



**Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Zacatenco**

**Caracterización de las células Isthmin-1<sup>+</sup> con  
fenotipo troncal-hematopoyético derivadas de  
pulmón**

Tesis que presenta

**M. C. Guadalupe Rivera Torruco**

Para obtener el grado de  
**Doctora en Ciencias**

En la Especialidad de Fisiología Celular y Molecular

Director de Tesis:  
Dr. Porfirio Nava Domínguez  
Dr. Ricardo Valle-Ríos

CDMX, México

Julio 2022

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez y el Laboratorio 41 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV IPN, bajo la dirección del Dr. Porfirio Nava Domínguez y el Dr. Ricardo Valle Ríos. Durante el desarrollo del mismo, la autora fue becaria de CONACYT (No. 587971). Este trabajo fue apoyado por el CONACYT ciencia Básica 222775 y Fondos Federales HIM SSA: 1139, 1472 y 1530.

## **Agradecimientos**

A Dios por todo lo que me ha dado y por dejarme creer.

A mi familia que siempre me ha apoyado, por su cariño, apoyo y compañía.

A mis compañeros y a los amigos que conseguí en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV; así como mis compañeros y amigos del Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México.

A mis asesores de tesis el Dr. Porfirio Nava Domínguez y el Dr. Ricardo Valle Rios por guiarme durante este proyecto y apoyarme para conseguir mis metas futuras.

A mis sinodales dentro y fuera del CINVESTAV, por sus consejos, correcciones y guía durante la elaboración de este proyecto.

Al CINVESTAV por todo lo que me ha permitido lograr, al Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, al Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo en la realización de este trabajo.

# Índice

<b>Índice de figuras</b>	<b>6</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>8</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>14</b>
1.1. Sistema inmunológico innato . . . . .	14
1.2. Sistema inmunológico adaptativo . . . . .	16
1.3. Hematopoyesis: El origen de las células del sistema inmunológico . . . . .	17
1.4. Hematopoyesis: Ontogenia de las células troncales hematopoyéticas . . . . .	18
1.5. Hematopoyesis extramedular en adultos . . . . .	22
1.6. Mecanismos de inmunidad en el pulmón . . . . .	25
1.7. Hematopoyesis extramedular asociada al pulmón . . . . .	26
1.8. Isthmin-1 . . . . .	29
<b>2. Definición del problema</b>	<b>31</b>
2.1. Planteamiento . . . . .	31
2.2. Preguntas científicas . . . . .	31
2.3. Hipótesis . . . . .	31
<b>3. Objetivos</b>	<b>32</b>
3.1. Obejtivo general . . . . .	32
3.2. Objetivos particulares . . . . .	32
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>33</b>
4.1. Animales de laboratorio . . . . .	33
4.2. Obtención de las células linfoides . . . . .	33
4.3. Fenotipificación por citometría de flujo . . . . .	34
4.4. Fenotipificación por microscopia de flujo . . . . .	35
4.5. Localización extravascular de las células ISM1 . . . . .	35
4.6. Co-cultivos de células de pulmón con ISM1 recombinante . . . . .	35
4.7. Infección con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	36
4.8. Muestras de pacientes humanos . . . . .	36
4.9. Análisis estadístico . . . . .	37



<b>5. Resultados</b>	<b>38</b>
5.1. Las células ISM1 <sup>+</sup> están enriquecidas en pulmón murino .	38
5.2. Las células ISM1 <sup>+</sup> de pulmón son de fenotipos progenitores endotelial y hematopoyético . . . . .	45
5.3. Células ISM1 <sup>+</sup> con fenotipo troncal y progenitor hemato- poyético de pulmón . . . . .	48
5.4. Las células ISM1 <sup>+</sup> son residentes de tejido . . . . .	48
5.5. ISM1 mantiene a células CD45 y favorece la diferenciación de algunos tipos celulares . . . . .	51
5.6. Las células ISM1 <sup>+</sup> responden a las infecciones . . . . .	55
<b>6. Discusión</b>	<b>62</b>
<b>7. Conclusión</b>	<b>67</b>
<b>8. Perspectivas</b>	<b>68</b>
<b>9. Referencias</b>	<b>69</b>

## Índice de figuras

1.	Sistema inmunológico y sus componentes principales	14
2.	Hematopoyesis. . . . .	19
3.	Ontogenia de las células hematopoyéticas. . . . .	21
4.	Hematopoyesis extramedular. . . . .	23
5.	<i>Gating</i> de células ISM1 <sup>+</sup> derivadas de células de pulmón.	38
6.	ISM1 intracelular es más abundante en pulmón. . . . .	39
7.	Presencia de ISM1 en poblaciones mieloides derivadas de pulmón. . . . .	40
8.	Presencia de ISM1 en poblaciones linfoides derivadas de pulmón. . . . .	42
9.	Las células ISM1 <sup>+</sup> no están enriquecidas en células linfoides innatas. . . . .	44
10.	ISM1 se asocia con marcadores de células progenitoras.	45
11.	Las células ISM1 <sup>+</sup> son más abundantes en progenitores tipo endotelial y hematopoyético. . . . .	47
12.	Morfología de las células progenitoras hematopoyéticas ISM1 <sup>+</sup> . . . . .	49
13.	ISM1 se encuentra en algunas subpoblaciones de células troncales hematopoyéticas. . . . .	50
14.	Las células ISM1 <sup>+</sup> progenitoras son residentes de tejido.	52
15.	<i>Gating</i> para principales poblaciones de leucocitos de pulmón. . . . .	53
16.	Niveles plasmáticos de ISM1. . . . .	54
17.	La adición de rISM1 promueve el establecimiento de células CD45 <sup>+</sup> . . . . .	54
18.	La adición de rISM1 promueve el establecimiento de linfocitos T. . . . .	55
19.	Protocolo de infección con <i>P. aeruginosa</i> PA14USI. . . . .	56
20.	La infección con <i>P. aeruginosa</i> PA14USI disminuye el porcentaje de células ISM1 <sup>+</sup> circulantes en sangre periférica. . . . .	57
21.	Los eventos inflamatorios sistémicos disminuyen los niveles plasmáticos de ISM1. . . . .	58
22.	Cambios globales en las células ISM1 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> . . . . .	58

23.	<b>Cambios en las poblaciones LSK e ISM1+LSK tras la infección con <i>P. aeruginosa</i>.</b> . . . . .	59
24.	<b>Las células tipo progenitoras ISM1+ de pulmón expresan receptores TLR9, TLR4 y TLR5.</b> . . . . .	60
25.	<b>Las células ISM1+ de pulmón son susceptibles a los ligandos de TLR9, TLR4 y TLR5.</b> . . . . .	61

## Índice de tablas

1.	<b>EMH en pulmón</b> . . . . .	28
2.	<b>Lista de anticuerpos</b> . . . . .	109
3.	<b>Pacientes pediátricos hospitalizados con bacteremia</b> .	111

## Abreviaturas

- PRR** *Pattern recognition receptors*/ Receptores reconocedores de patrones
- DAMPs** *Damage associated molecular patterns*/Patrones moleculares asociados a daño
- PAMPs** *Patogen associated molecular patterns*/Patrones moleculares asociados a patógenos
- TLRs** *Toll-like receptors*/Receptores tipo-Toll
- APC** *Antigen presenting cells*/ Células presentadoras de antígeno
- NK** *Natural killer cells*
- IgG** Inmunoglobulina G
- HSCs** *Hematopoietic stem cells*/ Células troncales hematopoyéticas
- AGM** Aorta-gónada-mesonefro
- LT-HSC** *Long term hematopoietic stem cells*/ Células troncales quiescentes o de larga vida
- ST-HSC** *Short term hematopoietic stem cells*/Células troncales activas o de corta vida
- MO** Médula ósea
- SCF** *Stem Cell Factor*/ Factor de células troncales
- Ang-1** Angiopoyetina 1
- TPO-1** Trombopoyetina 1
- EPO** Eritropoyetina
- G-CSF** *Granulocyte colony-stimulating factor*/ Factor estimulante de colonias de granulocitos
- GM-CSF** *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*/ Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
- INF $\alpha$**  Interferón alfa
- INF $\gamma$**  Interferón gamma
- EMH** *Extramedullary hematopoiesis*/ Hematopoyesis extramedular
- IL-3** Interleucina 3
- CT** *Computational tomography*/ Tomografía computacional
- MRI** *Magnetic resonance imaging*/ Imágenes de resonancia magnética
- ISM1** Isthmin-1
- FGF8** *Fibroblastic growing factor 8*/ Factor de crecimiento de fibroblastos 8
- GRP78** *Glucose regulatory protein 78*/ Proteína regulada por glucosa 78

**TSR** *Thrombospondin repeats*/ Repetidos de trombospondina  
**MUC4** Mucina 4 asociada a superficie celular  
**AMOP** *Adhesion-associated domain in MUC4 and other proteins*/ Dominio asociado a adhesión en MUC4 y otras proteínas  
**NKT** *Natural killer T*  
**Th17** *T helper 17/T cooperadora 17*  
**PBS** *Phosphate buffered saline*/ Tampón fosfato salino  
**EDTA** *Ethylenediaminetetraacetic acid*/ Ácido Etilendiaminotetracético  
**SFB** Suero fetal bovino  
**FACS** *Fluorescent activated cell sorting*/ Separación de células activada por fluorescencia  
**HBSS** *Hanks Balanced Salt Solution*/ Solución salina balanceada de Hanks  
**LSK** *Lineage negative Sca1 positive and c-kit positive cells*/ Células linaje negativo positivas para Sca-1 y c-kit  
**TCR** *T cell receptor*/ Receptor de células T  
**BCR** *B cell receptor*/ Receptor de células B  
**Sca-1** Stem cell antigen 1/ Antígeno de células troncales 1  
**ILCs** *Innate lymphoid cells*/ Células linfoides innatas  
**EGF** *Epidermal growth factor*/Factor de crecimiento epidérmico  
**ICOS** Molécula coestimuladora inducible de linfocitos T  
**SCF** *Stem Cell Factor*/ Factor de células troncales  
**EpCAM** Molécula de adhesión epitelial  
**PECAM** Molécula de adhesión de plaquetas/endotelio tipo 1  
**PDGFR $\alpha$**  *Platelet-derived growing factor receptor Alpha*/ Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa  
**GPI** Glicosilfosfatidilinositol  
**HSPCs** *Hematopoietic stem and progenitor cells*/ Células troncales y progenitoras hematopoyéticas  
**EPCs** *Endothelial progenitor cells*/ Células progenitoras endoteliales  
**MSCs** *Mesenchymal stem cells*/ Células troncales mesenquimales  
**MPPs** *Multipotent progenitors*/ Progenitores multipotentes  
**PMN** Polimorfonucleares  
**rISM1** ISM1 recombinante  
**SEM** *Standard error of the mean*/ Error estándar de la media  
**IL-6** Interleucina 6  
**TNF- $\alpha$**  *Tumoral necrosis factor Alpha*/ Factor de necrosis tumoral alfa  
**PCR** Proteína C reactiva  
**TGF- $\beta$**  *Transforming growing factor beta*/ Factor de crecimiento transfor-

mante tipo beta

**CAR** *CXCL12-Abundant Reticular Cells*/ Células reticulares CXCL12<sup>+</sup>

## Resumen

La hematopoyesis ha sido ampliamente estudiado en la homeostasis y durante la respuesta a daño. Recientemente se observó que los pulmones murinos son una fuente de progenitores hematopoyéticos, este proceso se conoce como hematopoyesis extramedular. Mediante el uso de citometría de flujo, identificamos células progenitoras mesenquimales, endoteliales y hematopoyéticas que expresan la molécula Isthmin 1 (ISM1). ISM1 es una proteína secretada que se caracterizó por primera en el cerebro en desarrollo de *Xenopus laevis*. ISM1 tiene funciones en desarrollo que modulan el eje Activina/NODAL. Además, ISM1 ha demostrado ser necesario para la hematopoyesis en pez cebra. Nuestros ensayos *in vitro* con células de pulmón de ratón mostraron que ISM1 mantiene células hematopoyéticas, preferiblemente células T. Una caracterización adicional de las células progenitoras hematopoyéticas mostró que la mayoría de las células ISM1<sup>+</sup> Linaje<sup>-</sup> Sca1<sup>+</sup> ckit<sup>+</sup> (ISM1<sup>+</sup> LSK) son progenitoras multipotentes (MPP) y células troncales hematopoyéticas de corta vida (ST-HSC). Las MPP y las ST-HSC son células progenitoras capaces de replicarse y diferenciarse, pero tienen menos capacidad de reconstitución en comparación con las HSC de larga vida (LT-HSC). Además, la mayoría de las células Sca1<sup>+</sup> ISM1<sup>+</sup> expresaron el marcador de residencia CD49a y esto correlacionó con su localización en la región extravascular del pulmón, lo que indica que las células ISM1<sup>+</sup> son células residentes en el pulmón. Debido a que los progenitores hematopoyéticos pueden activarse y movilizarse durante daños tales como inflamación estéril o infección. Probamos si las células hematopoyéticas progenitoras de pulmón receptores de reconocimiento de patógenos comunes (PRR). Observamos que las células CD45<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup>ISM1<sup>+</sup> expresan TLR4, TLR5 y TLR9. Desafiamos a esas células con un modelo de sepsis en ratón causada por un aislado clínico de *P. aeruginosa* recuperado de un paciente con neumonía severa. En primer lugar, los niveles de LSK de pulmón aumentaron después del daño, similar a sus contrapartes en médula ósea. En segundo lugar, encontramos más LSK positivas para ISM1 en comparación con los controles. Concluimos que ISM1 es un nuevo biomarcador asociado con células progenitoras de pulmón. Las células ISM1<sup>+</sup> son capaces de responder a un desafío bacteriano, lo que sugiere una asociación entre las células productoras de ISM1 y respuestas inflamatorias peligrosas como la sepsis.



