

MÉTODO *IN VITRO* PARA EVALUACIÓN FUNCIONAL DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere al campo general de la terapia celular, particularmente, al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas generalmente útiles en el tratamiento de enfermedades que afecten la fisiología hematopoyética.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de distintas fuentes es una terapia celular basada en la infusión de CPH como material de injerto y reemplazo del tejido hematopoyético para tratar cualquier enfermedad que afecte la fisiología
15 hematopoyética.

Para que el trasplante sea eficaz, es necesario que, luego de la infusión, las CPH migren al compartimento intramedular de la médula ósea (MO), se injerten y proliferen en el nicho hematopoyético (NH). Los CPH presentes en el material biológico del trasplante
20 se alojan y crecen en la MO para formar las células de la sangre, sin embargo, se requiere que antes del trasplante, las CPH deben ser evaluadas en su inmunofenotipo y capacidad funcional.

El inmunofenotipo y la capacidad funcional son criterios que evalúan la calidad del
25 material de injerto, tales como: el número de células nucleadas totales viables, la capacidad clonogénica (formación de unidades de colonias, UFC) y la compatibilidad de antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés), los cuales determinan parcialmente el tiempo que toma el injerto de CPH en la médula ósea. La variabilidad interindividual en la cantidad y función de las células presentes en el material biológico
30 que se trasplanta debe ser evaluada en cada donación.

Así, en las muestras de los donantes se realiza el conteo de células viables en las poblaciones celulares presentes de MO, sangre periférica (SP) y sangre de cordón umbilical (SCU) por inmunofenotipificación de las moléculas CD34+ y CD45+ y los ensayos de clonogenicidad que evalúan el potencial de las células de responder a factores de crecimiento y proliferar para producir UFC. De acuerdo con esos análisis se verifican los valores correlativos de las dosis de células CD34+ y UFC por kg de peso del paciente las cuales determinan el resultado del trasplante (Castillo N, et al. 2015. Post-Thaw Viable CD45+ Cells and Clonogenic Efficiency are Associated with Better Engraftment and Outcomes after Single Cord Blood Transplantation in Adult Patients with Malignant Diseases. Biol Blood Marrow Transplant. Dec;21(12):2167-2172).

El análisis de clonogenicidad indica la capacidad proliferativa como una medida de viabilidad y de la capacidad de diferenciación a diferentes linajes hematopoyéticos (funcionalidad) de las células, es típicamente determinado por un método que implica el conteo manual de UFC en el microscopio. Este análisis generalmente varía con el observador y reporta altos niveles de error. Adicionalmente, obtener el resultado tarda, como mínimo, siete días del cultivo de las células. Aun así, la dosis de células CD34+ y de UFC son las medidas más precisas disponibles en la actualidad para predecir la capacidad del injerto hematopoyético.

Existen múltiples estudios que evalúan el potencial terapéutico de células para aplicaciones en investigación de cáncer, terapia celular, diagnóstico, migración celular, angiogénesis, embriogénesis, crecimiento de axones e inmunología entre otras, así como métodos de ensayo que determinan el estatus proliferativo de CPH.

Por ejemplo, la patente US2018/0236442 divulga ensayos que permiten cuantificar la migración celular dirigida, evaluar la respuesta a la migración celular y la respuesta a la adherencia celular en poblaciones celulares. Ese documento también divulga un dispositivo para medir la respuesta de adhesión celular, el cual cuantifica la respuesta de adhesión dirigida desencadenada por la presencia de factores inductores de migración.

Por otra parte, la patente US7,700,354 divulga métodos de ensayo que determinan el estatus proliferativo de células hematopoyéticas y progenitoras, así como ensayos para evaluar compuestos que modulan el crecimiento de dichas células e identificar subpoblaciones de las mismas, adecuadas para trasplante. En un aspecto, esa patente divulga un ensayo para determinar el estatus proliferativo de una población de células hematopoyéticas primitivas en función del contenido de ATP de las células, donde el nivel detectado de ATP indica el estatus proliferativo de las células hematopoyéticas primitivas. En un aspecto adicional, el método allí divulgado comprende poner en contacto la población de células hematopoyéticas primitivas con al menos una citoquina y opcionalmente generar una población celular sustancialmente enriquecida en CPH.

