Blood* 2016;128:613–614.
301. Mercher T, Cornejo MG, Sears C, et al. Notch Signaling Specifies Megakaryocyte Development from Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2008;3:314.
302. Cornejo MG, Mabialah V, Sykes SM, et al. Crosstalk between NOTCH and AKT signaling during murine megakaryocyte lineage specification. *Blood* 2011;118:1264.
303. Poirault-Chassac S, Six E, Catelain C, et al. Notch/Delta4 signaling inhibits human megakaryocytic terminal differentiation. *Blood* 2010;116:5670–5678.
304. Li Y, Jin C, Bai H, et al. Human NOTCH4 is a key target of RUNX1 in megakaryocytic differentiation. *Blood* 2018;131:191–201.
305. Mikkola HKA, Klintman J, Yang H, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/ tal-1 gene. *Nature* 2003;421:547–551.

306. Ichikawa M, Asai T, Saito T, et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med* 2004;10:299–304.
307. Chagraoui H, Kassouf M, Banerjee S, et al. SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. *Blood* 2011;118:723–735.
308. Bluteau D, Glembotsky AC, Raimbault A, et al. Dysmegakaryopoiesis of FPD/AML pedigrees with constitutional RUNX1 mutations is linked to myosin II deregulated expression. *Blood* 2012;120:2708–2718.
309. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 1997;89:3636–3643.
310. Hock H, Meade E, Medeiros S, et al. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 2004;18:2336–2341.
311. Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y, et al. Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell* 2007;1:416–427.
312. Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, et al. GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* 2000;95:2543–2551.
313. Ikonomi P, Noguchi CT, Miller W, et al. Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. *Gene* 2000;261:277–287.
314. Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, et al. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Experimental Hematology* 2000;28:1423–1431.
315. Bouilloux F, Juban G, Cohet N, et al. EKLF restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation. *Blood* 2008;112:576–584.
316. Athanasiou M, Mavrothalassitis G, Sun-Hoffman L, et al. FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 2000;14:439–445.
317. Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, et al. RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood* 2015;125:3570–3579.
318. Kwiatkowski BA, Bastian LS, Bauer TR, et al. The ets Family Member Tel Binds to the Fli-1 Oncoprotein and Inhibits Its Transcriptional Activity. *J Biol Chem* 1998;273:17525–17530.
319. Kwiatkowski BA, Zielinska-Kwiatkowska AG, Bauer TR, et al. The ETS Family Member Tel Antagonizes the Fli-1 Phenotype in Hematopoietic Cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2000;26:84–90.
320. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nature Communications* 2012;3:717.
321. Jalagadugula G, Mao G, Kaur G, et al. Regulation of platelet myosin light chain (MYL9) by RUNX1: implications for thrombocytopenia and platelet dysfunction in RUNX1 haplodeficiency. *Blood* 2010;116:6037.

322. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, et al. A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology* 2001;11:579–586.
323. Zang C, Luyten A, Chen J, et al. NF-E2, FLI1 and RUNX1 collaborate at areas of dynamic chromatin to activate transcription in mature mouse megakaryocytes. *Scientific Reports* 2016;6:30255.
324. Vassen L, Beauchemin H, Lemsaddek W, et al. Growth Factor Independence 1b (Gfi1b) Is Important for the Maturation of Erythroid Cells and the Regulation of Embryonic Globin Expression. *PLOS ONE* 2014;9:e96636.
325. Shooshtarizadeh P, Helness A, Vadnais C, et al. Gfi1b regulates the level of Wnt/ β -catenin signaling in hematopoietic stem cells and megakaryocytes. *Nat Commun* 2019;10:1–16.
326. Beauchemin H, Shooshtarizadeh P, Vadnais C, et al. Gfi1b controls integrin signaling-dependent cytoskeleton dynamics and organization in megakaryocytes. *Haematologica* 2017;102:484–497.
327. Songdej N, Rao AK. Hematopoietic transcription factor mutations: important players in inherited platelet defects. *Blood* 2017;129:2873–2881.
328. Begley CG, Aplan PD, Davey MP, et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2031–2035.
329. Aplan PD, Lombardi DP, Reaman GH, et al. Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992;79:1327–1333.
330. The helix-loop-helix gene SCL: Implicated in T-cell acute lymphoblastic leukaemia and in normal haematopoietic development. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1996;28:609–618.
331. Palomero T, Odom DT, O'Neil J, et al. Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006;108:986–992.
332. Chen Q, Cheng JT, Tasi LH, et al. The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *EMBO J* 1990;9:415–424.
333. Kee BL. Helix-Loop-Helix Proteins in Lymphocyte Lineage Determination. In: *Molecular Analysis of B Lymphocyte Development and Activation*. Singh H, Grosschedl R, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005:15–27.
334. Begley CG, Visvader J, Green AR, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:869–873.
335. Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, et al. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 1991;11:3037–3042.
336. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 1995;373:432–434.
337. Robb L, Lyons I, Li R, et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7075–7079.
338. Porcher C, Swat W, Rockwell K, et al. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 1996;86:47–57.