## Abstract

The process by which blood cells are generated has been widely studied in homeostasis and during pathogen-triggered inflammatory response. Recently it was observed that murine lungs are a source of hematopoietic progenitors, this process is known as extramedullary hematopoiesis. By using multiparametric flow cytometry, we identified mesenchymal, endothelial, and hematopoietic progenitor cells expressing the secreted molecule Isthmin 1 (ISM1). ISM1 is a secreted protein first characterized from the developing brain of *Xenopus laevis*. ISM1 have roles in developments modulating Activin/NODAL axis. Moreover, ISM1 have proved to be necessary for hematopoiesis in Zebra fish. *In vitro* studies with mouse lung cells showed that ISM1 maintains hematopoietic cells, preferably T cell lymphocytes. Further characterization of hematopoietic progenitor cells showed that ISM1<sup>+</sup> Lineage<sup>-</sup> Sca1<sup>+</sup> ckit<sup>+</sup> (ISM1<sup>+</sup> LSK) cells showed that the majority of these cells are multipotent progenitors (MPPs) and Short-term hematopoietic stem cells (ST-HSC). MPPs and ST-HSCs are progenitor cells capable of cycling but have less repopulating capacity compared to Long-term HSC (LT-HSC) which are the quiescent hematopoietic stem cells commonly found in bone marrow. Moreover, most of Sca1<sup>+</sup> ISM1<sup>+</sup> cells expressed the residence marker CD49a, and this correlated with their localization in the extravascular region of the lung, indicating that ISM1<sup>+</sup> cells are lung-resident cells. Due to hematopoietic progenitors can be activated and mobilized during insults such as sterile inflammation or infection. We tested if lung hematopoietic progenitors expressed common pathogen recognition receptors (PRR). We observed that CD45<sup>+</sup>ckit<sup>+</sup>ISM1<sup>+</sup> cells expressed TLR4, TLR5 and TLR9. We challenge those cells with a mouse model of sepsis caused by clinic isolate of *P. aeruginosa* recovered from a patient with severe pneumonia. First of all, lung LSK levels increased with the insult such as bone marrow LSK perform under infection. Second, we find more LSK positives for ISM1 compared to controls. We conclude that ISM1 is a novel biomarker associated with progenitor-like cells. ISM1<sup>+</sup> cells are capable to respond to a bacterial challenge, suggesting an association between ISM1 producing cells and dangerous inflammatory responses like sepsis.

# 1. Introducción

El sistema inmunológico constituye una red de células, tejidos y órganos que trabajan en conjunto para proteger el cuerpo humano. La función principal de este sistema es la defensa ante patógenos o daños provocados por el medio ambiente. El término “inmunidad” deriva del latín *immunitas* y significa “protección”. De manera clásica, en los vertebrados existen dos tipos de inmunidad, una de respuesta temprana conocida como inmunidad innata y una de respuesta tardía, conocida como inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa, se compone principalmente de: (1) Barreras físicas y químicas, como los diversos epitelios en el organismo; (2) leucocitos (fagocitos, células dendríticas, algunas poblaciones de linfocitos, etc.) y (3) proteínas en la sangre como aquellas que conforman el sistema del complemento. Por otro lado, la inmunidad adaptativa requiere más tiempo para activarse, la defensa que brinda es más específica y se mantiene para proteger ante un reto posterior, se compone de linfocitos T y B [2].

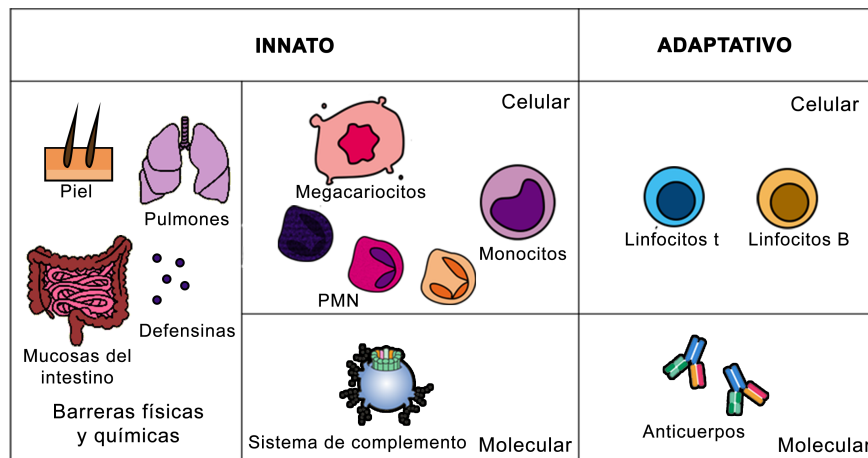


Figura 1: Sistema inmunológico y sus componentes principales

## 1.1. Sistema inmunológico innato

En términos evolutivos, el sistema inmunológico innato es el medio de defensa más antiguo que poseen los seres vivos, se encuentra tanto en vertebrados como en invertebrados e incluso en organismos primitivos

multicelulares. En vertebrados este sistema incluye: (1) barreras anatómicas físicas como la piel, (2) células especializadas que se reclutan al sitio de infección, (3) procesos de activación del complemento para identificar y promover la destrucción de organismos extraños, (4) mecanismos para la identificación de organismos o sustancias extrañas en los tejidos del organismo y (5) vías de activación del sistema inmunológico adaptativo [98].

Las barreras naturales que protegen al organismo de agentes patógenos son la piel y las mucosas. Estos tejidos forma barreras físicas que protegen al medio interno a través de la descamación, la presencia de uniones estrechas, los péptidos antimicrobianos (defensinas) y la producción de moco, para evitar la entrada de bacterias, parásitos y virus [138]. El sistema inmunológico innato reconoce las señales de daño mediante diversos receptores. Los más estudiados son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que son activados por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o asociados a daño (DAMPs). Dentro de los PRRs tenemos a los receptores tipo-Toll (TLRs) que son estimulados por diversos tipos de microorganismos completos o parte de ellos [151]. Estos receptores son expresados por células propias del sistema inmunológico innato, así como los tejidos epiteliales que separan el interior del organismo del exterior y algunos otros tipos celulares que pueden actuar como células presentadoras de antígeno (APCs).

El sistema inmunológico innato incluye diversos tipos de leucocitos que pueden secretar moléculas promotoras de la inflamación, fagocitar bacterias y restos celulares, así como mediar la respuesta inmunológica adaptativa. En general, los leucocitos son células terminalmente diferenciadas por lo que no entran en división celular y por lo tanto son producidos mediante la diferenciación de células troncales hematopoyéticas que residen principalmente en la médula ósea (MO) [5]. Los leucocitos del sistema inmunológico innato son: las células *natural killer* (NK), las células linfoides innatas las células cebadas (mastocitos), los eosinófilos, los basófilos, algunas poblaciones de linfocitos; y las células fagocíticas que incluyen a los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas [98]. Los sistemas que se encuentran constantemente expuestos al medio externo poseen mucosa, una capa de células epiteliales que recubren las cavidades del organismo y un tejido conjuntivo subyacente llamado lámina propia enriquecido por diferentes poblaciones de leucocitos. Este tipo de tejidos se

encuentran en el aparato digestivo, la piel, el aparato genito-urinario y el pulmón.

## 1.2. Sistema inmunológico adaptativo

Mientras que el sistema inmunitario innato evoluciona para reconocer solo un número limitado de moléculas que son típicas de diferentes clases de microbios, el sistema inmunológico adaptativo puede reconocer estructuras ajenas al organismo (antígenos) y de forma específica. Además, esta respuesta específica es recordada por el organismo para enfrentar con mayor rapidez y eficiencia una reinfección [5].

El sistema inmunológico adaptativo está conformado exclusivamente por linfocitos T y B. Estas células tienen receptores específicos para cada antígeno cuya información genética se va replicando y mezclando en cada nueva generación de estas células [2]. Los linfocitos T se generan en el timo y se subdividen en varios tipos que cumplen diferentes funciones: los citotóxicos, los colaboradores (*helper*): Th1, Th2 actúan fundamentalmente contra parásitos y el Th17 que actúa contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos; los reguladores: Treg y Th3 funcionan como supresores de la respuesta inmune. Los precursores de los linfocitos T (timocitos), se generan en la MO, luego viajan al timo donde maduran hasta convertirse, si sobreviven, en los distintos tipos celulares [136]. Los linfocitos T que participan de este proceso corresponden a aquellos que tienen en su superficie receptores CD4 y que se denominan linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Las células B se originan en la MO [119]. Para completar el desarrollo, las células B inmaduras migran desde la MO al bazo como células B de transición, pasando por dos etapas de transición. Durante la migración y después de la entrada al bazo, se consideran células B T1. Dentro del bazo, las células B T1 pasan a las células B T2. Las células B T2 se diferencian en células B foliculares o células B de la zona marginal dependiendo de las señales recibidas a través del BCR y otros receptores. Una vez diferenciados, ahora se consideran células B maduras o células B *naïve* [38, 47].

Existen dos tipos de respuesta adaptativa: la respuesta celular y la

respuesta humoral. La primera es mediada por células T citotóxicas que eliminan células infectadas por virus y otros patógenos intracelulares, y células T cooperadoras productoras de citocinas. La segunda está controlada por células B, que generan anticuerpos específicos contra determinado antígeno [2]. Adicionalmente, se requiere la presencia de células del sistema inmunitario innato, las células presentadoras de antígenos (antigen presenting cell, APC), que atrapan partes del agente infeccioso, las procesan y las muestran a las células T [98].

### **1.3. Hematopoyesis: El origen de las células del sistema inmunológico**

Las células del sistema inmunológico se originan a partir de una de las células troncales [146]. Las células troncales hematopoyéticas (*Hematopoietic stem cells*, HSC) dan origen a todos los linajes de células inmunes, tanto del sistema innato como adaptativo. En los mamíferos adultos, las HSCs se encuentran en la MO y se identifican por una gran cantidad de moléculas de superficie, genes y capacidad regenerativa en trasplantes [124].

Las HSCs carecen de marcadores de “linaje”, que son aquellos comúnmente expresados por células maduras como el CD19 en los linfocitos B. Las HSCs, son células linaje negativo, expresan en su superficie niveles elevados del antígeno de células troncales (*stem-cell antigen 1*, Sca-1) y del receptor para el factor de células troncales (ckit). Esta subpoblación se conoce comúnmente como LSK [195, 280]. A pesar de que las LSK pueden dar origen a diversos tipos celulares, solo un 10% de estas son capaces de regenerar una MO dañada. Esta subpoblación se caracteriza por expresar la sialomucina antiadhesiva CD34, receptores de la familia SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) el receptor CD150 y el CD48, así como poseer la habilidad de eluir colorantes intravitales como Rodamina-123 y *Hoeschst* 33342. Estas propiedades identifican al compartimento de las HSC de la MO [280]. Algunas LSK son progenitores multipotentes (MPP, por sus siglas en inglés), capaces de regenerar algunos linajes celulares, puesto debido a cambios coordinados en su transcriptoma, su capacidad totipotencial se ha perdido [33]. Inmediatamente antes de los MPPS, se encuentran las HSCs. Las HSCs totales de un

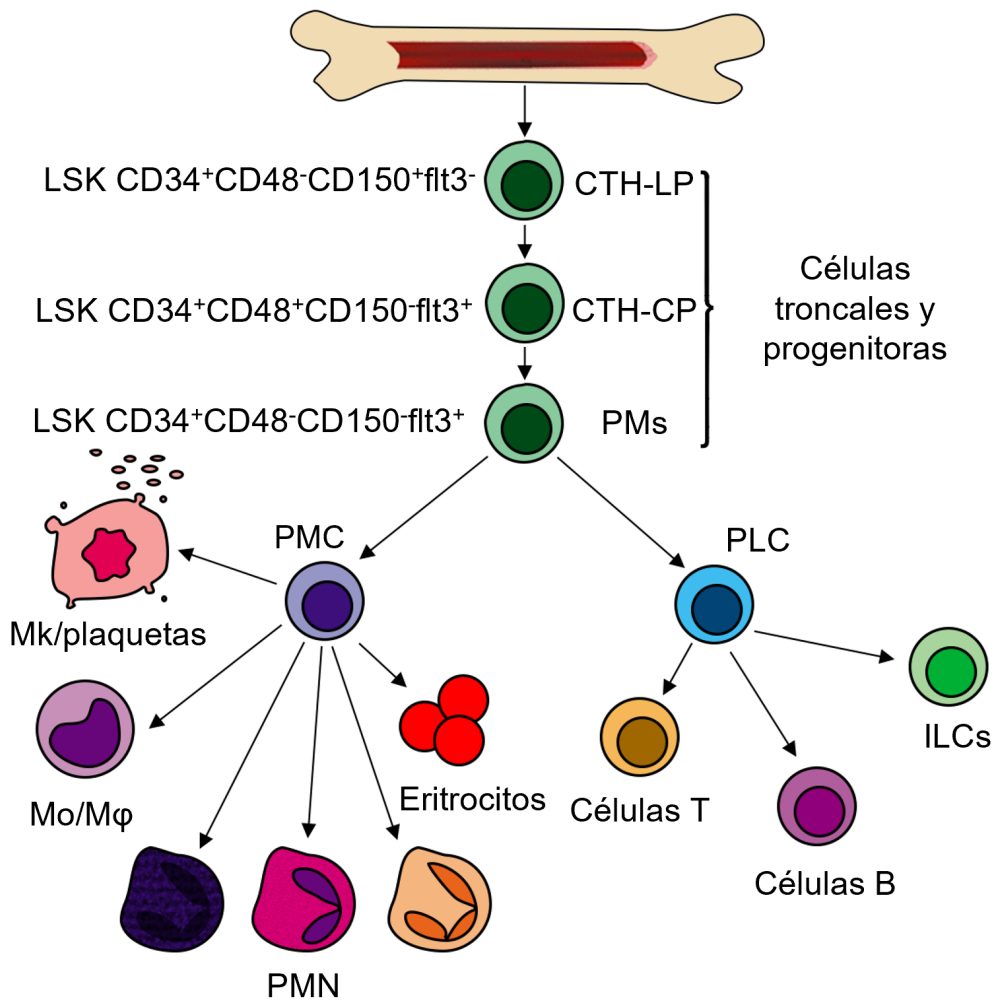
ratón adulto son aproximadamente 12-42 células por cada millón en la MO. Esta pequeña subpoblación se puede clasificar a su vez en dos tipos: las células troncales de corta vida o “activadas” (*Short-term HSCs*) y las células troncales de larga vida o “quiescentes” (*Long-term HSCs*) [184, 280]. Al conjunto de MPPs y HSCs (Figura 2) se le conoce como células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPCs, por sus siglas en inglés) [166].

#### **1.4. Hematopoyesis: Ontogenia de las células troncales hematopoyéticas**

Los progenitores hematopoyéticos más primitivos se producen en el saco vitelino a partir del día 17 de la gestación en humanos y en el día 7.5 en embrión de ratón (E7.5) [14]. En esta región, el tejido mesodérmico da origen a progenitores estrechamente relacionados con las células endoteliales y hematopoyéticas. Estos cúmulos de células primitivas se conocen como “islas de sangre” en el saco vitelino. Las células primitivas del saco vitelino, dan origen principalmente a eritrocitos y fagocitos. Sin embargo, estas no son las células troncales hematopoyéticas definitivas y las cuales encontramos en la médula osea en el adulto. De forma simultánea el hígado comienza a desarrollarse [129].