Adicionalmente, la solicitud de patente US2020/0268850 divulga métodos y composiciones para movilizar CPH el cual comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un agente que inhibe el nivel o actividad de exostolina 1 (EXT1) en el sujeto y de esa manera movilizar las CPH y/o progenitoras hacia la sangre periférica del sujeto.

Aunque en el estado de la técnica se enseñan alternativas de métodos y dispositivos para evaluar o promover la movilización celular, aún persiste la necesidad de métodos que permitan evaluar la actividad proliferativa y de diferenciación de las CPH pre-trasplante, con mayor precisión y en menor tiempo que los ensayos de clonogenicidad que se emplean actualmente. Así mismo, persiste la necesidad de una técnica que permita discernir la funcionalidad de los mínimos porcentajes de CPH presentes en las fuentes usadas para trasplante o de las células neoplásicas presentes en pacientes con leucemia.

La presente invención representa una solución a dicha necesidad no resuelta, pues proporciona una prueba que predice la capacidad de respuesta de las CPH a los estímulos específicos del NH que permiten su anidación (también denominada “*homing*”), la cual se correlaciona con su potencial de formar colonias. Más aún, en el caso de muestras de pacientes con leucemia, la capacidad de respuesta a los estímulos del NH puede contribuir a predecir la capacidad invasora de las células neoplásicas a dicho NH. Adicionalmente

el método desarrollado puede ser empleado como método de purificación de las células que migran específicamente hacia los NH, para su aplicación clínica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para cuantificar y evaluar la actividad de una fuente de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) viables, que comprende las etapas de: a) incubar una solución de adhesión en una superficie o compartimiento de adhesión; b) adicionar en un compartimiento quimiotáctico un buffer de migración que comprende un agente quimiotáctico; c) suspender la fase celular de una fuente de CPH en un buffer de migración e incubarla en un compartimiento celular; d) recolectar el contenido del compartimiento quimiotáctico y contabilizar las células que migraron; en donde el compartimiento celular está separado del compartimiento quimiotáctico a través de la superficie o compartimiento de adhesión; y en donde el compartimiento celular y el compartimiento quimiotáctico están comunicados por medio de una solución de continuidad que comprende un gradiente quimiotáctico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Quimioquinesis de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) de donantes de sangre de cordón umbilical (SCU) y líneas leucémicas. Las células se sembraron en cajas transwell y se incubaron durante 3 horas para determinar su migración sin estímulo (RPMI 1640, BSA 2%). Se muestra el número de eventos obtenidos en el análisis por citometría de flujo de las CPH (n=15) de 12 donantes de SCU y las líneas celulares K562 (n=11), U937 (n=13), Jurkat (n=12) y Nalm6 (n=12). Cada donante de CPH se representa con una figura geométrica. Se realizaron réplicas de 3 donantes de CPH. El análisis estadístico se hizo con el test para medidas no paramétricas Kruskal-Wallis: $p \leq 0,01(**)$ y $p \leq 0,0001(****)$. Datos analizados en el programa GraphPad Prism 6.

30

FIG. 2 Quimiotaxis y haptotaxis inducida por el estímulo individual y combinado de VCAM-1 y CXCL12 en CPH de donantes de SCU y líneas leucémicas. Se comparó el

IMC de CPH (n=8 donantes) y de las líneas leucémicas (K562, U937, Nalm6 y Jurkat) con igual número de experimentos (n=4) frente a dos concentraciones diferentes de CXCL12 (50 ng/mL [+] y 100 ng/mL [++]) y 10 µg/mL de VCAM-1 [+]. Análisis estadístico Friedman test: $p \leq 0,05$ (*) y $p \leq 0,01$ (**) indican significancia estadística.

5 Datos analizados en el programa GraphPad Prism 6.

FIG. 3A Caracterización de quemoquinas de los medios condicionados por células estromales mesenquimales (MeCoCEM). Comparación de las Intensidades de Fluorescencia Media (IMF) de quemoquinas y factores de crecimiento secretados en los MeCoCEM del donante 1 (D-CPM-84) a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo en los pases 3 (izquierda) y 6 (derecha).