339. McGrath KE, Frame JM, Fegan KH, et al. Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. *Cell Rep* 2015;11:1892–1904.
340. D'Souza SL, Elefanty AG, Keller G. SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood* 2005;105:3862–3870.
341. Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* 2009;457:892–895.
342. Schlaeger TM, Mikkola HKA, Gekas C, et al. Tie2Cre-mediated gene ablation defines the stem-cell leukemia gene (SCL/tal1)-dependent window during hematopoietic stem-cell development. *Blood* 2005;105:3871–3874.
343. Elefanty AG, Begley CG, Hartley L, et al. SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 1999;94:3754–3763.
344. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:992–997.
345. Chagraoui H, Kassouf M, Banerjee S, et al. SCL-mediated regulation of the cell-cycle regulator p21 is critical for murine megakaryopoiesis. *Blood* 2011;118:723–735.
346. Dey S, Curtis DJ, Jane SM, et al. The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Mol Cell Biol* 2010;30:2181–2192.
347. Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* 2006;25:357–366.
348. Wu W, Morrissey CS, Keller CA, et al. Dynamic shifts in occupancy by TAL1 are guided by GATA factors and drive large-scale reprogramming of gene expression during hematopoiesis. *Genome Res* 2014;24:1945–1962.
349. Fujiwara Y, Chang AN, Williams AM, et al. Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood* 2004;103:583–585.
350. Fujiwara T, O'Geen H, Keles S, et al. Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell* 2009;36:667–681.
351. Pimkin M, Kossenkova AV, Mishra T, et al. Divergent functions of hematopoietic transcription factors in lineage priming and differentiation during erythro-megakaryopoiesis. *Genome Res* 2014;24:1932–1944.
352. Elcheva I, Brok-Volchanskaya V, Kumar A, et al. Direct Induction of Hematoendothelial Programs in Human Pluripotent Stem Cells by Transcriptional Regulators. *Nat Commun* 2014;5:4372.
353. Johnson B, Doak R, Allsup D, et al. A comprehensive targeted next-generation sequencing panel for genetic diagnosis of patients with suspected inherited thrombocytopenia. *Res Pract Thromb Haemost* 2018;2:640–652.
354. Johnson B, Lowe GC, Futterer J, et al. Whole exome sequencing identifies genetic variants in inherited thrombocytopenia with secondary qualitative function defects. *Haematologica* 2016;101:1170–1179.

355. Reddy JC, Shuman MA, Aster RH. Quinine/Quinidine-Induced Thrombocytopenia: A Great Imitator. *Arch Intern Med* 2004;164:218–220.
356. Curtis BR, Kaliszewski J, Marques MB, et al. Immune-mediated thrombocytopenia resulting from sensitivity to oxaliplatin. *Am J Hematol* 2006;81:193–198.
357. Hatting M, Galm O, Meyer M, et al. [Anemia and severe thrombocytopenia in celiac disease]. *Med Klin (Munich)* 2010;105:249–252.
358. Moulis G, Delavigne K, Huguet F, et al. [Antiphospholipid antibodies and the risk of thrombosis: a comparative survey between chronic immune thrombocytopenia and primary antiphospholipid syndrome]. *Rev Med Interne* 2011;32:724–729.
359. Mkhitarian S, Danielyan S, Sargsyan L, et al. Younger age and previous exposure to radiation therapy are correlated with the severity of chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Ecancermedicallscience* 2019;13.
360. Weycker D, Hatfield M, Grossman A, et al. Risk and consequences of chemotherapy-induced thrombocytopenia in US clinical practice. *BMC Cancer* 2019;19:151.
361. Smalisz-Skrzypczyk K, Romiszewski M, Matysiak M, et al. The Influence of Primary Cytomegalovirus or Epstein-Barr Virus Infection on the Course of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Adv Exp Med Biol* 2016;878:83–88.
362. Pecci A, Gresele P, Klersy C, et al. Eltrombopag for the treatment of the inherited thrombocytopenia deriving from MYH9 mutations. *Blood* 2010;116:5832–5837.
363. Gerrits AJ, Leven EA, Frelinger AL, et al. Effects of eltrombopag on platelet count and platelet activation in Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia. *Blood* 2015;126:1367–1378.
364. Eisenberg S. Refractory Response to Platelet Transfusion Therapy. *Journal of Infusion Nursing* 2010;33:89.
365. Slichter SJ, Davis K, Enright H, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 2005;105:4106–4114.
366. Leo C.A, Pravisani R, Bidinost S, et al. Postsplenectomy recurrence of idiopathic thrombocytopenic purpura: role of laparoscopic splenectomy in the treatment of accessory spleen. *G Chir* 2015;36:153–157.
367. Liao R, Tang P-Y, Song J-F, et al. Platelet count on preoperative day 1 predicts the long-term responses to laparoscopic splenectomy for Chinese patients with medically refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *BMC Surgery* 2018;18:108.
368. Aubron C, Flint A.W.J, Ozier Y, et al. Platelet storage duration and its clinical and transfusion outcomes: a systematic review. *Critical Care* 2018;22:185.
369. Veihold M, Aroviita P, Linna M, et al. Variation of platelet production and discard rates in 17 blood centers representing 10 European countries from 2000 to 2002. *Transfusion* 2006;46:991–995.
370. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, et al. Platelet-rich plasma: new clinical application: a pilot study for treatment of jumper's knee. *Injury* 2009;40:598–603.