Posteriormente, una región de la aorta primitiva, la esplanopleura para-aortica comienza a producir los progenitores hematopoyéticos definitivos alrededor del E9 en ratón y el día 27 de la gestación en humanos. Esta región continúa su desarrollo y obtiene el nombre de aorta-gonadalmesonefros (AGM), esto ocurre aproximadamente al día E11 en ratón y al día 27 en humanos [71, 150, 255]. Las células en el AGM tienen una relación estrecha con células de tipo endotelial, expresan marcadores como Sca-1 (o Ly6-a), c-kit y CD34 [24].

Las células hematopoyéticas definitivas que emergen del endotelio hemangiogénico o hemangioblasto, comienzan a expresar marcadores que la diferencian del linaje endotelial como son CD44 [181] y CD45 [225]. Se ha detectado en el ratón que casi al mismo tiempo en el que las HSCs se encuentran en la AGM, la placenta también posee progenitores hematopoyéticos en el ratón [68]. La placenta humana también posee progenito-



**Figura 2: Hematopoyesis.** Las células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPCs) incluyen a las células troncales quiescentes (LT-HSC), a las células troncales activas (ST-HSC) y a los progenitores multipotentes. Se muestran las moléculas de superficie comunes para identificar a estas células en la médula de ratón.

res hematopoyéticos alrededor de la 5-6ta semana de gestación [42].

Posteriormente los progenitores hematopoyéticos migran del AGM al hígado fetal, sin embargo, se desconocen las rutas de migración exacta en este proceso [254]. El hígado se origina como un divertículo del piso del tracto digestivo embrionario en el día E9 en el ratón. En este estadio, la yema hepática contiene eritrocitos y fagocitos CD45<sup>+</sup> provenientes del saco vitelino. A partir del día E10-E15 la yema hepática se desarrolla rápidamente al ser vascularizada y poblada con las células provenientes del AGM, que son CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> [253].

El hígado fetal en humanos se reconoce como un órgano hematopoyético alrededor de las 7-17 semanas post-concepción, siendo el sitio dominante de la hematopoyesis fetal después de la semana 20. El hígado fetal humano contiene HSCs y células progenitoras multipotentes (MPP) capaces de dar origen a las células linfoides innatas (*Innate Lymphoid Cells*, ILCs), los linfocitos T y B, las células NK y a los progenitores mieloides CD34<sup>+</sup> [202].

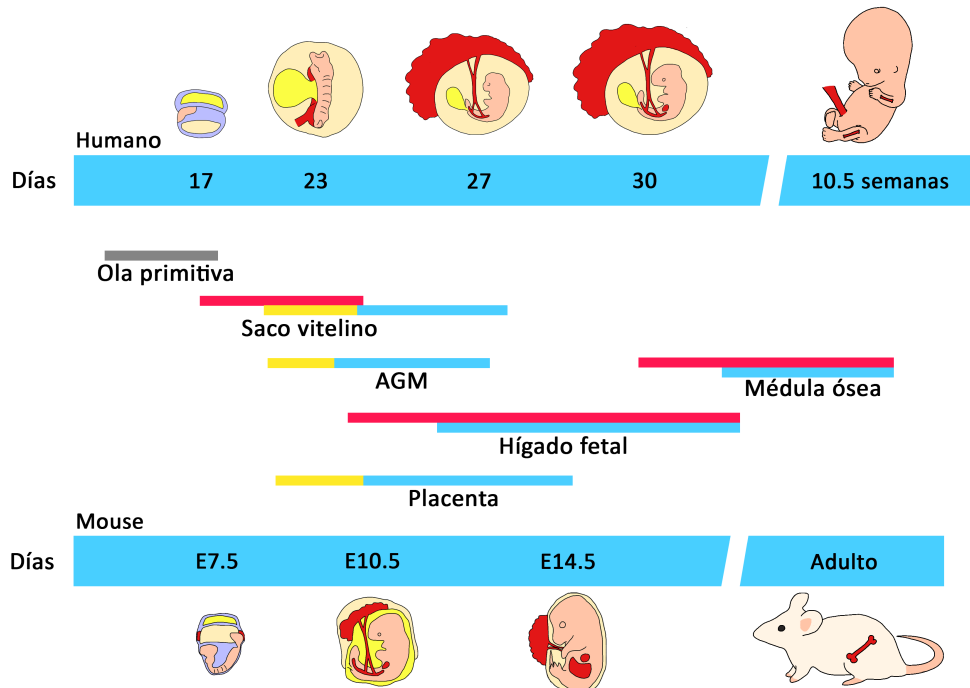
De manera interesante, algunas células de origen mieloide encontradas en tejidos adultos tales como los pulmones o la cavidad peritoneal provienen del saco vitelino en lugar de los progenitores definitivos del AGM e hígado fetal. Un ejemplo de ello son los macrófagos residentes de tejido en el peritoneo [72, 202, 230].

Así mismo, algunas poblaciones linfoides como las células B-1 se originan en el saco vitelino y son parte de la respuesta inmune humoral, pero no del sistema inmunológico adaptativo. De forma similar a los macrófagos residentes de tejido, estas células no se encuentran en circulación y su regeneración no depende de la MO, ya que son capaces de auto-regenerarse [94].

Notablemente, la naturaleza de los progenitores originados en saco vitelino es de respuesta inmunológica innata. Organismos como el pez cebra e invertebrados solo poseen este tipo de respuesta, mientras que los vertebrados ya poseen un sistema inmunológico adaptativo [50].

Finalmente, el órgano hematopoyético definitivo, la médula osea, se





**Figura 3: Ontogenia de las células hematopoyéticas.**

convierte en el nicho de los progenitores hematopoyéticos posterior al nacimiento en ratón. En el humano se vuelve un órgano funcional a partir del 4-5to mes de gestación [108]. Se ha descrito que son las HSCs derivadas de hígado fetal las que migran a la médula osea para establecerse en su nicho final [292].

Las HSC en la MO requieren un microambiente especial (nicho) para mantener su capacidad troncal. Se han descrito dos tipos de nichos en la MO.

El primero, el “nicho endosteal”, se localiza en el endostio o *endosteum*, es una membrana vascular delgada del tejido conjuntivo que bordea la superficie interior del tejido óseo que forma la cavidad medular de los huesos largos. En esta región se encuentran osteoblastos especializados, células reticulares  $CXCL12^+$  (*CXCL12-abundant reticular cells*, CAR), los osteoclastos y células estromales tipo fibroblasto.

El segundo nicho, el nicho vascular, se encuentra adyacente a las células CAR en una estructura conocida como sinusoides, ahí se alojan las HSCs [167]. Las moléculas que mantienen a las HSCs en estos nichos, son el factor de células troncales (*stem cell factor*, SCF), la quimiocina CXCL12, la angiopoyetina 1 (Ang-1) y la trombopoyetina 1 (TPO-1) [53].

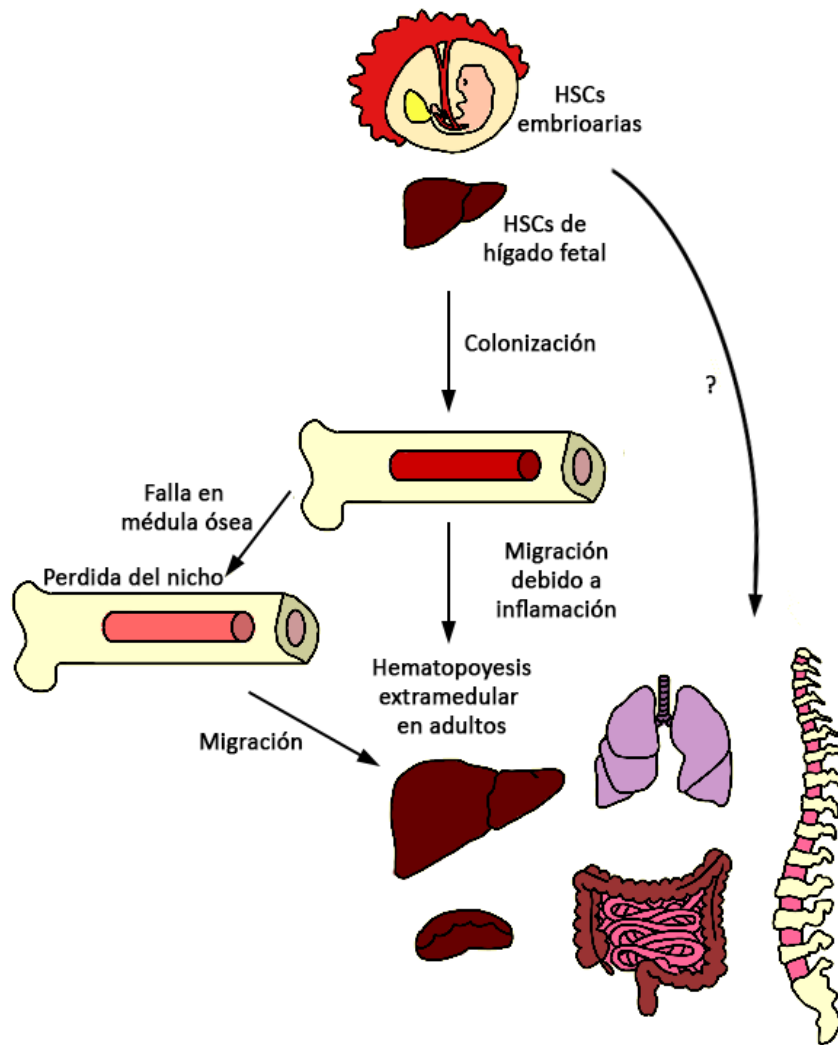
Por otro lado, la regulación de la proliferación y diferenciación de las HSCs esta modulado por citocinas como la eritropoyetina (EPO), el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y los interferones alfa y gamma ((INF- $\alpha$  and INF- $\gamma$ ) [12, 61, 157]. Estas citocinas comúnmente se asocian a eventos inflamatorios que pueden ser orquestados por una infección o un trauma, por lo que la MO está preparada para regenerar a las células de sistema inmunológico tanto en homeostasis como bajo condiciones patológicas. Sin embargo, existen casos en los que la MO falla y la generación de progenitores hematopoyéticos recae en otros sitios en el organismo adulto, como el hígado, los pulmones o el bazo. Este proceso se conoce como hematopoyesis extramedular (*Extramedullary hematopoiesis*, EMH).

## 1.5. Hematopoyesis extramedular en adultos

La EMH puede darse bajo condiciones homeostáticas y principalmente por mecanismos patológicos (Figura 4). Por ejemplo, bajo una infección aguda, órganos como el hígado y el bazo comienzan a producir progenitores hematopoyéticos debido al incremento de GM-CSF e interleucina 3 (IL-3) [60, 113].

En patologías crónicas que afectan a la MO, esta se vuelve incapaz de regenerar las células que requiere el organismo. Se ha reportado que en esos casos órganos como el hígado o el bazo suplen la función de generar nuevas células hematopoyéticas. Las patologías más comunes que llevan a la EMH son la mielofibrosis, la enfermedad metastásica ósea, la leucemia, la enfermedad de células falciformes y las talasemias [113].

La EMH patológica es un problema secundario, diagnosticado principalmente con imagenología médica, como rayos X, tomografía computari-



**Figura 4: Hematopoyesis extramedular.**

zada (*computed tomography*, CT) o resonancia magnética (*magnetic resonance imaging*, MRI). Estas técnicas de inicio muestran masas anómalas, que pueden ser analizadas por el patólogo. Las técnicas más comunes para determinar que son células y progenitores hematopoyéticos son tinciones con Giemsa y hematoxilina y eosina (H&E) [214]. Algunos reportes, adicionalmente incluyen inmunohistoquímica y citometría de flujo marcando antígenos comunes de progenitores hematopoyéticos o el uso

de marcajes coloidales [214, 242].

Se sabe que existe la hematopoyesis de emergencia en órganos como el bazo, sin embargo se desconoce que moléculas lo regulan. Recientemente se encontró que existe un nicho estromal caracterizado por el gen *Tx11*, la sobreexpresión de este gen por manipulación genética o tratamiento con LPS promueve el incremento de células LSK CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup> en este órgano [182]. Se requieren mas estudios para saber que mecanismos regulan la hematopoyesis extramedular de emergencia y en condiciones fisiológicas.

Por otro lado, se han encontrado progenitores hematopoyéticos en tejidos sin patologías asociadas a un mal funcionamiento en la MO. En el intestino delgado humano se reportó que existen células CD34<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup> [139] y estos progenitores parecen tener la capacidad de generar células hematopoyéticas maduras post trasplante, de forma similar a los progenitores de la médula ósea [66]. Así mismo, se ha reportado que la fracción vascular-estromal de tejidos adiposos humanos contienen progenitores que dan origen tanto a células endoteliales como a células hematopoyéticas *in vitro*. Esta subpoblación se denominó hemangioblasto adulto y están enriquecidos en marcadores como CD34 y VEGFR2 (KDR) [159]. Recientemente se encontró que en riñón fetal human existe un *cluster* de células que expresan genes asociados a hematopoyesis como *runx1* y CD44 [89]. Además, en bazo y sangre periférica humana es posible encontrar progenitores CD19<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> en condiciones fisiológicas, posiblemente progenitores comprometidos con linaje eritromieloide [155].

En el pulmón y el tejido adiposo de ratón, se han encontrado células VEGFR2<sup>+</sup> y CD31<sup>+</sup> que tienen el potencial de generar células endoteliales, células de musculo liso y colonias hematopoyéticas *in vitro*, por lo que se presume corresponden al hemangioblasto adulto descrito en humanos [286]. Descripciones anatómicas del pulmón murino mostraron que existen células CD34<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> ckit<sup>+</sup> cerca de los vasos sanguíneos, lo cual indica la presencia de progenitores hematopoyéticos y endoteliales [203]. Esto se corrobora en 2017 cuando se reportó por primera vez que los pulmones de ratón son sitios hematopoyéticos activos y proveen casi el 50 % de la producción total de plaquetas del organismo, conteniendo todos los tipos de progenitores hematopoyéticos, incluso células troncales hemato-

poyéticas como las de MO [84, 131].