FIG. 3B Comparación de IMF de quemoquinas y factores de crecimiento secretados en los MeCoCEM del donante 2 (D-CPM-75) a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo en los pases 3 (izquierda) y 6 (derecha).

FIG. 4 Comparación del IMC entre donantes de CPH frente a MeCoCEM y VCAM-1/ MeCoCEM. Se comparó el IMC de CPH de distintos donantes de SCU en respuesta al estímulo de MeCoCEM coloectados a las 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo, incluyendo las combinaciones de los MeCoCEM con VCAM-1 (10 µg/mL) y VCAM-1 (10 µg/mL) con CXCL12 [50 ng/mL]. Datos analizados en el programa GraphPad Prism 6.

FIG. 5 Correlación entre clonogenicidad e IMC de células mononucleares (CMN) de SCU. Las unidades formadoras de colonias (UFC) se promediaron de la lectura por duplicado de los pozos de dos donantes distintos de CMN de SCU. El IMC se evaluó en CMN de diferentes donantes de SCU. Se usaron combinaciones de los biomarcadores funcionales VCAM-1 (10 µg/mL), CXCL12 (100 ng/mL) y los MeCoCEM de CU de diferentes donantes. El análisis estadístico se hizo mediante una regresión lineal con una $p=0,0046$ y un coeficiente de correlación de $R= 0,6547$. En las gráficas se representa el Donante 1 (triángulo negro) y Donante 2 (triángulo blanco). Datos analizados en el programa GraphPad Prism 6.

FIG. 6 Curva de titulación de clonogenicidad según número de células CD34⁺ sembradas. Se sembraron por pozo con medio MethoCult (STEMCELL™ TECHNOLOGIES) sin EPO más medio Iscove Modified Dulbecco Media (IMDM) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) entre 200 y 1000 células CD34⁺/pozo según el conteo absoluto de células CD34⁺ determinado por el kit Stem Cell Enumeration (Becton Dickinson) por donante. Células de donantes distintas se sembraron en una caja de cultivo de 6 pozos y se cultivaron durante catorce días a 37°C con una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂. Se realizó el conteo de UFC por dos observadores independientes.

FIG. 7 IMC de líneas leucémicas (n=7) frente a VCAM-1 con MeCoCEM de los donantes 1 y 2, colectados cada 24 horas de cultivo. Análisis estadístico Friedman test: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***) indican significancia estadística. Datos analizados en el programa GraphPad Prism 6. En las gráficas se representa el error estándar de la media (SEM).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para propósitos de interpretar los términos usados a lo largo del presente documento se debe tener en cuenta su significado usual en el campo técnico, a menos que se incorpore una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, los términos utilizados en forma singular también incluirán la forma plural.

La presente invención está dirigida a un método *in vitro* para cuantificar y evaluar la actividad de una fuente de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) viables, que comprende incubar una solución de adhesión en una superficie o compartimiento de adhesión; adicionar en un compartimiento quimiotáctico un buffer de migración que comprende un agente quimiotáctico; suspender la fase celular de una fuente de CPH en un buffer de migración e incubar la fuente de CPH en un compartimiento celular; recolectar el contenido del compartimiento quimiotáctico y contabilizar las células que migraron; en donde el compartimiento celular está separado del compartimiento quimiotáctico a través de la superficie o compartimiento de adhesión; y en donde el

compartimiento celular y el compartimiento quimiotáctico están comunicados por medio de una solución de continuidad que comprende un gradiente quimiotáctico.

5 Teniendo en cuenta la confluencia de ciertas vías de señalización intracelular en la autorenovación, proliferación y migración celular de CPH, se podría inferir que estímulos del NH inducen su función y localización hematopoyética de manera simultánea. Así mismo, la capacidad de invasión y proliferación de las células leucémicas podría responder a este mismo patrón. Evidencias en el modelo de primates en las que el bloqueo de moléculas de adhesión como la molécula de citoadhesión vascular-1 (VCAM-1) o la
10 molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y quimiotaxis como quimiocina 12 con motivo C-X-C (CXCL12) inducen una movilización de las CPH desde la MO a la sangre periférica (Sahin AO, Buitenhuis M. 2012. Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. Cell Adh Migr. Jan-Feb;6(1):39-48. doi: 10.4161/cam.18975. PMID: 22647939; PMCID: PMC33641362), permitiría colegir que
15 una evaluación funcional de estas células ante estos estímulos podría detectarlas, clasificarlas y aislarlas por su potencial terapéutico.