371. Castricini R, Longo UG, De Benedetto M, et al. Platelet-rich plasma augmentation for arthroscopic rotator cuff repair: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med* 2011;39:258–265.
372. Kantrowitz DE, Padaki AS, Ahmad CS, et al. Defining Platelet-Rich Plasma Usage by Team Physicians in Elite Athletes. *Orthop J Sports Med* 2018;6.
373. Al-Anazi KA. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma without Cryopreservation. *Bone Marrow Res* 2012;2012:917361.
374. Jiang X-S, Chai C, Zhang Y, et al. Surface-immobilization of adhesion peptides on substrate for ex vivo expansion of cryopreserved umbilical cord blood CD34+ cells. *Biomaterials* 2006;27:2723–2732.
375. Takayama N, Nishikii H, Usui J, et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 2008;111:5298–5306.
376. Lu S-J, Li F, Yin H, et al. Platelets generated from human embryonic stem cells are functional in vitro and in the microcirculation of living mice. *Cell Res* 2011;21:530–545.
377. Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, et al. OP9 bone marrow stroma cells differentiate into megakaryocytes and platelets. *PLOS ONE* 2013;8:e58123.
378. Pick M, Azzola L, Osborne E, et al. Generation of Megakaryocytic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells in a Feeder- and Serum-Free Medium. *PLOS ONE* 2013;8:e55530.
379. Borst S, Sim X, Poncz M, et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Megakaryocytes and Platelets for Disease Modeling and Clinical Use. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:2007–2013.
380. Moreau T, Evans AL, Ghevaert CJG. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Megakaryocytes by Transcription Factor-Driven Forward Programming. *Methods Mol Biol* 2018;1812:155–176.
381. Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelet function. In: *Platelets*. Michelson AD, ed. Second edition. San Diego: Academic Press, 2007:50–1025.
382. Liu X, Li Y, Zhu H, et al. Use of non-contact hopping probe ion conductance microscopy to investigate dynamic morphology of live platelets. *Platelets* 2015;26:480–485.
383. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006;1:46.
384. Othman M. Platelet-type von Willebrand disease: a rare, often misdiagnosed and underdiagnosed bleeding disorder. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:464–469.
385. Nurden P, Gobbi G, Nurden A, et al. Abnormal VWF modifies megakaryocytopoiesis: studies of platelets and megakaryocyte cultures from patients with von Willebrand disease type 2B. *Blood* 2010;115:2649–2656.
386. Bunimov N, Fuller N, Hayward CPM. Genetic Loci Associated with Platelet Traits and Platelet Disorders. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:291–305.
387. Baurand A, Raboisson P, Freund M, et al. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2001;412:213–221.

388. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409:202–207.
389. Cunningham MR, Nisar SP, Cooke AE, et al. Differential endosomal sorting of a novel P2Y₁₂ purinoreceptor mutant. *Traffic* 2013;14:585–598.
390. Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, et al. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* 1996;97:949–956.
391. Watson S, Daly M, Dawood B, et al. Phenotypic approaches to gene mapping in platelet function disorders - identification of new variant of P2Y₁₂, TxA₂ and GPVI receptors. *Hamostaseologie* 2010;30:29–38.
392. Mumford AD, Nisar S, Darnige L, et al. Platelet dysfunction associated with the novel Trp29Cys thromboxane A₂ receptor variant. *J Thromb Haemost* 2013;11:547–554.
393. Stafford Nicholas P., Pink Andrew E., White Ann E., et al. Mechanisms Involved in Adenosine Triphosphate-Induced Platelet Aggregation in Whole Blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003;23:1928–1933.
394. Rolf MG, Brearley CA, Mahaut-Smith MP. Platelet shape change evoked by selective activation of P2X₁ purinoceptors with alpha,beta-methylene ATP. *Thromb Haemost* 2001;85:303–308.
395. Hechler B, Lenain N, Marchese P, et al. A role of the fast ATP-gated P2X₁ cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med* 2003;198:661–667.
396. Oury C, Sticker E, Cornelissen H, et al. ATP augments von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation through Ca²⁺-calmodulin and myosin light chain kinase activation. *J Biol Chem* 2004;279:26266–26273.
397. Xiao T, Takagi J, Collier BS, et al. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004;432:59–67.
398. Jallu V, Dusseaux M, Panzer S, et al. AlphaIIb beta3 integrin: new allelic variants in Glanzmann thrombasthenia, effects on ITGA2B and ITGB3 mRNA splicing, expression, and structure-function. *Hum Mutat* 2010;31:237–246.
399. Jayo A, Pabón D, Lastres P, et al. Type II Glanzmann thrombasthenia in a compound heterozygote for the alpha IIb gene. A novel missense mutation in exon 27. *Haematologica* 2006;91:1352–1359.
400. Nurden AT, Pillois X, Fiore M, et al. Expanding the Mutation Spectrum Affecting αIIbβ3 Integrin in Glanzmann Thrombasthenia: Screening of the ITGA2B and ITGB3 Genes in a Large International Cohort. *Hum Mutat* 2015;36:548–561.
401. Castoldi E, Collins PW, Williamson PL, et al. Compound heterozygosity for 2 novel TMEM16F mutations in a patient with Scott syndrome. *Blood* 2011;117:4399–4400.
402. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, et al. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010;468:834–838.
403. van Kruchten R, Mattheij NJA, Saunders C, et al. Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood* 2013;121:1850–1857.

404. Fujii T, Sakata A, Nishimura S, et al. TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:12800–12805.
405. Nurden A, Nurden P. Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011;9:76–91.
406. Albers CA, Cvejic A, Favier R, et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nat Genet* 2011;43:735–737.
407. Kahr WHA, Hinckley J, Li L, et al. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet* 2011;43:738–740.
408. Gunay-Aygun M, Falik-Zaccai TC, Vilboux T, et al. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet α -granules. *Nat Genet* 2011;43:732–734.
409. Monteferrario D, Bolar NA, Marneth AE, et al. A dominant-negative GFI1B mutation in the gray platelet syndrome. *N Engl J Med* 2014;370:245–253.
410. Tubman VN, Levine JE, Campagna DR, et al. X-linked gray platelet syndrome due to a GATA1 Arg216Gln mutation. *Blood* 2007;109:3297–3299.
411. McKay H, Derome F, Haq MA, et al. Bleeding risks associated with inheritance of the Quebec platelet disorder. *Blood* 2004;104:159–165.
412. Veljkovic DK, Rivard GE, Diamandis M, et al. Increased expression of urokinase plasminogen activator in Quebec platelet disorder is linked to megakaryocyte differentiation. *Blood* 2009;113:1535–1542.
413. Diamandis M, Paterson AD, Rommens JM, et al. Quebec platelet disorder is linked to the urokinase plasminogen activator gene (PLAU) and increases expression of the linked allele in megakaryocytes. *Blood* 2009;113:1543–1546.
414. Enders A, Zieger B, Schwarz K, et al. Lethal hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type II. *Blood* 2006;108:81–87.
415. Huizing M, Anikster Y, Fitzpatrick DL, et al. Hermansky-Pudlak Syndrome Type 3 in Ashkenazi Jews and Other Non-Puerto Rican Patients with Hypopigmentation and Platelet Storage-Pool Deficiency. *Am J Hum Genet* 2001;69:1022–1032.
416. Anderson PD, Huizing M, Claassen DA, et al. Hermansky-Pudlak syndrome type 4 (HPS-4): clinical and molecular characteristics. *Hum Genet* 2003;113:10–17.
417. Certain S, Barrat F, Pastural E, et al. Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome. *Blood* 2000;95:979–983.
418. Karim MA, Suzuki K, Fukai K, et al. Apparent genotype-phenotype correlation in childhood, adolescent, and adult Chediak-Higashi syndrome. *Am J Med Genet* 2002;108:16–22.
419. Ménasché G, Ho CH, Sanal O, et al. Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1). *J Clin Invest* 2003;112:450–456.
420. Mishra K, Singla S, Sharma S, et al. Griscelli syndrome type 2: a novel mutation in RAB27A gene with different clinical features in 2 siblings: a diagnostic conundrum. *Korean J Pediatr* 2014;57:91–95.