Dado que los pulmones no se reconocen como un nicho hematopoyético, se piensa que la vasculatura pulmonar funciona como un nicho para las HSCs, por su proximidad con los progenitores y su interacción con células estromales como pericitos y fibroblastos [26]. En médula ósea existe un nicho descrito en el cual las HSCs reciben señales paracrinas de células en la vecindad que liberan moléculas como factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), TPO-1, SCF, entre otras [8]. Así mismo las células troncales hematopoyéticas pueden liberar algunas de estas citocinas y tener una función autocrina [142].

Los mecanismos que regulan la EMH, así como el origen de los progenitores en tejidos extramedulares es desconocido, se especula que provengan de tejidos embrionarios o directamente de la MO. Muchas de estas preguntas siguen sin respuesta, por lo que queda mucho campo por cubrir para describir la hematopoyesis extramedular en los adultos.

## **1.6. Mecanismos de inmunidad en el pulmón**

El pulmón posee un epitelio cilíndrico pseudoestratificado (en bronquios y bronquiolos) y epitelio escamoso simple en la región alveolar, lo que permite la difusión y filtración de sustancias de forma rápida [261]. La mucosa del sistema respiratorio recubre las vías nasales, la nasofaringe, la tráquea, el árbol bronquial y los alvéolos.

El pulmón está compuesto por tres tipos de compartimentos: el espacio aéreo (o alveolar), el vascular (bronquial y pulmonar) y el espacio intersticial. Las partículas de un tamaño menor o igual a 1  $\mu\text{m}$  son capaces de pasar de la nasofaringe hasta las membranas alveolares donde interactúan con los componentes solubles en los fluidos alveolares (p. e. IgG, complemento, surfactantes, proteínas asociadas, etc.) y macrófagos residentes. Entre estas partículas se encuentran agentes patógenos como virus y bacterias, es por esto que el pulmón cuenta con leucocitos en el espacio aéreo, 95 % son macrófagos alveolares, 1-4 % son linfocitos mientras que los neutrófilos solo representan el 1 % de las células CD45<sup>+</sup> [143].

En el compartimiento no-vascular e intersticial, el 49 % de la población celular corresponde a células linfoides, como células NK, el 25 % a células dendríticas y el 16 % a otras células mononucleares mieloides CD45<sup>+</sup> [13]. El origen de estas células se atribuye típicamente a la MO, sin embargo, se ha descrito que, en condiciones patológicas, como anemias o desordenes mieloproliferativos, el pulmón puede funcionar como un nicho hematopoyético, extramedular [27, 113].

## 1.7. Hematopoyesis extramedular asociada al pulmón

La hematopoyesis es la formación de los componentes celulares de la sangre. Estas células se originan a partir de la población celular en la MO, que posee la capacidad de autor-renovarse, proliferar y dar origen a diferentes estirpes celulares [20]. Las células troncales hematopoyéticas (*Hematopoietic stem cells*, HSCs) de mamíferos que residen en la MO proceden de una subpoblación de las células troncales embrionarias originadas en el AGM (aorta-gónada-mesonefro) que deben migrar al hígado fetal antes de poblar la MO [14].

La MO provee un microambiente o nicho especializado que permite que estas células conserven su estado indiferenciado. De manera característica las HSCs no expresan marcadores de superficie presentes en células con un linaje específico (Lin<sup>-</sup>) pero expresan altos niveles del antígeno de células troncales Sca-1 y el receptor del Stem Cell Factor (SCF), c-kit, por lo que se conocen como población LSK [195]. Menos del 10 % de las LSK tiene capacidad regenerativa, por lo que además de los marcadores mencionados se busca la expresión de la sialomucina antiadhesiva CD34, los receptores de la familia SLAM (CD150 y CD48) o la capacidad diferencial de expulsar colorantes como Rhodamina-123 y *Hoeschst* 33342 [112, 280].

Las HSCs representan aproximadamente del 0.00125-0.00425 % (12-42 células/millón) de la población global de la médula ósea en ratón, esta población se divide en dos tipos principales: Las células troncales quiescentes o de larga vida (*Long term hematopoietic stem cells*, LT-HSC) y las células troncales activas o de corta vida (*Short term hematopoietic stem*

cells, ST-HSC) [280]. Las HSCs quiescentes comúnmente poseen el fenotipo LSK CD34<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup> Rho123<sup>lo</sup> y se propone dan origen a una población HSCs activa LSKCD34<sup>+</sup>CD150<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup> Rho123<sup>hi</sup>, aunque aún se discute la participación de diversas HSCs intermediarias [111, 234, 280].

De manera anatómica, las HSCs activas y quiescentes difieren en su ubicación en la médula ósea, las primeras contactan la microvasculatura de la MO y las segundas se encuentran en los nichos del *endosteum*. Los procesos de sobrevivencia, proliferación y diferenciación en HSCs están modulados por citocinas como la eritropoyetina (EPO), los factores estimulantes de colonias (G-CSF y GM-CSF) y los interferones alfa y gamma (INF $\alpha$  e INF $\gamma$ ) [11, 61, 157]. En los mamíferos adultos, la MO es el nicho clásico donde encontramos a las HSCs, por lo tanto, el hallazgo de progenitores proliferativos fuera de este órgano se consideraba patológico. Como ha sido mencionado, la EMH ha sido observada principalmente en condiciones patológicas, diversos reportes han encontrado la presencia de progenitores hematopoyéticos en humanos, en su mayoría derivados de una enfermedad concomitante. En la Tabla 1 se enlistan algunos reportes que mostraron casos clínicos de EMH en pulmón.

La EMH en situaciones patológicas ha sido diagnosticada, principalmente, mediante estudios radiológicos, principalmente mediante estudios radiológicos [48, 201], la tomografía computacional (CT) [223], las imágenes de resonancia magnética (MRI) y colorantes coloidales [145, 242] y se considera un componente secundario. En algunos casos, posterior a la toma de biopsia y análisis histológico con tinciones como la de glicoforina para progenitores eritroides [132, 238], Giemsa o H&E (Hematoxilina y eosina) para diversas células hematopoyéticas (maduras e inmaduras) [145, 214]. En ocasiones el análisis patológico abarca inmunohistoquímica (IHC) [7, 187, 194] o citometría de flujo de células purificadas marcadas con anticuerpos típicos para células del sistema hematopoyético [3].

De forma interesante, algunos estudios han mostrado la presencia de progenitores hematopoyéticos CD45<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> en biopsias de intestino delgado de humanos adultos [66, 139]. Así mismo se ha visto que la fracción vascular del tejido adiposo humano contiene progenitores CD45<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> VEGFR2<sup>+</sup> que dan origen a células vasculares y hematopoyéticas *in vitro* del tipo hemangioblasto que solo se había descrito en desarrollo embrionario [159].

<b>Enfermedad principal</b>	<b>Técnica de diagnóstico de EMH</b>	<b>Referencia</b>
Mielodisplasia y cirrosis	Radiografía y tomografía computarizada de tórax	[201]
Síndrome mielodisplásico y mielofibrosis	Radiografía y tomografía computarizada de tórax, aspirado de la arteria pulmonar y análisis histopatológico	[164]
Anemia falciforme y $\beta$ -talasemia	Radiografías y hallazgos <i>post-mortem</i>	[48]
Mielofibrosis con metaplasia mielóide	Radiografía y tomografía computarizada de tórax, análisis de sangre, citometría de flujo y gammagrafía pulmonar con Tc99m-anti-CD66	[223]
Mielofibrosis	Tomografía computarizada, biopsia de la masa pulmonar con análisis por inmunohistopatología	[187]

**Tabla 1: EMH en pulmón.** La EMH derivada de problemas que afectan la MO puede provocar la presencia de progenitores hematopoyéticos funcionales en los pulmones, se desconoce si dichos progenitores migraron directo de la MO previo a la enfermedad o si se encontraban desde mucho antes.

De forma similar, en ratones se han descrito que las células derivadas de pulmón y tejido adiposo que expresan VEGFR2<sup>+</sup> y/o CD31<sup>+</sup> pero no CD45, pueden producir células endoteliales, células de musculo liso y colonias hematopoyéticas *in vitro* [286]. Descripciones anatómicas de los pulmones de ratón han mostrado que las células CD34<sup>+</sup> se ubican cercanas a los vasos sanguíneos y a las células epiteliales bronquiales, parte de estas podrían ser progenitores que den origen a los tejidos antes mencionados [203].

Como se mencionó anteriormente, los pulmones de ratón poseen progenitores hematopoyéticos funcionales [131]. Estos progenitores hematopoyéticos también se han descrito recientemente en pulmón embrionario de ratón [84], estas células tienen gran capacidad para ser trasplantadas.



Los pulmones poseen al menos 40 tipos diferentes de células que podrían ser candidatas para ser una especie de tejido estromal que soporte a diversos tipos de progenitores, algunos candidatos son los pericitos, fibroblastos varios y las mismas células endoteliales [26].

Se requieren estudios más profundos sobre la EHM en homeostasis y patologías, para poder entender el origen y las características particulares de los progenitores hematopoyéticos fuera de la MO. A medida que los estudios en las HSCs y sus nichos progresan se caracterizan nuevas moléculas que modulan diversos procesos en las HSCs, tal es el caso de ISM1, una proteína soluble que recientemente se vinculó con la regulación de la hematopoyesis en el pez cebra [18].

## 1.8. Isthmin-1

Isthmin-1 (ISM1) es una proteína secretada que se identificó por primera vez en el cerebro de *Xenopus laevis*, en la región organizadora el *isthmus*, de donde toma su nombre [196]. En el desarrollo ISM1 es parte del grupo de moléculas que se expresan junto con el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8), las cuales son necesarios para el correcto modelamiento craneofacial [127]. ISM1 posee dos dominios proteicos altamente conservados, un dominio de repetidos de trombospondina (TSR) y un dominio asociado a adhesión en MUC4 (Mucina 4 asociada a superficie celular) y otras proteínas (AMOP, *Adhesion-associated domain in MUC4 and other proteins*) [222]. El dominio TSR está relacionado con su capacidad antiangiogénica y el dominio AMOP con la capacidad de promover sobrevivencia o inducir la apoptosis *in vitro* dependiendo de su concentración y estado físico [266, 284, 294].

Se han descrito dos receptores para ISM1, uno de baja afinidad el dímero de integrinas  $\alpha v\beta 5$  que promueve la apoptosis inducida por integrinas y otro de alta afinidad GRP78 (Proteína regulada por glucosa 78) el cual promueve la apoptosis al inducir la depleción de ATP y la disfunción mitocondrial [45, 294]. Por otra parte, el receptor GRP78 que normalmente se encuentra en el retículo endoplásmico se transporta hacia la membrana celular en diversos tipos de cáncer, por lo que ISM1 también posee un efecto antitumorigénico [45, 284, 291]. ISM1 induce permeabili-

dad vascular en el pulmón murino, mediante su interacción con GRP78 y la activación de la cinasa proto-oncogén Src que conlleva a la disrupción de las uniones adherentes mediadas por VE-cadherina y  $\beta$ -catenina [266].

En mamíferos adultos se ha descrito que ISM1 se expresa abundantemente en la piel, el pulmón, el pericardio y en algunas células del sistema inmunológico como las NK DX5<sup>+</sup> NKp46<sup>+</sup>, las NKT y los linfocitos Th17 [265]. El hecho de que ISM1 se exprese en barreras anatómicas como la piel, las mucosas y los linfocitos sugiere un papel en la inmunovigilancia y en la inmunidad innata. En el modelo que ocupó Valle-Rios y colaboradores en 2014, utilizaron un ratón carente de células linfoides maduras, en el cual se observaron células pequeñas mononucleares positivas para ISM1. Es posible que estas células pertenezcan a una población progenitora no determinada en pulmón o estén emparentadas con la *side population* mencionada anteriormente.

## **2. Definición del problema**

### **2.1. Planteamiento**

El gen de *ism1* se expresa abundantemente en el desarrollo, donde es necesario para la formación craneofacial [127, 186], así como la generación del sistema hematopoyético en el pez cebra [18]. La proteína ISM1 posee dominios TSR y AMOP, el primero relacionado con su capacidad antiangiogénica y el segundo con la capacidad de promover sobrevivencia o inducir la apoptosis *in vitro* dependiendo de su concentración y estado físico [266, 284, 294]. En organismos adultos ISM1 se expresa en tejidos como el pulmón o la piel, así como en células del sistema inmunológico tales como linfocitos Th17 y algunas células NK [265]. En ensayos preliminares se ha observado que ISM1 se expresa en una subpoblación extraída del pulmón que exhibe marcadores típicos de células troncales hematopoyéticas. Este último dato, requiere ser estudiado a profundidad y será el motivo de estudio de este proyecto doctoral.

### **2.2. Preguntas científicas**

1. Las células troncales y progenitoras hematopoyéticas del pulmón ¿Expresan ISM1?
2. ¿ISM1 está relacionada con en la hematopoyesis extramedular en pulmón?

### **2.3. Hipótesis**

Isthmin-1 es una proteína que participa en los procesos de proliferación y diferenciación de las células con fenotipo troncal hematopoyético derivadas de pulmón murino.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Obejtivo general**

Describir el papel que tiene Isthmin 1 en la hematopoyesis extramedular en pulmón murino.

#### **3.2. Objetivos particulares**

1. Caracterizar a las células troncales hematopoyéticas ISM1<sup>+</sup> en el pulmón murino.
2. Evaluar la capacidad de proliferación y diferenciación *in vitro* de las células derivadas de pulmón en presencia y ausencia de ISM1.
3. Utilizar un modelo de inflamación para perturbar el nicho de las troncales hematopoyéticas derivadas de pulmón y evaluar cambios en las poblaciones que expresan ISM1.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J de 6 a 8 semanas de edad mantenidos en condiciones libre de patógenos específicos. Todos los ratones fueron manipulados conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y se sacrificaron mediante dislocación cervical para obtener los pulmones y demás órganos indicados posteriormente.

### 4.2. Obtención de las células linfoides

*Sangre periférica*—La sangre se recuperó por perfusión simultánea de PBS 1x 0.5 mM EDTA a través del ventrículo izquierdo y se colecta colecto con una jeringa de insulina a través de la aorta abdominal. La suspensión se centrifuga, se trató con *buffer* de lisis de eritrocitos y se lavó con PBS 1x para poder hacer la cuantificación celular.

*Pulmón*—Los ratones se sacrificaron y diseccionaron para obtener los pulmones, previo a la recuperación de los pulmones se perfundieron inyectando 5 mL de PBS 1x frío por el ventrículo izquierdo del corazón. Posterior a la perfusión, el tejido se cortó en trozos de 5 mm aproximadamente en 20 mL de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%, con 20 mg de Colagenasa I (Sigma) y 10 mg de DNAsa I (Sigma), esta mezcla se incubó en agitación por 15 minutos a 150 rpm y 37 °C. La suspensión celular obtenida se filtró en una malla con poro de 70  $\mu\text{m}$  para posteriormente centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm. Después se hizo un lavado con medio RPMI y se cuantificaron las células obtenidas para su futuro uso.