El método de la presente invención permite evaluar el contenido de células de una fuente de CPH que tiene el potencial de formar colonias, y que, a su vez, se relaciona con la
20 capacidad migratoria de dichas células hacia ciertos estímulos del NH. Además, el método permite la selección y cuantificación de CPH de manera equivalente a las que se detectan en los ensayos de clonogenicidad. El método desarrollado puede convertirse en un método de cuantificación funcional de CPH pre-trasplante, automatizado y preciso para la evaluación de diversas fuentes de CPH. De hecho, la capacidad migratoria de las
25 CPH puede usarse con fines de separar CPH de mezclas celulares y recolectarlas para su uso en terapia celular, de tal manera que el método aquí descrito puede emplearse para purificar CPH de distintas fuentes para su uso clínico.

Así mismo, teniendo en cuenta que la capacidad migratoria de células leucémicas o
30 tumorales tiene relación con la malignidad de estas patologías, el método desarrollado también podría ser usado como biomarcador funcional pronóstico que permita determinar

la capacidad de las células leucémicas o tumorales de invadir el NH y desplazar a las CPH.

Para efectos de la presente invención una “fuente de células progenitoras hematopoyéticas” hace referencia a las fuentes de obtención de CPH, entre las cuales se identifican la médula ósea (MO), sangre periférica movilizada (SPm) o sangre de cordón umbilical (SCU). En una modalidad de la presente invención, la fuente de CPH puede ser células mononucleares aisladas de cualquiera de las anteriores fuentes. En una modalidad particular, la fuente de CPH es la SCU.

10

Las CPH pueden ser células frescas pre-trasplante o células descongeladas pre-trasplante. De acuerdo con el método de la presente invención, las CPH pueden aislarse por cualquier método conocido que concentre las CPH, por ejemplo, técnicas de aislamiento tales como: uso de equipos automatizados (Sepax®, AXN®), aislamiento de células mononucleares (CMN) por gradientes de densidad, aislamiento con perlas inmunomagnéticas o separación celular por citometría de flujo (sorting); estas dos últimas, por selección positiva a través de anticuerpos dirigidos hacia moléculas específicas de CPH como: CD34⁺, CD133⁺ o por selección negativa con anticuerpos de linaje específico.

20

En una modalidad particular de la presente invención los aislados de CMN y CPH (aislamiento inmunomagnético de células CD34⁺, Milteyi) se confirman mediante conteo absoluto de células CD34⁺/CD45⁺ con el kit Stem Cell Enumeration en tubos TruCount (BD, Becton Dickinson) por el aplicativo clínico FACSCanto Software (BD, Becton Dickinson) del citómetro FACSCantoII (Becton Dickinson).

25

De acuerdo con la presente invención, una “solución de adhesión” se entiende como una solución que contiene moléculas de adhesión celular, es decir, aquellas que median la adhesión célula a célula o la adhesión de la célula con la matriz extracelular. Como es sabido por cualquier persona medianamente versada en la materia, las moléculas de adhesión comprenden cuatro grandes familias, a saber, familia de integrinas, de inmunoglobulinas, de selectinas y de cadherinas.

30

En una modalidad de la presente invención, la solución de adhesión comprende moléculas seleccionadas entre molécula de citoadhesión vascular-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1), molécula de adhesión intercelular-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1) laminina, fibronectina, colágeno y mezclas de las mismas. En una
5 modalidad particular, la solución de adhesión comprende VCAM-1.

Dichas moléculas de adhesión pueden estar en una concentración del orden de pg/mL a mg/mL en la solución de adhesión. En una modalidad de la invención, la concentración de las moléculas de adhesión es del orden de µg/mL. En una modalidad particular, la
10 concentración de dichas moléculas es de entre 1 y 100 µg/mL, entre 1 y 50 µg/mL, entre 50 y 100 µg/mL. En otra modalidad particular, la concentración está entre 5 y 20 µg/mL. En una modalidad aún más particular, la concentración de las moléculas de adhesión es de 10 µg/mL.

