

ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO IN VIVO DE HEMATOPOYESIS HUMANA SOBRE UN ESTROMA TRIDIMENSIONAL

T. Ramos<sup>1,2</sup>, S. Carrancio<sup>1,3</sup>, C. Romo<sup>1</sup>, J.F. Pérez-Fontan<sup>4</sup>, J.F. Blanco<sup>5,6</sup>, J.F. San Miguel<sup>1,3,5</sup>, F.M. Sánchez-Guijo<sup>1,5</sup>, S. Cabrita<sup>2</sup>, M<sup>a</sup>. C. del Cañizo<sup>1,3,5</sup>  
<sup>1</sup>Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. <sup>2</sup>Departamento Patología Experimental. Facultad de Medicina. Universidad de Coimbra. <sup>3</sup>Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (CIC/CSIC). <sup>4</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Salamanca. <sup>5</sup>Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia celular de Castilla y León. <sup>6</sup>Servicio de Traumatología. Hospital Universitario de Salamanca

**Objetivo:** Desarrollar un modelo murino de hematopoyesis humana subcutánea empleando células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y células stem mesenquimales (CSM) humanas en una matriz tridimensional.

**Metodología:** Sobre una matriz comercial porosa de trifosfato cálcico e hidroxiapatita (CONDUIT<sup>®</sup>) se cultivaron CSM humanas. Con ellas se desarrollaron dos grupos experimentales. En el primer grupo, tras inducir su diferenciación in vitro a estroma con medio de cultivo a largo plazo, las matrices se inocularon con 2 x 10<sup>5</sup> células CD34+ procedentes de sangre de cordón umbilical (SCU) y se mantuvieron en co-cultivo evaluando semanalmente la producción de colonias CFU-GM y la aparición de adipocitos y áreas de cobblestone. Tras 4 semanas, las matrices con estroma y hematopoyesis humana se implantaron a nivel subcutáneo en ratones NOD/SCID. En el segundo grupo, las matrices con CSM humanas se implantaron en ratones NOD/SCID permitiendo su diferenciación a estroma *in vivo*. A las 6 semanas se inyectaron las células CD34+ de SCU vía intravenosa. En todos los casos el injerto hematopoyético humano se evaluó en sangre periférica y médula ósea mediante citometría de flujo a las 3 semanas pos-trasplante con anticuerpos anti-CD45, CD13 y CD19 humanos.

**Resultados:** En el estudio *in vitro* comprobamos que las matrices tridimensionales eran capaces de mantener los CPH inmaduros siendo capaces de formar colonias CFU-GM durante las 5 semanas de cultivo (2,25 x 10<sup>4</sup>) con valores superiores a los observados en los cultivos clásicos en 2 dimensiones (1,09 x 10<sup>4</sup>). La presencia de adipocitos y áreas de cobblestone se detectó desde la carta semana, una semana después de lo observado en los cultivos 2D. En el modelo animal, a las 3 semanas, el grupo 1 presentaba mayor porcentaje de células humanas en sangre periférica que el grupo 2 (Tabla 1). En médula ósea no había diferencias significativas en el quimerismo humano entre ambos grupos, pero el grupo 1 mostraba mayor injerto mieloide. No se observaron células de estirpe linfoide. Estos datos muestran una mayor producción en sangre periférica de las matrices diferenciadas in vitro, que además permite su migración a médula ósea y acelera el injerto mieloide.

Tabla 1: Injerto hematopoyético humano en ratones NOD/SCID. Porcentaje de células CD45+ humanas en sangre periférica y médula ósea a las 3 semanas posttrasplante. Porcentaje de células CD13+ dentro de la población humana				
	Grupo 1 (n=6)		Grupo 2 (n=6)	
	% CD45	%CD13	% CD45	%CD13
Sangre periférica	11,91% (9-17)	N.D.	8,8 (8-10)	N.D.
Médula ósea	1,65 (1-2)	17,39 (14-34)	2,6 (2-3)	7,05 (3-17)
N.D.: No detectable Datos expresados como mediana (rango).				

**Conclusión:** Estos estudios indican que la matriz empleada en este modelo permite el mantenimiento de CPH humanos en un modelo de hematopoyesis tanto in vivo como in vivo con un estroma humanizado. Este modelo de hematopoyesis permitiría el estudio de la hematopoyesis normal y patológica y su interrelación con el estroma.