*Bazo*—Se disecó el bazo posterior a la extracción de los pulmones. El órgano se colocó en una caja Petri de 60 mm con PBS 1x frío, se homogeneizó mecánicamente y se pasó por un filtro de 100  $\mu\text{m}$ .

*Lamina propia*—Después de extraer los pulmones y el bazo, se separó el intestino delgado cortando desde el final del píloro y hasta la válvula ileocecal. Se colocó en PBS 1x frío y se lavó el contenido intesti-

nal, posteriormente se abrió longitudinalmente y se cortó en fragmentos de aproximadamente 2 cm. El tejido se colocó en una solución con Buffer Hanks (HBSS) 0.5 mM de EDTA y 2% de SFB, enseguida se incubó a 37 °C y 250 rpm por 20 minutos. Posteriormente, el contenido se pasó por un filtro, descartando lo filtrado y conservando lo que quedó en el filtro, este tejido se volvió a cortar para obtener trozos de 5 mm y se colocó en una solución de 20 mL de medio RPMI suplementado con SFB 5%, 20 mg de Colagenasa I (Sigma) y 10 mg de DNAsa I (Sigma). La suspensión se colocó en agitación a (150 rpm) a 37 °C por 15 minutos. Terminando la incubación la suspensión se filtró con un filtro de 70  $\mu\text{m}$  y se recuperó la suspensión celular filtrada. La suspensión de células se lavó con medio RPMI y se cuantificó para posteriormente hacer la tinción.

*Médula ósea* —Se disecaron las tibias y fémures de ambas extremidades posteriores del ratón, se expusieron las epífisis de ambos huesos y se hizo un corte en ambas con tijeras de disección. Posteriormente se extrajo el contenido con una jeringa de insulina cargada con PBS 1x frío. Esta suspensión celular se pasó por un filtro con poro de 70  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, la suspensión se trató con buffer de lisis de eritrocitos y se lavó con PBS 1x para poder contar las células.

Nota: De no estar indicado, solo si el *pellet* celular contenía exceso de eritrocitos, se empleó una solución de lisis de eritrocitos por 5 minutos en hielo.

### **4.3. Fenotipificación por citometría de flujo**

Se colocó 1 millón de células en cada tubo para citometría con con amortiguador para realizar la citometría (FACS, PBS 1x con SFB al 2%) en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Posteriormente se agregaron los anticuerpos en la dilución indicada en la Tabla 2 en Apéndices. Se incubaron a 4 °C y oscuridad por 25 minutos. Posteriormente se hizo un lavado con 3 mL de *buffer* FACS y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4 °C y oscuridad. Para la tinción intracelular, se permeabilizaron las células con 1 mL de *buffer* de permeabilización (Biolegend) dos veces. En seguida las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de *buffer* FACS para posteriormente añadir los anticuerpos para marcaje

intracelular, se incubaron a temperatura ambiente por 25 minutos. Finalmente, las células se lavaron con *buffer* FACS y se resuspendieron en este buffer para leer al citómetro. Para el marcador ISM1 se incluyeron controles con anticuerpo de control de isotipo que es un anticuerpo con el mismo isotipo (IgG2b) y conjugado con el mismo fluorocromo (PE) que el anticuerpo ISM1, pero sin especificidad antigénica como control para conocer la unión inespecífica que puede tener el anticuerpo. Las suspensiones celulares se adquirieron en el citómetro de flujo Cytotflex LX y los resultados se analizaron en los softwares Cytexpert v2.0 y FlowJo v10.7.2. Lista de anticuerpos detallada se encuentra en Apéndices.

#### **4.4. Fenotipificación por microscopia de flujo**

Se utilizaron  $2 \times 10^6$  células recién aisladas de pulmón y se marcaron extracelularmente con FITC anti-Sca1 y APC anti-CD45 seguido de una tinción intracelular con h PE anti-ISM1 y DRAQ5 para núcleo (Todos de Biolegend). Posteriormente se capturaron las imágenes en el Amnis ImageStream Mark II Imaging Flow Cytometer a 60x (EMD Millipore). Los datos se adquirieron en el software Amnis INSPIRE y se analizaron con el software Amnis IDEAS.

#### **4.5. Localización extravascular de las células ISM1**

Se utilizaron ratones C57BL6/J de 6-8 semanas. Se inyectaron por vía intravenosa 200  $\mu$ L de una solución de APC anti-Sca1 en PBS 1x. A los 5 minutos se realizó la extracción del pulmón (como se indicó previamente). La suspensión celular se tiñó con FITC anti-Sca1 y Zombie Violet, posteriormente las células se fijaron y permeabilizaron para teñir contra ISM1 intracelular con PE anti-ISM1. Las muestras se pasaron por el citómetro de flujo.

#### **4.6. Co-cultivos de células de pulmón con ISM1 recombinante**

Se extrajeron alrededor de  $8 \times 10^6$  células derivadas de pulmón, se lavan con HBSS con antibiótico/antimicótico 2 veces y finalmente se resus-

pendieron en medio  $\alpha$ MEM completo (10 % SFB, 1x de antibiótico/antimicótico. Se sembraron  $2 \times 10^5$  células por pozo en una caja de 6 pozos, la cual tenía una monocapa de células estromales de ratón OP9 al 80-90 % de confluencia (sin adición de factores de crecimiento). Se utilizaron las concentraciones de rISM1 30 pM y 150 pM. Los cultivos se monitorearon durante 5 días. Al quinto día se retiraron las células con lavados de PBS 1x sin despegar la monocapa de estromales. A estas células se les evaluó por citometría de flujo la expresión de CD45 y marcadores de células diferenciadas: CD3, CD19 y Ly6G.

#### **4.7. Infección con *Pseudomonas aeruginosa***

Se infectaron ratones de la cepa C57BL/6 de forma Intraperitoneal con la cepa de *P. aeruginosa* PA14-USI, EIL y B43. Se inocularon  $2 \times 10^7$  UFC con PBS 1 x como vehículo y se evaluó la sobrevivencia. Posteriormente se realizó el mismo protocolo solo con la PA14-USI, después de 8 horas se sacrificaron a los ratones y se recuperara sangre periférica, pulmones, medula ósea y bazo. En estos tejidos se evaluó la expresión global de ISM1 por citometría de flujo, en plasma por ELISA y particularmente en pulmón se analizó la presencia de ISM1 en células LSK y HSPCs.

*Plasma*—El plasma de las muestras de sangre periférica fue recuperado después de centrifugar 10 min a 1500 rpm y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

*ELISA*—Los niveles plasmáticos de ISM1 fueron medidos con el kit LEGEND MAX ELISA para ISM1 (Cat. 438907, Biolegend) de acuerdo con las instrucciones del manual.

#### **4.8. Muestras de pacientes humanos**

Este estudio se llevó a cabo con el consentimiento y bajo las guías de los comités de ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez con número de registro HIM/2016/057. Todos los pacientes (o sus tutores legales) otorgaron consentimiento informado para utilizar los remanentes de muestras de biometría hemática. Se recuperaron 15 muestras de pacientes pediátricos y 11 individuos sanos. Los datos de los pacientes se



encuentran en el Apéndice.

*Plasma*—El plasma de las muestras de sangre periférica fue recuperado después de centrifugar 10 min a 1500 rpm y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

*ELISA*—Los niveles plasmáticos de ISM1 fueron medidos con el kit LEGEND MAX ELISA para ISM1 (Cat. 438907, Biolegend) de acuerdo con las instrucciones del manual.

#### **4.9. Análisis estadístico**

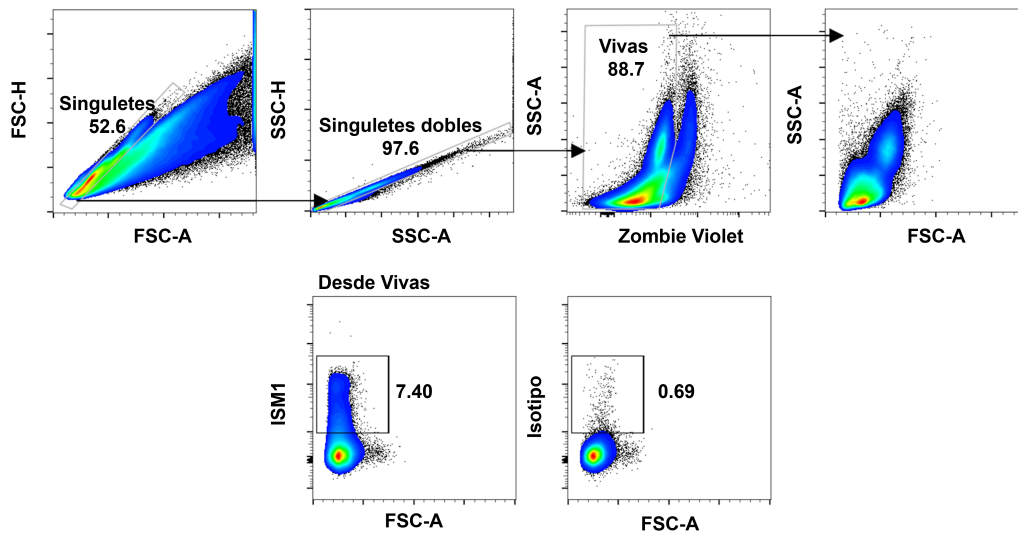
Los datos se analizaron utilizando la prueba estadística de T de *student* para datos pareados mientras que las comparaciones múltiples serán analizadas por medio de ANOVA de una vía y un *post-test* de Bonferroni, se utilizó el programa R *Studio*, con R versión 4.0.5. Un valor de  $p < 0.5$  se tomó como estadísticamente significativo.

## 5. Resultados

### 5.1. Las células ISM1<sup>+</sup> están enriquecidas en pulmón murino

Poco se sabe sobre ISM1, incluyendo el tipo celular que lo expresa y su función en el microambiente celular. Se reportó previamente que las células con fenotipo linfoide de pulmón expresan ISM1 intracelularmente [265]. Otros apuntan a que ISM1 en pulmón se asocia con fenotipos epiteliales [186, 266]. Mientras que en el desarrollo se le asocia con tejidos mesodérmicos e inclusive con células estromales que dan soporte a progenitores hematopoyéticos [18, 186].

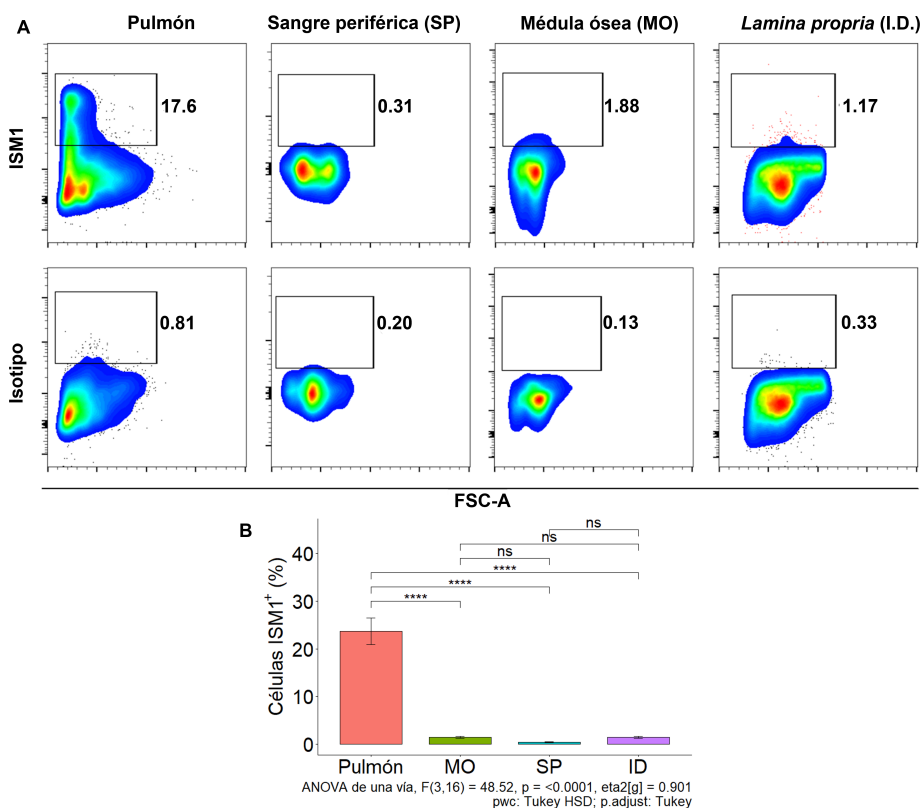
En este trabajo se realizó un estudio fenotípico por citometría de flujo para encontrar la o las poblaciones enriquecidas en ISM1 intracelular en pulmón (Figura 5).



**Figura 5: Gating de células ISM1<sup>+</sup> derivadas de células de pulmón.** Se muestra la estrategia de *gating* para la citometría de flujo para visualizar a las células ISM1<sup>+</sup> de pulmón.