15 En una modalidad de la invención, la solución de adhesión además comprende buffer fosfato salino (PBS). En una modalidad particular la concentración de PBS es 1X.

Para efectos de la presente invención, el “*buffer de migración*” es una composición en la cual se suspenden las células para llevar a cabo el proceso de migración. En una
20 modalidad de la presente invención el buffer de migración comprende medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) y albúmina sérica bovina (BSA) o albúmina sérica humana (HSA). En una modalidad particular, el buffer de migración comprende un agente quimiotáctico. Un “*agente quimiotáctico*” corresponde a una sustancia que induce a las CPH a migrar hacia el NH. Así, el agente quimiotáctico se selecciona entre, sin
25 limitarse a la quimioquina denominada CXCL12 (factor derivado de células estromales-1, *Stromal cell-derived factor-1*, o SDF-1), factor de células madre (*Stem Cell Factor*, SCF), factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte growth factor*, HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), ligando de tirosina quinasa 3 tipo FMS (*FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*, FLT3L), ligando de quimiocina 2 (*chemokine (C-C motif)*
30 *ligand 2*, CCL-2), trombopoyetina (TPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (*Granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF), factor estimulante de colonias de

granulocitos y macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) y medios condicionados de células estromales mesenquimales (MeCoCEM), o mezclas de los mismos.

5 Para efectos de la presente invención, los “*medios condicionados de células estromales mesenquimales*” (MeCoCEM) se refieren a medios obtenidos de cultivos *in vitro* de células estromales mesenquimales (CEM) que han secretado a dicho medio factores solubles y moléculas de señalización que usan típicamente para crecer. En una modalidad particular de la presente invención el buffer de migración comprende MeCoCEM de
10 gelatina de wharton de cordón umbilical que se cultivaron en medio *Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium* (DMEM) sin suero durante 24, 48, 72 y 96 h. En otra modalidad particular los MeCoCEM contienen factores tales como, sin limitarse a IL-6, IL-8, MCP-1, HGF, VEGF, G-CSF, entre otros.

15 De acuerdo con la presente invención, el compartimiento celular, el compartimiento de adhesión y el compartimiento quimiotáctico corresponden a ubicaciones/secciones de cualquier dispositivo conocido en la técnica que permita la migración celular, por ejemplo, seleccionado entre, sin limitarse a una caja *transwell*, cámaras de migración basadas en microfluidos, cámara de Boyden, cámara de Dunn o técnicas capilares. En
20 cualquier caso, en el dispositivo, el compartimiento celular y el compartimiento quimiotáctico están separados a través del compartimiento / superficie de adhesión, que permite fijar el sustrato adherente (haptotáctico) y permite el paso de las células a través del mismo. A su vez, los compartimentos en el dispositivo están comunicados por medio de una solución de continuidad que consiste en el buffer de migración que comprende un
25 gradiente quimiotáctico.

Para efectos de la presente invención, se entiende que el “*gradiente quimiotáctico*” corresponde al gradiente de concentración del estímulo quimiotáctico que se genera en el buffer de migración debido a la presencia del estímulo quimiotáctico en el buffer de
30 migración del compartimiento quimiotáctico, y la ausencia del mismo en el buffer de migración del compartimiento celular. Así, la migración de las células está determinada por dicho gradiente de concentración del estímulo quimiotáctico desde una concentración

menor de dicho estímulo en el buffer de migración en el que éstas se encuentran suspendidas (compartimento celular), hacia una concentración mayor de dicho estímulo en el buffer de migración del compartimento quimiotáctico.

- 5 En una modalidad particular, el compartimento celular y el compartimento quimiotáctico corresponden a las cámaras superior e inferior de una caja *transwell* que se comunican a través una membrana porosa, de poro de tamaño entre 5 y 8 μm , la cual constituye el compartimento de adhesión. El tamaño del poro de la membrana debe permitir que las CPH depositadas en él migren a través de ella.

10

Así, la etapa de incubación de la solución de adhesión consiste en preparar el compartimento de adhesión adicionando la solución de adhesión e incubar durante 12 a 24 horas a 37°C con una atmósfera entre 3 y 5% de CO₂, con el fin de que la molécula de adhesión se fije en la superficie del compartimento de adhesión.