421. Burns S, Cory GO, Vainchenker W, et al. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* 2004;104:3454–3462.
422. Blundell MP, Worth A, Bouma G, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Dis Markers* 2010;29:157–175.
423. Sabri S, Foudi A, Boukour S, et al. Deficiency in the Wiskott-Aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood* 2006;108:134–140.
424. Pecci A, Panza E, Pujol-Moix N, et al. Position of nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMMHC-IIA) mutations predicts the natural history of MYH9-related disease. *Human Mutation* 2008;29:409–417.
425. Chen Z, Naveiras O, Balduini A, et al. The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway. *Blood* 2007;110:171–179.
426. Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns WB, et al. Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. *Brain* 2006;129:1892–1906.
427. Williamson D, Pikovski I, Cranmer SL, et al. Interaction between Platelet Glycoprotein Ib α and Filamin-1 Is Essential for Glycoprotein Ib/IX Receptor Anchorage at High Shear. *J Biol Chem* 2002;277:2151–2159.
428. Falet H, Pollitt AY, Begonja AJ, et al. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med* 2010;207:1967–1979.
429. Svensson L, Howarth K, McDowall A, et al. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med* 2009;15:306–312.
430. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8070–8074.
431. Sun L, Mao G, Rao AK. Association of CBFA2 mutation with decreased platelet PKC- θ and impaired receptor-mediated activation of GPIIb-IIIa and pleckstrin phosphorylation: proteins regulated by CBFA2 play a role in GPIIb-IIIa activation. *Blood* 2004;103:948–954.
432. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 1999;23:166–175.
433. Weiss HJ, Chervenick PA, Zalusky R, et al. A Familial Defect in Platelet Function Associated with Impaired Release of Adenosine Diphosphate. *New England Journal of Medicine* 1969;281:1264–1270.
434. Downton SB, Beardsley D, Jamison D, et al. Studies of a familial platelet disorder. *Blood* 1985;65:557–563.
435. Ho CY, Otterud B, Legare RD, et al. Linkage of a familial platelet disorder with a propensity to develop myeloid malignancies to human chromosome 21q22.1-22.2. *Blood* 1996;87:5218–5224.
436. Béri-Dexheimer M, Latger-Cannard V, Philippe C, et al. Clinical phenotype of germline RUNX1 haploinsufficiency: from point mutations to large genomic deletions. *Eur J Hum Genet* 2008;16:1014–1018.

437. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, et al. High frequency of RUNX1 biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood* 2009;113:5583–5587.
438. Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, et al. Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood* 2005;105:4664–4670.
439. Jongmans MCJ, Kuiper RP, Carmichael CL, et al. Novel RUNX1 mutations in familial platelet disorder with enhanced risk for acute myeloid leukemia: clues for improved identification of the FPD/AML syndrome. *Leukemia* 2010;24:242–246.
440. Sakurai M, Kasahara H, Yoshida K, et al. Genetic basis of myeloid transformation in familial platelet disorder/acute myeloid leukemia patients with haploinsufficient RUNX1 allele. *Blood Cancer Journal* 2016;6:e392–e392.
441. Michaud J, Wu F, Osato M, et al. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood* 2002;99:1364–1372.
442. Matheny CJ, Speck ME, Cushing PR, et al. Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *EMBO J* 2007;26:1163–1175.
443. Morgan NV, Daly ME. Gene of the issue: RUNX1 mutations and inherited bleeding. *Platelets* 2017;28:208–210.
444. Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, et al. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun* 2014;5:4770.
445. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 2011;20:11–24.
446. Manchev VT, Bouzid H, Antony-Debré I, et al. Acquired TET2 mutation in one patient with familial platelet disorder with predisposition to AML led to the development of pre-leukaemic clone resulting in T2-ALL and AML-M0. *J Cell Mol Med* 2017;21:1237–1242.
447. Antony-Debré I, Duployez N, Bucci M, et al. Somatic mutations associated with leukemic progression of familial platelet disorder with predisposition to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30:999–1002.
448. Hayashi Y, Harada Y, Huang G, et al. Myeloid neoplasms with germ line RUNX1 mutation. *Int J Hematol* 2017;106:183–188.
449. Yamashita N, Osato M, Huang L, et al. Haploinsufficiency of Runx1/AML1 promotes myeloid features and leukaemogenesis in BXH2 mice. *Br J Haematol* 2005;131:495–507.
450. Sood R, English MA, Belele CL, et al. Development of multilineage adult hematopoiesis in the zebrafish with a runx1 truncation mutation. *Blood* 2010;115:2806–2809.
451. Sakurai M, Kunitomo H, Watanabe N, et al. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia* 2014;28:2344–2354.
452. Connelly JP, Kwon EM, Gao Y, et al. Targeted correction of RUNX1 mutation in FPD patient-specific induced pluripotent stem cells rescues megakaryopoietic defects. *Blood* 2014;124:1926–1930.