En primer lugar, se comprobó que el pulmón murino es de los tejidos que más expresan ISM1, aproximadamente 4 veces comparado contra

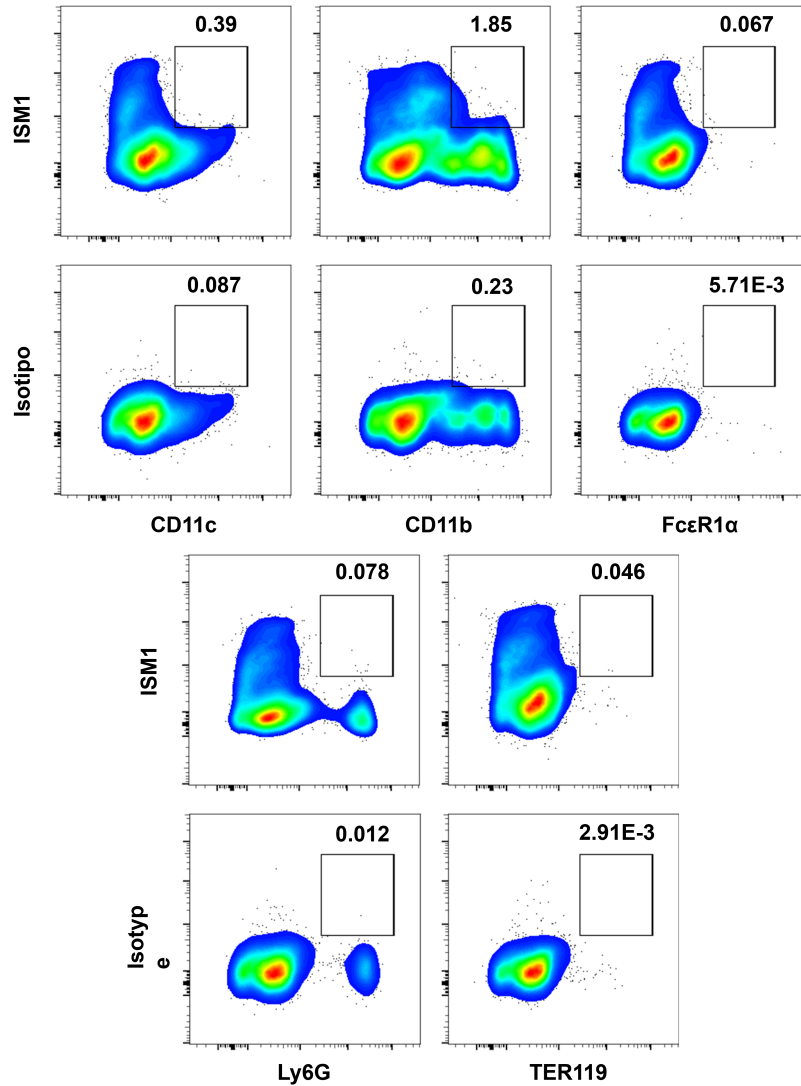
sangre periférica, MO y lamina propia de intestino delgado (Figura 6), de forma similar a lo reportado por expresión de ARN [186, 265].



**Figura 6: ISM1 intracelular es más abundante en pulmón.** Se extrajeron células de pulmón, médula ósea, sangre periférica y lamina propia de intestino delgado de ratón. Por citometría de flujo con marcaje intracelular se determinó la presencia de células ISM1<sup>+</sup>. A. Figuras representativas con controles de isotipo. B. Comparación de las células ISM1<sup>+</sup> por tejido. Datos mostrados son la media  $\pm$ SEM. Los datos representan la media  $\pm$ SEM, ANOVA de una vía,  $n=7$ ,  $p < 0.001$ .

Dado que ya se demostró que existen poblaciones linfoides ISM1<sup>+</sup> [265], en este trabajo se exploró una diversidad más profunda de leucocitos, incluyendo las principales poblaciones mieloides, las linfoides y las linfoides innatas [290]. De los antígenos de superficie explorados, encontramos a CD11c que es un marcador de células dendríticas y algunas subpoblaciones de macrófagos. Así también CD11b que es un marcador primordialmente de macrófagos [220]. Se encontró que ISM1 se encuen-

tra en pocas células CD11c<sup>+</sup>, mientras que para los macrófagos CD11b<sup>+</sup> hubo una correlación más notable (Figura 7).



**Figura 7: Presencia de ISM1 en poblaciones mieloides derivadas de pulmón.** Se extrajeron las células totales de pulmón murino y se analizaron los marcadores principales de leucocitos de linaje mieloides. Se muestran figuras representativas de 3 experimentos independientes.

En los pulmones tanto de ratón y humano existen al menos tres tipos

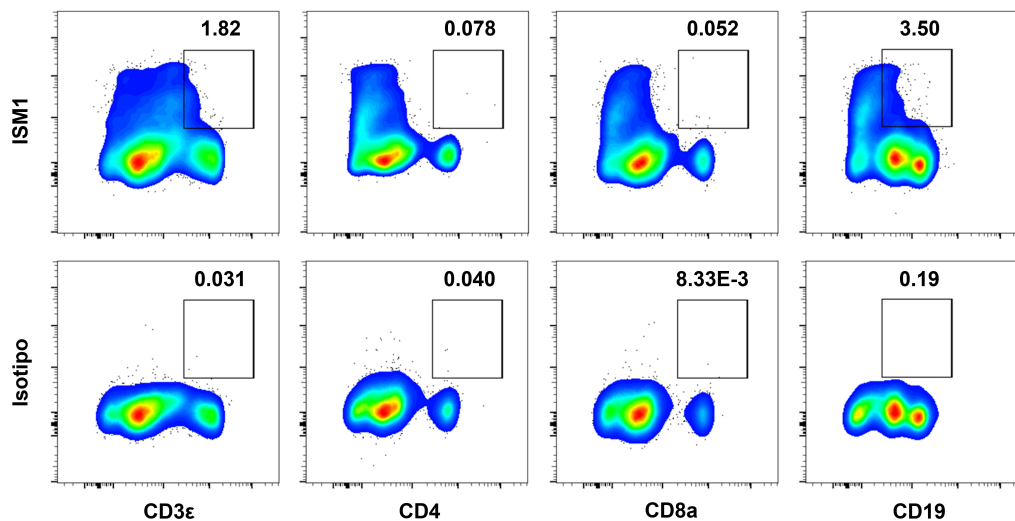
de macrófagos CD11b<sup>+</sup>, los alveolares, los intersticiales y monocitos. Los macrófagos alveolares son residentes de tejido, se pueden autorrenovar y tienen su origen en el desarrollo embrionario, mientras que los macrófagos intersticiales provienen de los monocitos que entran por medio de la circulación [19].

Otra población mieloide importante en pulmón es la de las células cebadas, estas células participan en respuestas alérgicas y expresan principalmente receptores para la inmunoglobulina E (IgE), como es el caso del receptor FcεR1α (Figura 7) donde observamos una escasa correlación con ISM1 [188].

Dentro del linaje mieloide también encontramos granulocitos, principalmente neutrófilos, seguido de los eosinófilos y los más escasos, los basófilos. Ante una infección o evento inflamatorio los granulocitos son reclutados para ejercer su función. Ly6G es un marcador de superficie que comparten todos los granulocitos, principalmente neutrófilos, así como algunos monocitos y macrófagos [220]. Sin embargo, se encontraron muy pocas células ISM1<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> por lo que no parece estar enriquecida en granulocitos (Figura 7).

Por último, dentro del linaje mieloide, se encuentran los eritrocitos marcados por TER119 que identifica a eritrocitos en sus últimas etapas de desarrollo [114]. Sin embargo, las células ISM1<sup>+</sup> no expresan el marcador TER119 (Figura 7). En general, del linaje mieloide, la única población en pulmón que podría ser de interés para investigaciones futuras es la CD11b<sup>+</sup> que corresponde principalmente con monocitos y macrófagos.

En el caso de las poblaciones linfoides se evaluaron marcadores de linfocitos T, de linfocitos B y de células linfoides innatas (Figuras 8 y 9). Los linfocitos T son un linaje celular que lleva a cabo su proceso de diferenciación en el timo. Los linfocitos T se caracterizan por tener el receptor de células T o TCR y diversos co-receptores que nos ayudan a determinar su subtipo. Todos los linfocitos T poseen un clúster de diferenciación CD3 que se compone de diversas subunidades, por ejemplo, la subunidad épsilon (CD3ε). Detectar subunidades del complejo CD3 es una forma de identificar linfocitos T de forma general. Los linfocitos T se diferencian en linfocitos T helper que expresan el co-receptor CD4 del TCR o en linfocitos



**Figura 8: Presencia de ISM1 en poblaciones linfoides derivadas de pulmón.** Se extrajeron las células totales de pulmón murino y se analizaron los marcadores principales de leucocitos de linaje mieloide. Se muestran figuras representativas de 3 experimentos independientes.

T citotóxicos que expresan  $CD8^+$  en lugar de  $CD4$  [69].

Como ya se había reportado ISM1 está presente en linfocitos T, en este caso se detectaron linfocitos  $CD3\epsilon^+$  pero escasos linfocitos  $ISM1^+CD4^+$  o  $ISM1^+CD8^+$  (Figura 8) [265]. Se ha mostrado que linfocitos T doble negativos ( $CD4^-CD8^-$ ) poseen potencial antiinflamatorio y aumentan cuando existe daño en el pulmón y otros órganos [87].

Además de los linfocitos T, en el pulmón encontramos algunas poblaciones de linfocitos B. Los linfocitos B, principal tipo celular en la respuesta humoral, se pueden identificar por la expresión de  $CD19$ , que es parte de un complejo co-receptor para el receptor de células B (BCR) junto con  $CD21$  y  $CD81$  [228, 273]. De manera interesante, se encontró una subpoblación  $ISM1^+CD19^+$  la cual podría estudiarse en proyectos futuros.

Siguiendo con los subtipos de leucocitos en pulmón, decidimos investigar a las células linfoides innatas. En este tipo celular convergen células con funciones similares a los linfocitos T  $CD4^+$ , sin embargo, carecen de

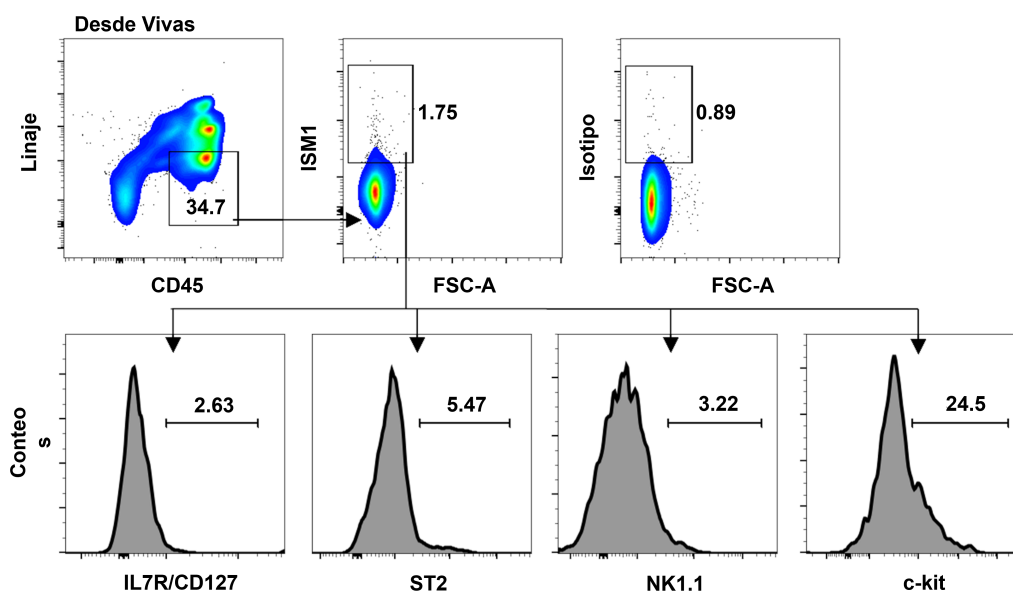
la expresión de TCR y de otros marcadores de linaje tales como CD3, CD19, CD11b o CD11c. Además, regularmente son residentes de tejido [70].

En el pulmón podemos encontrar principalmente células NK, células linfoides innatas de tipo 2 y algunas del tipo 3 (ILC2 e ILC3, respectivamente). Las ILC2 median procesos inflamatorios ocasionados por daño, alérgenos o infecciones. En el pulmón, las ILC2 ayudan a mantener la barrera epitelial del tracto respiratorio mediante la secreción de citocinas como IL-4 o IL-5 y proteínas como la anfiregulina, que es parte de la familia del EGF (*Epidermal growth factor*, factor de crecimiento epidérmico) [25]. Las ILC2 expresan marcadores de superficie tales como la molécula coestimuladora inducible de linfocitos T (ICOS o CD128), ST2 (IL-33R) o IL-7R (CD127) [268].

Las ILC3 son abundantes en las mucosas y están involucradas en la respuesta inmune innata contra bacterias extracelulares, así como contener bacterias comensales en el intestino, donde son abundantes y ayudan a regular la respuesta de las células Th17. En el pulmón protegen contra bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* en inicios tempranos [76]. Las ILC3 se pueden identificar por marcadores de superficie como NKp46 o NK1.1, expresan poco o nulo IL-7R y c-kit [268].

Nuestros datos muestran que pocas células Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup> co-expresan antígenos propios de ILCs, tales como IL-7R, ST2 o NK1.1 (Figura 9). De manera interesante, una porción importante de las células Lin-CD45<sup>+</sup> co-expresa c-kit. Recordando que c-kit o CD117 es el receptor del SCF (*Stem Cell Factor*, factor de células troncales) y posee un rol fundamental en progenitores de células hematopoyéticas [183]. Este resultado reforzó la idea de que ISM1 podría estar presente en alguna población con fenotipo progenitor, lo que se evaluó más adelante en este proyecto.

Dado que se había mencionado anteriormente que ISM1 es expresada por células tipo epitelial [186, 266]. Se exploró la co-expresión de ISM1 en células que expresan en su superficie la molécula de adhesión epitelial (EpCAM) [134], la mayoría de las células ISM1<sup>+</sup> no co-expresan EpCAM (Figura 10), por lo que decidimos evaluar otros tipos celulares como el endotelio y estromal/mesenquimal. En particular, encontramos que



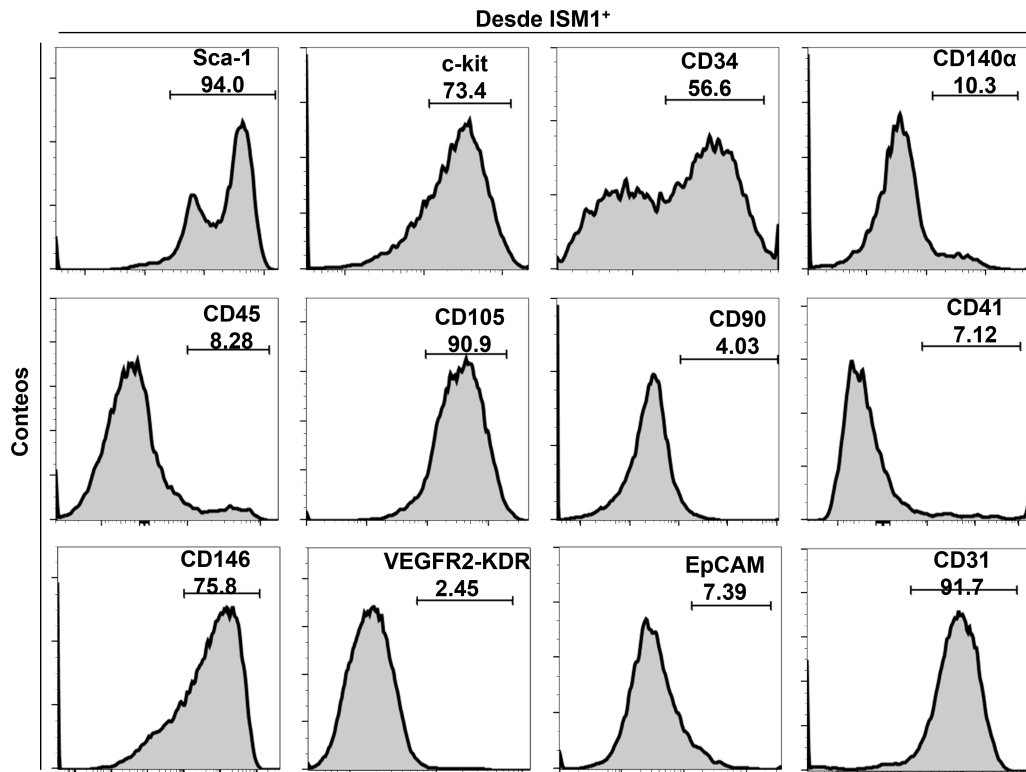
**Figura 9: Las células ISM1<sup>+</sup> no están enriquecidas en células linfoides innatas.** Se analizó por tinción multiparamétrica la presencia de células ISM1<sup>+</sup> con diversos marcadores de células linfoides innatas. Se muestra un experimento representativo de 3.

la mayoría de las células ISM1<sup>+</sup> co-expresan la molécula de adhesión de plaquetas/endotelio tipo 1 (PECAM o CD31) (Figura 10), una molécula expresada por células endoteliales [212], leucocitos maduros [169] y en algunos progenitores hematopoyéticos [15].