15

Adicionalmente, la incubación de la fase celular de una fuente de CPH en el buffer de migración en el compartimento celular ocurre de 2 a 5 horas a 37°C con una atmósfera entre 3 y 5% de CO₂. Más particularmente, las condiciones de incubación de esta etapa son una incubación de 3 h a 37°C con 5% de CO₂.

20

Finalmente, de acuerdo con el método de la presente invención, las células que migran desde el compartimento celular hacia el compartimento quimiotáctico y que se recolectan en el compartimento quimiotáctico se pueden contabilizar por cualquier método conocido en la técnica, tales como citometría de flujo, hematocitometría, conteo

25

en cámara de Neubauer.

30

En una modalidad particular de la presente invención, el método comprende: incubar una solución de adhesión en la cámara superior de una caja *transwell*; adicionar buffer de migración que comprende un agente quimiotáctico en la cámara inferior; dispensar CPH suspendidas en buffer de migración en la cámara superior e incubar; recoger el contenido de la cámara inferior y relacionar las células del mismo donante que migraron con y sin estímulo. En una modalidad particular, se transfiere un volumen de la cámara inferior a

un tubo de citometría para realizar el conteo del número absoluto de las células que migraron. La cantidad de eventos (# eventos) se registra por citometría de flujo.

5 En una modalidad adicional de la presente invención, el método permite evaluar la migración de líneas celulares de cánceres humanos y extrapolar los resultados a la terapia celular. En una modalidad particular, las líneas celulares incluyen, sin limitarse a K562, U937, Jurkat y Nalm6.

10 La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

15 **Ejemplo 1. Caracterización molecular de medios condicionados de CEM.**

Las CEM aisladas de gelatina de wharton de cordón umbilical de diferentes donantes, se cultivaron desde pase cero en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco®) suplementado (10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco®) inactivado, 100
20 µg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina) hasta alcanzar una confluencia del 80-90 % y diferentes pases (3 a 6). Los cultivos se lavaron con PBS 1X estéril pH 7.4 (Gibco®) tibio, para eliminar restos de DMEM suplementado. Las células se mantuvieron en cultivo en medio DMEM 1X (sin suplementar) y se incubaron por 96 horas a 37 °C, con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Cada 24 horas, los cultivos se observaron
25 al microscopio invertido (Leica Microsystems, USA) y se colectaron los MeCoCEM (sobrenadantes) en tubos cónicos de 50 mL estériles (Corning®) en diferentes pases celulares. Los MeCoCEM se centrifugaron a 3000 g por 10 minutos en centrífuga refrigerada, se filtraron (poro 0.45 µm) para reducir la presencia de detritos y se almacenaron a -80 °C. Los MeCoCEM se caracterizaron con el kit *Human Cytokine 30-plex Panel* (Invitrogen™) usando duplicados de cada condición. El análisis de las
30 muestras se realizó mediante el Luminex®200™ System, según el fabricante, y el análisis de los datos, mediante el programa *Graph Pad Prism 6* (San Diego, CA, USA),

promediando los valores (duplicado) de las Intensidades de Fluorescencia Media (IMF) detectadas por el equipo en cada MeCoCEM. Se detectaron siete factores (Eotaxina, HGF, IL-6, IL8, MCP-1, VEGF-1 y G-CSF) de los treinta analizados con Luminex para la lectura del kit. Se observó un aumento discreto de la señal de estos factores conforme
5 avanzó el tiempo de cultivo para la recolección de los MeCo en CEM de 3er y 6to pase (Figura 3).

Ejemplo 2. Migración basal o quimioquinesis de donantes de CPH y de líneas leucémicas.