453. Iizuka H, Kagoya Y, Kataoka K, et al. Targeted gene correction of RUNX1 in induced pluripotent stem cells derived from familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy restores normal megakaryopoiesis. *Exp Hematol* 2015;43:849–857.
454. Li Y, Jin C, Bai H, et al. Human NOTCH4 is a key target of RUNX1 in megakaryocytic differentiation. *Blood* 2018;131:191–201.
455. Berndt MC, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 2011;96:355–359.
456. Andrews RK, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome: an update. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:656–662.
457. Bernard J, Soulier JP. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire hémorragique congénitale. *Sem Hop* 1948;24:3217–3223.
458. Kanska B, Niewiarowski S, Ostrowski L, et al. Macrothrombocytic Thrombopathia. Clinical, Coagulation And Hereditary Aspects. *Thromb Diath Haemorrh* 1963;10:88–100.
459. Cullum C, Cooney DP, Schrier SL. Familial thrombocytopenic thrombocytopathy. *Br J Haematol* 1967;13:147–159.
460. Weiss HJ, Tschopp TB, Baumgartner HR, et al. Decreased adhesion of giant (Bernard-Soulier) platelets to subendothelium: Further implications on the role of the von Willebrand factor in hemostasis. *The American Journal of Medicine* 1974;57:920–926.
461. Nurden AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature* 1975;255:720–722.
462. Clemetson KJ, McGregor JL, James E, et al. Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1982;70:304–311.
463. Berndt MC, Gregory C, Chong BH, et al. Additional glycoprotein defects in Bernard-Soulier's syndrome: confirmation of genetic basis by parental analysis. *Blood* 1983;62:800–807.
464. Andrews R, Berndt M, Lopez J. The glycoprotein Ib-IX-V complex. In: *Platelets*. Michelson AD, ed. Second edition. San Diego, CA: Academic Press, 2006: 64–145.
465. Luo S-Z, Mo X, Afshar-Kharghan V, et al. Glycoprotein Ib α forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ib β subunits in the resting platelet. *Blood* 2007;109:603–609.
466. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, et al. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest* 1991;88:1568–1573.
467. Dong JF, Li CQ, Sae-Tung G, et al. The cytoplasmic domain of glycoprotein (GP) Ib α constrains the lateral diffusion of the GP Ib-IX complex and modulates von Willebrand factor binding. *Biochemistry* 1997;36:12421–12427.
468. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999;190:803–814.
469. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 2000;192:193–204.

470. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, et al. Expression, activation, and function of integrin α M β 2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008;112:2327–2335.
471. Arthur JF, Shen Y, Gardiner EE, et al. TNF receptor-associated factor 4 (TRAF4) is a novel binding partner of glycoprotein Ib and glycoprotein VI in human platelets. *J Thromb Haemost* 2011;9:163–172.
472. Liu J, Pestina TI, Berndt MC, et al. Botrocetin/VWF-induced signaling through GPIb-IX-V produces TxA₂ in an α IIb β 3- and aggregation-independent manner. *Blood* 2005;106:2750–2756.
473. Yin H, Liu J, Li Z, et al. Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway. *Blood* 2008;112:1139–1146.
474. Savoia A, Pastore A, De Rocco D, et al. Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica* 2011;96:417–423.
475. Ware J, Russell SR, Marchese P, et al. Point mutation in a leucine-rich repeat of platelet glycoprotein Ib α resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest* 1993;92:1213–1220.
476. Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2002;100:2102–2107.
477. Cranmer SL, Ashworth KJ, Yao Y, et al. High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIb α -filamin interaction. *Blood* 2011;117:2718–2727.
478. Harrison P, Mackie I, Mumford A, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol* 2011;155:30–44.
479. Kahn ML, Diacovo TG, Bainton DF, et al. Glycoprotein V-deficient platelets have undiminished thrombin responsiveness and Do not exhibit a Bernard-Soulier phenotype. *Blood* 1999;94:4112–4121.
480. Ware J, Russell SR, Vicente V, et al. Nonsense mutation in the glycoprotein Ib α coding sequence associated with Bernard-Soulier syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2026–2030.
481. Wright SD, Michaelides K, Johnson DJ, et al. Double heterozygosity for mutations in the platelet glycoprotein IX gene in three siblings with Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1993;81:2339–2347.
482. Ludlow LB, Schick BP, Budarf ML, et al. Identification of a mutation in a GATA binding site of the platelet glycoprotein Ibbeta promoter resulting in the Bernard-Soulier syndrome. *J Biol Chem* 1996;271:22076–22080.
483. Savoia A, Balduini CL, Savino M, et al. Autosomal dominant macrothrombocytopenia in Italy is most frequently a type of heterozygous Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2001;97:1330–1335.
484. Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, et al. Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. *Blood* 2017;129:520–524.