De manera interesante, se observa co-expresión consistente con el marcador CD146 que es expresada en células progenitoras endoteliales[191] y en mesenquimales/estromales [251]. Anteriormente encontramos que la mayoría de las células ISM1<sup>+</sup> co-expresan Sca-1, además de ser expresado por células progenitoras hematopoyéticas en médula ósea [280] y en desarrollo embrionario [24], también se encuentra en células progenitoras endoteliales [32, 64].

Adicionalmente, en el pulmón se encuentran células de tipo estromal o soporte, como fibroblastos, miofibroblastos y pericitos. La mayoría de estos subtipos celulares expresan al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFR $\alpha$  o CD140 $\alpha$ ), además, estas pobla-





**Figura 10: ISM1 se asocia con marcadores de células progenitoras.** Se analizó por tinción multiparamétrica la presencia de células ISM1<sup>+</sup> con diversos marcadores para identificar epitelio, endotelio, fibroblastos y células progenitoras. Se realizaron 3-5 tinciones por marcador mostrado.

ciones presentes desde el desarrollo ayudan a la formación del pulmón tanto en ratón como en un humano [58, 106]. Sin embargo, nuestros datos mostraron que pocas células ISM1<sup>+</sup> co-expresan CD140 $\alpha$  (Figura 10).

## 5.2. Las células ISM1<sup>+</sup> de pulmón son de fenotipos progenitores endotelial y hematopoyético

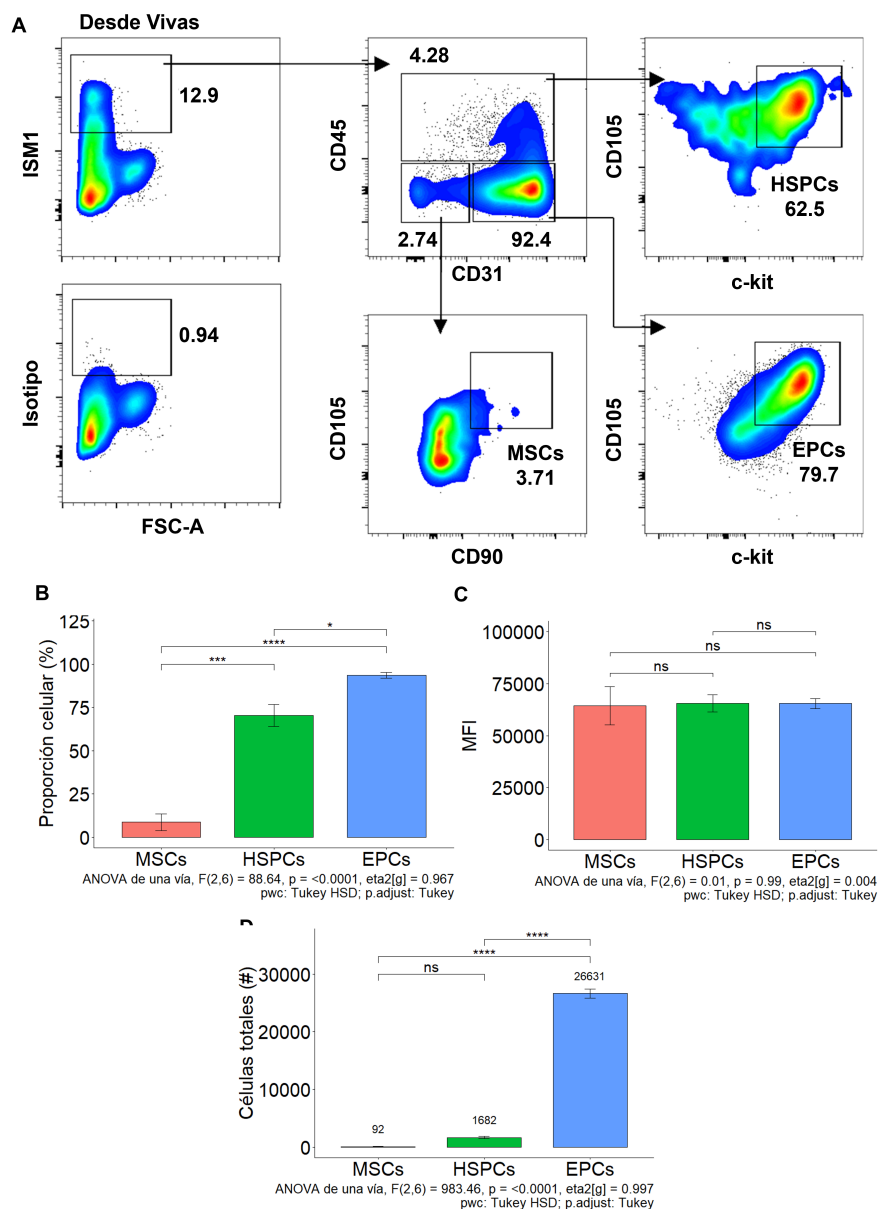
Todo lo anterior sugiere que ISM1<sup>+</sup> puede estar siendo expresado principalmente por células con fenotipos endotelial y hematopoyético, para dilucidar esto más a fondo se realizó una tinción multiparamétrica. Adicionalmente se incluyeron dos marcadores típicos de células mesenqui-

males, CD90 (Thy1) y CD105 [54]. CD90 es una glicoproteína anclada a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI), se detectó por primera vez en células T de ratones y posteriormente se encontró que diversos tipos celulares como los timocitos, los fibroblastos y las células mesenquimales también expresan CD90 [165]. CD105 o endogлина es una glicoproteína que funciona como parte del complejo del receptor tipo III de la familia del TGF- $\beta$  y se expresa en la membrana de las células mesenquimales de MO, en progenitores hematopoyéticos y células endoteliales [104, 199, 282].

Se observaron células ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> que corresponden con células progenitoras con potencial hematopoyético según lo descrito en la literatura y se denominaron HSPCs (*Hematopoietic stem and progenitor cells*, o células troncales hematopoyéticas) (Figura 11A). Mientras que las células ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> corresponden con células progenitoras endoteliales EPCs (*Endothelial progenitor cells*) (Figura 11A).

Finalmente, aquellas células ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> serían algún tipo de célula mesenquimal MSCs (*Mesenchymal stem cells*) (Figura 11A). Estos datos indican que, en términos de frecuencia y números absolutos (Figura 11B-C), la expresión de ISM1 se encuentra asociada en primer lugar con un fenotipo endotelial progenitor, en segundo lugar, con un fenotipo progenitor hematopoyético y en último lugar con células mesenquimales clásicas. En cuestión de intensidad media de fluorescencia no se observaron diferencias notables entre las poblaciones (Figura 11D), por lo que se presume que la proporción de moléculas ISM1 es similar en todas ellas.

Nuestro laboratorio está interesado en el papel que tiene ISM1 en células del sistema inmunológico, haber encontrado indicios de una subpoblación de progenitores hematopoyéticos ISM1<sup>+</sup> de pulmón (Figura 11) nos alentó a estudiar esta población en particular, por lo que se analizaron un par de marcadores más típicos de progenitores hematopoyéticos. En general la mayoría de las células ISM1<sup>+</sup> de pulmón expresan Sca-1, c-kit y CD34 (Figura 12A), marcadores típicos de progenitores hematopoyéticos [200]. Por microscopía de flujo pudimos observar que las células CD45<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>ISM1<sup>+</sup>, son células de aproximadamente 7  $\mu$ m, con escaso citoplasma y morfología esférica, similar a células linfoides (Figura 12B y



**Figura 11: Las células ISM1<sup>+</sup> son más abundantes en progenitores tipo endotelial y hematopoyético.** Se analizó por tinción multiparamétrica la presencia de células ISM1<sup>+</sup> de los tipos troncales mesenquimales MSCs, troncales y progenitoras hematopoyéticas HSPCs y progenitores endoteliales EPCs . A. Figura representativo de 5 experimentos. B. Conteos absolutos. C. Proporciones de las poblaciones. D. Intensidad media de fluorescencia (MFI). Datos mostrados son la media  $\pm$  SEM.

C).

### **5.3. Células ISM1<sup>+</sup> con fenotipo troncal y progenitor hematopoyético de pulmón**

Convencionalmente la subpoblación de HSPCs incluye diversos subtipos celulares con diferentes jerarquías. Estos subtipos están ampliamente caracterizados por sus antígenos de superficie, así como por su expresión génica. En primer lugar, tenemos a células linaje negativo, positivas para Sca-1 y c-kit que se reconocen como LSK, dependiendo del tejido origen se puede incluir o no CD45 [280]. Las LSK se pueden caracterizar por marcadores de la familia SLAM en algunos progenitores multipotentes (MPPs) y en células troncales de corta y larga vida (ST-HSCs y LT-HSCs), respectivamente [112].

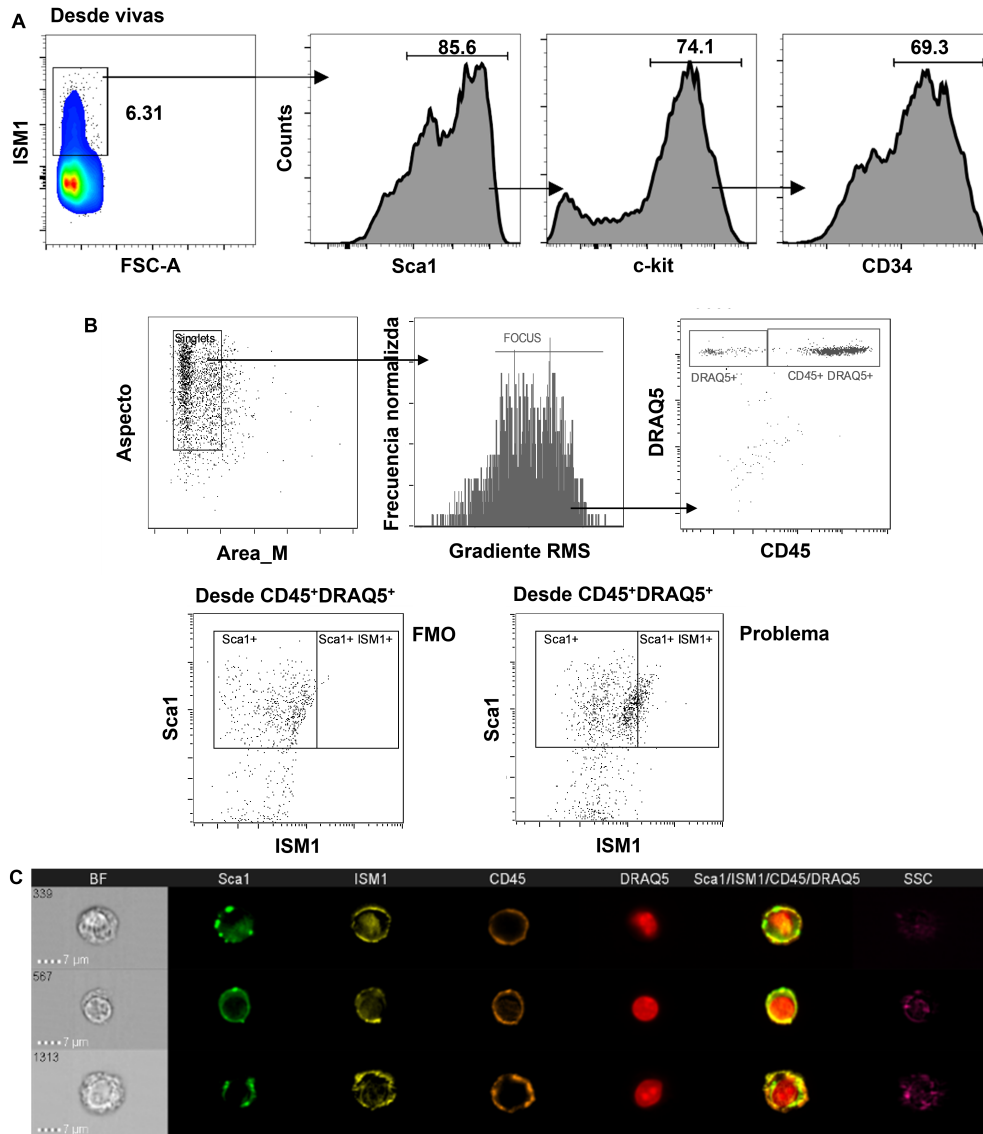
Sabiendo que gran parte de las células ISM1<sup>+</sup> expresan marcadores como Sca-1, c-kit o CD34 (Figura 12A), quisimos saber si algunas de estas células correspondían fenotípicamente con HSPCs, por lo cual se tomaron células Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>ISM1<sup>+</sup> para evaluar los marcadores Sca-1, c-kit, CD150 Y CD48 de forma similar a lo reportado anteriormente [131].

Aproximadamente un 12 % de las células Lin-CD45<sup>+</sup>ISM1<sup>+</sup> son dobles positivos para Sca-1 y c-kit, denominadas células ISM1 LSK. De esta subpoblación la mayoría resultaron ser MPP3/4 y ST-HSCs (Figura 13).