10

Para los ensayos de migración basal o quimioquinesis se incubó en la cámara inferior un buffer de migración compuesto de RPMI-1640 más 2% BSA (sin estímulo quimiotáctico) para activar la membrana del *transwell* (poro de 5 μ m, Corning Incorporated, Costar®, USA) preincubadas sin estímulo adherente. Después de la incubación, se sembraron
15 50.000 células CD34⁺, K562, Nalm6, Jurkat y U937, cada línea celular en su respectiva cámara superior, suspendidas en buffer de migración. Luego de 3 h de incubación a 37°C y una atmósfera del 5% de CO₂ se contó el número absoluto de las células que migraron a la cámara inferior. Para este fin, se transfirió de la cámara inferior un volumen de 500 μ L de muestra a un tubo de citometría. El número de eventos (# eventos) se adquirió por
20 citometría de flujo con las siguientes condiciones de adquisición: umbral (threshold): 25.000, flow rate: High, stopping time: 60 seg, events record: 100.000 y voltajes: FSC: 260/SSC: 375. (FACSCantoII Becton Dickinson) mediante el programa FACSDiva Software (BD, Becton Dickinson).

25 Las células CD34⁺ se aislaron de 12 donantes con el Kit CD34 MicroBead human (Miltenyi Biotec) según las indicaciones del fabricante a partir de células mononucleares aisladas por gradiente de densidad. Se confirmó una pureza de los aislados de CPH de más del 90% de células CD34⁺ marcadas con el anticuerpo anti-CD34 PerCP-Cy 5.5 (Clon 8G12, BD, epítipo de clase II). Los datos celulares se adquirieron y se analizaron
30 como se indicó arriba. Se observó que el número de eventos adquiridos como migración basal o quimioquinesis es mayor en células CD34⁺ aisladas de los distintos donantes de SCU que en las líneas celulares leucémicas K562, Jurkat, Nalm6 y U937. Se observó una

variabilidad de la migración dependiente del donante que se confirma en las réplicas que se hicieron con células CD34⁺ aisladas del mismo donante pues muestran similar cantidad de eventos (ver Figura 1, rombo, cuadrado y círculo sin relleno). El valor del número de eventos adquiridos por citometría de flujo en ensayos de quimioquinesis (migración sin estímulo) fue usado como común denominador del Índice de Migración Celular (IMC), el cual indica las veces que se induce la migración basal ante estímulos haptotáticos y quimiotáticos, según la fórmula $IMC = \frac{\text{número de eventos celulares contados inducidos por haptotaxis o quimiotaxis, o ambos estímulos}}{\text{número de eventos contados de quimioquinesis (sin estímulo)}}$.

Ejemplo 3. Índices de Migración Celular ante los estímulos de VCAM-1 y CXCL12 en diferentes donantes CPH y en líneas leucémicas.

Se realizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Para estos ensayos de migración la cámara superior de pozo de la caja se incubó con 50 µL de la solución de adhesión compuesta por la proteína recombinante VCAM-1 (Sigma-Aldrich, Life Science, USA) a una concentración de 10 µg/mL durante toda la noche a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Después de la incubación, se sembraron 50.000 células CD34⁺, K562, Nalm6, Jurkat y U937, cada línea celular en su respectivo pozo, suspendidas en buffer de migración.

En la cámara inferior se adicionaron 600 µL de medio RPMI (buffer de migración) con CXCL12 recombinante (SDF-1) (R&D systems®, Minneapolis, USA) en concentraciones de 50 y 100 ng/mL.

Como control negativo de quimiotaxis se sembró buffer de migración sin agente quimiotático en la cámara inferior. Las células se incubaron durante 3 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Luego de 3 h de incubación a 37°C y una atmósfera del 5% de CO₂ se contó el número absoluto de las células que migraron a la cámara inferior.

Para realizar el conteo del número absoluto de las células que migraron se realizó el mismo procedimiento del Ejemplo 2. El IMC se calculó con el número de eventos celulares contados inducidos por haptotaxis o quimiotaxis, o ambos estímulos / número de eventos contados de quimioquinesis (sin estímulo) – obtenido según el Ejemplo 2. La combinación del estímulo haptotático de VCAM-1 y el estímulo quimiotático de CXCL12 induce un IMC de las CPH (células CD34⁺) de 20 veces como promedio de los distintos donantes. Las líneas celulares U937 y Jurkat presentan índices de hasta 60 veces la migración basal los cuales tienden a disminuir a 20 al usar concentraciones mayores del CXCL12 (100 ng/mL, ++). La línea Nalm6 presenta un comportamiento similar al de CPH, mientras que la línea K562 no responde a esos mismos estímulos. La línea celular Nalm6 serviría como control positivo y la K562 como control negativo del ensayo funcional de CPH (Figura 2).