485. Boisseau P, Debord C, Eveillard M, et al. Two novel variants of uncertain significance in GP9 associated with Bernard-Soulier syndrome: Are they true mutations? *Platelets* 2018;29:316–318.
486. Hadjkacem B, Elleuch H, Gargouri J, et al. Bernard-Soulier syndrome: novel nonsense mutation in GPIIb gene affecting GPIb-IX complex expression. *Ann Hematol* 2009;88:465–472.
487. Strassel C, David T, Eckly A, et al. Synthesis of GPIb beta with novel transmembrane and cytoplasmic sequences in a Bernard-Soulier patient resulting in GPIb-defective signaling in CHO cells. *J Thromb Haemost* 2006;4:217–228.
488. Luo S-Z, Mo X, Afshar-Kharghan V, et al. Glycoprotein Iba forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ib β subunits in the resting platelet. *Blood* 2007;109:603–609.
489. Mo X, Luo S-Z, Munday AD, et al. The membrane-proximal intermolecular disulfide bonds in glycoprotein Ib influence receptor binding to von Willebrand factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008;6:1789–1795.
490. McEwan PA, Yang W, Carr KH, et al. Quaternary organization of GPIb-IX complex and insights into Bernard-Soulier syndrome revealed by the structures of GPIb β and a GPIb β /GPIX chimera. *Blood* 2011;118:5292–5301.
491. Mo X, Nguyen NX, McEwan PA, et al. Binding of platelet glycoprotein Ibbeta through the convex surface of leucine-rich repeats domain of glycoprotein IX. *J Thromb Haemost* 2009;7:1533–1540.
492. Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, et al. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mutat* 2014;35:1033–1045.
493. Ware J, Russell S, Ruggeri ZM. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: The Bernard-Soulier syndrome. *PNAS* 2000;97:2803–2808.
494. Kato K, Martinez C, Russell S, et al. Genetic deletion of mouse platelet glycoprotein Ibbeta produces a Bernard-Soulier phenotype with increased alpha-granule size. *Blood* 2004;104:2339–2344.
495. Kanaji S, Kuether EL, Fahs SA, et al. Correction of murine Bernard-Soulier syndrome by lentivirus-mediated gene therapy. *Mol Ther* 2012;20:625–632.
496. Kanaji S, Fahs SA, Ware J, et al. Non-myeloablative conditioning with busulfan before hematopoietic stem cell transplantation leads to phenotypic correction of murine Bernard-Soulier syndrome. *J Thromb Haemost* 2014;12:1726–1732.
497. Strassel C, Bull A, Moog S, et al. Lentiviral gene rescue of a Bernard-Soulier mouse model to study platelet glycoprotein Ib β function. *J Thromb Haemost* 2016;14:1470–1479.
498. Mekchay P, Ingrungruenglert P, Suphapeetiporn K, et al. Study of Bernard-Soulier Syndrome Megakaryocytes and Platelets Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Thromb Haemost* 2019.
499. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 2011;8:424–429.
500. Montes R, Romero T, Cabrera S, et al. Generation and characterization of the human iPSC line PBMC1-iPS4F1 from adult peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Research* 2015;15:614–617.

501. Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998;72:8463–8471.
502. Norrman K, Fischer Y, Bonnamy B, et al. Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. *PLOS ONE* 2010;5:e12413.
503. Atlas of Human Hematopoietic Colonies. Vancouver, British Columbia Canada: STEMCELL Technologies, Inc.
504. Gordon M. Stem Cells and Haemopoiesis. *Postgraduate Haematology*, John Wiley & Sons, Ltd, 2007:1–12.
505. Klimchenko O, Mori M, Distefano A, et al. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* 2009;114:1506–1517.
506. Tang T, Arbiser JL, Brandt SJ. Phosphorylation by mitogen-activated protein kinase mediates the hypoxia-induced turnover of the TAL1/SCL transcription factor in endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:18365–18372.
507. Rogers HM, Yu X, Wen J, et al. Hypoxia alters progression of the erythroid program. *Exp Hematol* 2008;36:17–27.
508. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, et al. ISCN 2016 : An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. Basel ; New York: Karger Medical Scientific, 2016.
509. Stevens-Kroef M, Simons A, Rack K, et al. Cytogenetic Nomenclature and Reporting. *Methods Mol Biol* 2017;1541:303–309.
510. Gutierrez-Aranda I, Ramos-Mejia V, Bueno C, et al. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells* 2010;28:1568–1570.
511. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, et al. Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;478:391–394.
512. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005;105:617–626.
513. Real PJ, Navarro-Montero O, Ramos-Mejía V, et al. The role of RUNX1 isoforms in hematopoietic commitment of human pluripotent stem cells. *Blood* 2013;121:5250–5252.
514. Tsuzuki S, Hong D, Gupta R, et al. Isoform-specific potentiation of stem and progenitor cell engraftment by AML1/RUNX1. *PLoS Med* 2007;4:e172.
515. Tsuzuki S, Seto M. Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood* 2012;119:727–735.
516. Ran D, Shia W-J, Lo M-C, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood* 2013;121:2882–2890.
517. Chen B, Teng J, Liu H, et al. Inducible overexpression of RUNX1b/c in human embryonic stem cells blocks early hematopoiesis from mesoderm. *J Mol Cell Biol* 2017;9:262–273.

518. Angelos MG, Abrahante JE, Blum RH, et al. Single cell resolution of human hemato-endothelial cells defines transcriptional signatures of hemogenic endothelium. *Stem Cells* 2018;36:206–217.
519. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 2014;508:269–273.
520. Abaci HE, Truitt R, Luong E, et al. Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2010;298:C1527-1537.
521. Zhao D, Liu L, Chen Q, et al. Hypoxia with Wharton's jelly mesenchymal stem cell coculture maintains stemness of umbilical cord blood-derived CD34+ cells. *Stem Cell Res Ther* 2018;9:158.
522. Hammoud M, Vlaski M, Duchez P, et al. Combination of low O(2) concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2012;227:2750–2758.
523. Sharma MB, Limaye LS, Kale VP. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica* 2012;97:651–660.
524. Lee SH, Lee MY, Han HJ. Short-period hypoxia increases mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of arachidonic acid and PI3K/Akt signalling pathways. *Cell Prolif* 2008;41:230–247.
525. Roy S, Tripathy M, Mathur N, et al. Hypoxia improves expansion potential of human cord blood-derived hematopoietic stem cells and marrow repopulation efficiency. *Eur J Haematol* 2012;88:396–405.
526. Zhou L, Zhang X, Zhou P, et al. Effect of testosterone and hypoxia on the expansion of umbilical cord blood CD34+ cells in vitro. *Exp Ther Med* 2017;14:4467–4475.
527. Mohammadali F, Abroun S, Atashi A. Mild hypoxia and human bone marrow mesenchymal stem cells synergistically enhance expansion and homing capacity of human cord blood CD34+ stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2018;21:709–716.
528. Pimton P, Lecht S, Stabler CT, et al. Hypoxia enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into definitive endoderm and distal lung cells. *Stem Cells Dev* 2015;24:663–676.
529. An SY, Heo JS. Low oxygen tension modulates the osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells. *Tissue Cell* 2018;52:9–16.
530. Bianco C, Cotten C, Lonardo E, et al. Cripto-1 is required for hypoxia to induce cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2009;175:2146–2158.
531. Sun X, Pang L, Shi M, et al. HIF2 α induces cardiomyogenesis via Wnt/ β -catenin signaling in mouse embryonic stem cells. *J Transl Med* 2015;13:88.
532. Zhao Y, Matsuo-Takasaki M, Tsuboi I, et al. Dual functions of hypoxia-inducible factor 1 alpha for the commitment of mouse embryonic stem cells toward a neural lineage. *Stem Cells Dev* 2014;23:2143–2155.
533. Cheng L, Hu W, Qiu B, et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Research* 2014;24:665–679.

534. Pramono A, Zahabi A, Morishima T, et al. Thrombopoietin induces hematopoiesis from mouse ES cells via HIF-1 α -dependent activation of a BMP4 autoregulatory loop. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1375:38–51.
535. Shi X-F, Wang H, Kong F-X, et al. Exosomal miR-486 regulates hypoxia-induced erythroid differentiation of erythroleukemia cells through targeting Sirt1. *Exp Cell Res* 2017;351:74–81.
536. Tiwari A, Wong CS, Nekkanti LP, et al. Impact of Oxygen Levels on Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion. *Stem Cells Dev* 2016;25:1604–1613.
537. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, et al. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:237–241.
538. Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int* 2015;2015:628368.
539. Sheridan S, Surampudi V, Rao R. Analysis of Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Means to Assess Pluripotency. *Stem Cells International* 2012;2012:738910.
540. Kawamata S, Kanemura H, Sakai N, et al. Design of a Tumorigenicity Test for Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cell Products. *J Clin Med* 2015;4:159–171.
541. Lamolda M, Montes R, Simón I, et al. GENYOi005-A: an induced pluripotent stem cells (iPSCs) line generated from a patient with Familial Platelet Disorder with associated Myeloid Malignancy (FPDMM) carrying a p.Thr196Ala variant. *Stem Cell Research* 2019.
542. Strassel C, Eckly A, León C, et al. Intrinsic impaired proplatelet formation and microtubule coil assembly of megakaryocytes in a mouse model of Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 2009;94:800–810.
543. Kanaji T, Russell S, Cunningham J, et al. Megakaryocyte proliferation and ploidy regulated by the cytoplasmic tail of glycoprotein Ib α . *Blood* 2004;104:3161–3168.