Ejemplo 4. Índices de Migración Celular de CPH ante los estímulos de VCAM-1 y medios condicionados de CEM.

El ensayo se llevó a cabo tal como se describió en los Ejemplos 2 y 3. La solución de adhesión compuesta por la proteína recombinante VCAM-1 se incubó a una concentración de 10 µg/mL durante toda la noche a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Los controles sin estímulo adhesivo se incubaron con un buffer de migración compuesto de RPMI-1640 más 2% BSA (buffer de migración) y como control positivo en un pozo sin membrana (control positivo hipotético= migración 100%). En la cámara superior preincubada o no, con el estímulo adherente, las células CD34⁺ de distintos donantes se suspendieron en buffer de migración. Se sembraron 50.000 células CD34⁺ por ensayo de cada donante de CPH, representada con una figura geométrica en la Figura 4. En la cámara inferior se adicionaron los MeCoCEM, que son los medios de cultivo DMEM sin suero fetal bovino (SFB), condicionados durante 24, 48, 72 y 96 horas con CEM de acuerdo con el Ejemplo 1. El MeCoCEM se aisló de CEM en tercer pase de cultivo celular. El uso de MeCoCEM como agentes quimiotáticos combinados con el estímulo haptotático de VCAM-1 indujo diferencialmente la migración CPH de un modo similar al inducido por la combinación del estímulo haptotático VCAM-1 y el

quimiotáctico CXCL12. La variación interindividual del IMC permitió discernir entre la capacidad migratoria de las CPH de los distintos donantes mientras que la consistencia del IMC intraindividual permitió establecer la definición de donantes de CPH de alto o bajo potencial migratorio. Los MeCoCEM se colectaron de dos donantes (MeCoCEM 1 y MeCoCEM 2) de CEM cultivadas en tercer pase. (Figura 4)

Ejemplo 5. Correlación entre ensayos de clonogenicidad y ensayos de migración en CMN de SCU.

CMN aisladas por gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque sometidas a ensayos de migración se colectaron en las cámaras inferiores después de las 3 h de la incubación descrita en los Ejemplos 2, 3 y 4. Del volumen total del buffer de migración de la cámara inferior del transwell se recogió una muestra de 500 µL para realizar el cálculo de IMC y 20 µL se sembraron en medio MethoCult sin EPO (STEMCELL™ TECHNOLOGIES) en placas de 12 pozos para cultivo (Corning Incorporated, Costar®, USA) y se cultivaron durante catorce días a 37°C con una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂. Se realizó el conteo de UFC por dos observadores independientes. Se realizó una curva de correlación entre IMC y UFC por donante. Un donante se representó con un triángulo relleno y el otro donante con uno vacío. (Figura 5)

Ejemplo 6. Curva de titulación de clonogenicidad de CPH.

En medio MethoCult (STEMCELL™ TECHNOLOGIES) sin EPO más IMDM suplementado con 2% de SFB se sembraron 200, 400, 600, 800 y 1000 células CD34⁺/pozo, según el conteo absoluto de células CD34⁺ determinado por el kit Stem Cell Enumeration (Becton Dickinson) por donante. Células de donantes distintas se sembraron en caja de cultivo de 6 pozos y se cultivaron durante catorce días a 37°C con una atmósfera humidificada al 95% y 5% de CO₂. Se realizó el conteo de UFC por dos observadores independientes. Se observó una correspondencia entre el número de células CD34⁺ y la capacidad de formar colonias lo que permite calcular la cantidad de células CD34⁺ a las que corresponden los IMC obtenidas según el Ejemplo 5. (Figura 6)

Ejemplo 7. Índices de Migración Celular de células leucémicas ante los estímulos de VCAM-1 y medios condicionados de CEM.

Se usó el mismo diseño experimental que en el Ejemplo 4 y se observó que las células
5 Jurkat, U937 y Nalm6 respondieron de manera significativa a la inducción por MeCoCEM colectados a los distintos tiempos de cultivo, como se observa en la Figura 7. Lo anterior permitió concluir que el método de la presente invención podría contribuir para detectar la capacidad invasora de las células neoplásicas al NH.