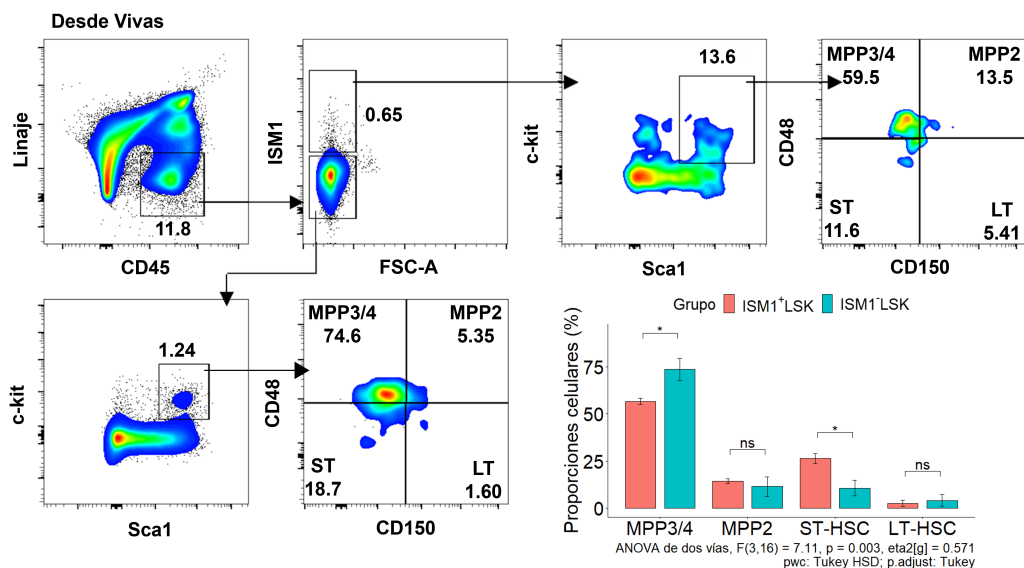
### **5.4. Las células ISM1<sup>+</sup> son residentes de tejido**

Se realizó un ensayo para evaluar la pertenencia, *homing* o residencia de las células ISM1<sup>+</sup> tipo progenitoras. Se evaluaron las integrinas CD49b, CD49d y CD49a. CD49b o integrina alfa 2, en conjunto con integrina beta 1 forma la molécula VLA-2 ( $\alpha 2\beta 1$ ), que se une a colágenos tipo I, II y XI; su presencia en precursores de células T indica residencia en tejidos que expresan estos tipos de colágeno como la médula ósea y pulmón Hanazawa2013, Richter2007.

La integrina alfa 4 o CD49d, forma a la molécula de adhesión VLA-4 ( $\alpha 4\beta 1$ ). VLA-4 está presente en la superficie de células progenitoras, lin-



**Figura 12: Morfología de las células progenitoras hematopoyéticas ISM1<sup>+</sup>.** A. Se analizó por tinción multiparamétrica la presencia de células ISM1<sup>+</sup> contra los marcadores Sca-1, c-kit y CD34, encontrando una correlación muy fuerte con estos tres. B y C. Por microscopia de flujo se observan las células CD45<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>ISM1<sup>+</sup> derivadas de pulmón. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.



**Figura 13: ISM1 se encuentra en algunas subpoblaciones de células troncales hematopoyéticas.** Se analizaron células LSK con marcadores convencionales de células troncales y progenitoras hematopoyéticas. Se muestran los porcentajes de las poblaciones correspondientes. El análisis estadístico fue por ANOVA de dos vías con *post test* de Bonferroni,  $n=5$ ,  $p<0.05$ .

focitos T y B, monocitos y en polimorfonucleares (PMN), sus receptores principales son la fibronectina y la molécula de adhesión vascular VCAM1. Su presencia se relaciona con inflamación y movilización [92]. CD49a o integrina alfa 1, junto con la integrina beta 1 forman la molécula VLA-1 ( $\alpha1\beta1$ ) que se une a colágenos tipo I y IV; el colágeno tipo I es el más abundante de todos, mientras que el tipo IV es el mayor componente de las membranas basales [140]. En los pulmones la expresión de CD49a está asociada a linfocitos T residentes de memoria con actividad anti-viral [210].

Se observó que las células ISM1<sup>+</sup> se enriquecen con los marcadores CD49b y CD49a, no así con CD49d (Figura 10A). De manera interesante, las células ISM1<sup>+</sup>CD49a<sup>+</sup> también son positivas para Sca-1 y c-kit (Figura 10A), por lo que corresponden con las poblaciones evaluadas previamente, posiblemente las EPCs y HSPCs (Figura 11 y 13). Tomando en cuenta que Sca-1 es un marcador de células progenitoras en ratón y que correlaciona con más del 80% con las células ISM1<sup>+</sup> (Figura 14A), se tomó

como blanco a las células Sca-1 para evaluar su residencia con un ensayo similar al utilizado por Lefrançois y colaboradores en 2107, se inyectó anti Sca-1 marcado con APC y posterior a la recirculación, los ratones tratados fueron sacrificados y las células obtenidas se incubaron con anti Sca-1 marcado con FITC y anti ISM1 marcado con PE [131].

Como se observa en la Figura 14B, la mayor proporción de células Sca-1 son extravasculares, o sea que residen en el tejido celular y no se encuentran en circulación. Como era de esperarse, el mayor porcentaje de células ISM1 se encuentra en las células Sca-1<sup>+</sup> extravasculares y no en las que se encuentran en circulación sanguínea (intravasculares). Este resultado confirmó que las células ISM1 con fenotipos progenitores en el pulmón de ratón, son en efecto, residentes de este tejido. Se desconoce si su origen remonta al desarrollo embrionario o si en algún punto migraron de otros sitios para hacer *homing* en el pulmón de ratón.

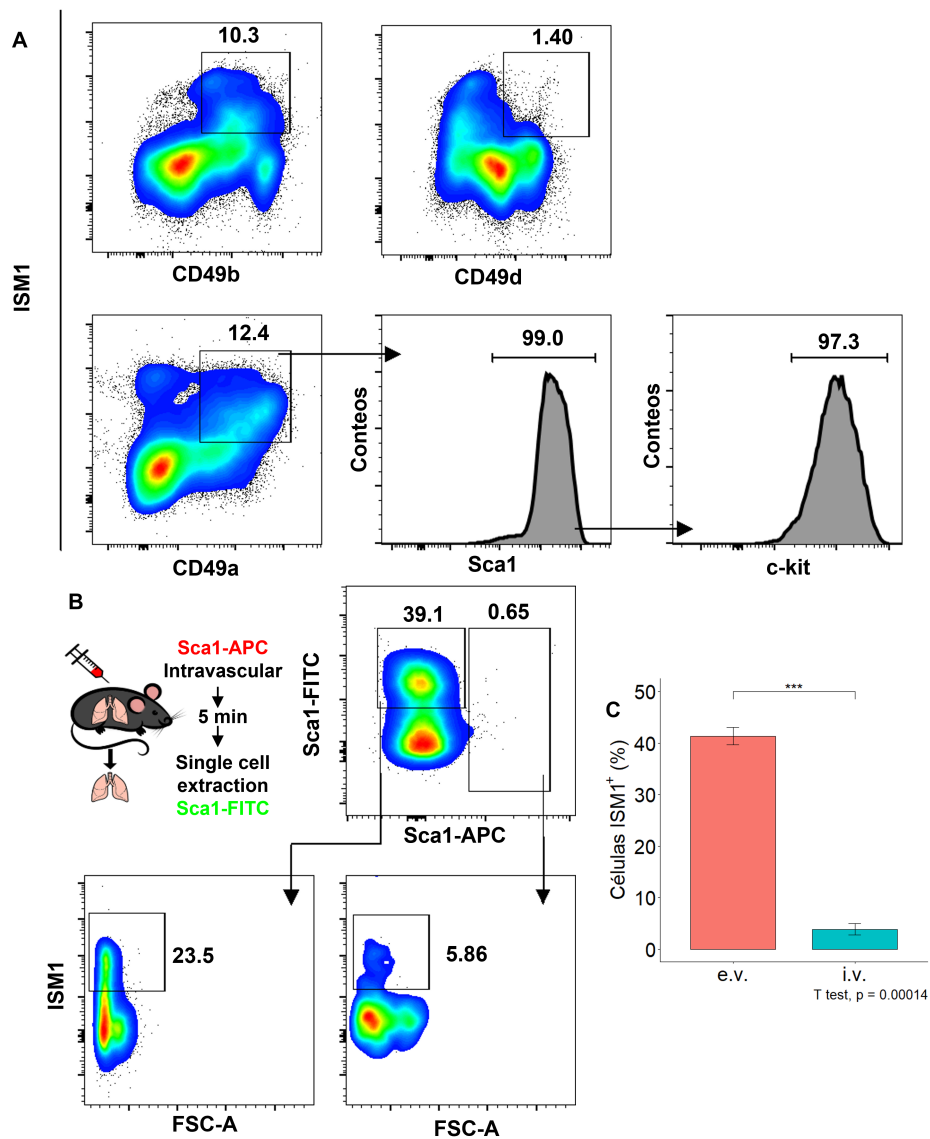
## **5.5. ISM1 mantienen a células CD45 y favorece la diferenciación de algunos tipos celulares**

La presencia de ISM1 en células hematopoyéticas con fenotipo troncal y progenitor, adicional a su presencia en células con fenotipo troncal epitelial y mesenquimal, sugiere que posee un papel regulador en procesos de diferenciación sobre células con fenotipo troncal. Anteriormente se reportó que en pez cebra ISM1 promueve la formación colonias hematopoyéticas [18]. Por lo que inicialmente evaluamos el efecto exógeno de ISM1 sobre un cultivo de células de pulmón (Figura 15).

Para calcular la concentración de ISM1 recombinante (rISM1) se tomó en cuenta los niveles que hay en plasma (Figura 16).

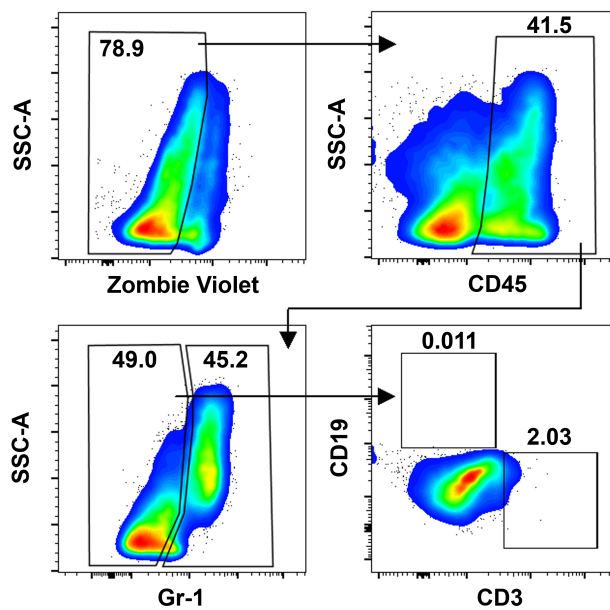
En primer lugar, a los 5 días de cultivo se observó mayor proporción de células CD45<sup>+</sup> al adicionar rISM1 (Figura 17A y C). Además, se observaron cúmulos de células sobre las células OP9, de manera similar a los co-cultivos de progenitores hematopoyéticos derivados de tejidos embrionarios (Figura 17B) [85].

Finalmente, al evaluar la generación de 3 subtipos importantes de célu-

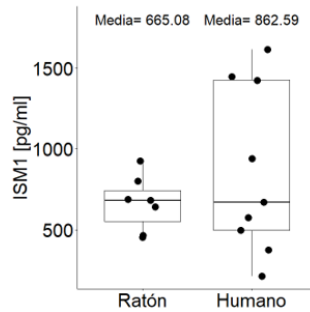


**Figura 14: Las células ISM1<sup>+</sup> progenitoras son residentes de tejido.** A. Se analizó por citometría de flujo la presencia de células ISM1<sup>+</sup> con integrinas de residencia. B. y C. Ensayo de residencia de células Sca-1<sup>+</sup>ISM1<sup>+</sup>. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados. Datos mostrados son la media  $\pm$ SEM. Datos analizados con T de Student para datos no pareados, n=3, p<0.0001.

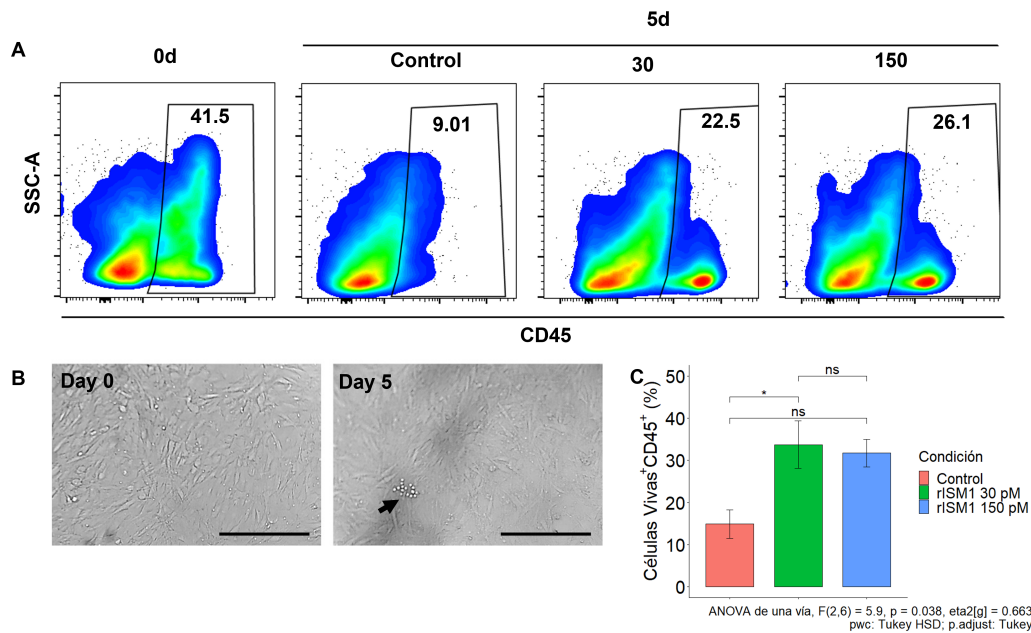




**Figura 15: Gating para principales poblaciones de leucocitos de pulmón.** Se realizó una tinción multiparamétrica para evaluar las poblaciones de leucocitos de forma general en mieloides (CD45<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>), linfocitos T (CD45<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>) y linfocitos B (CD45<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>).

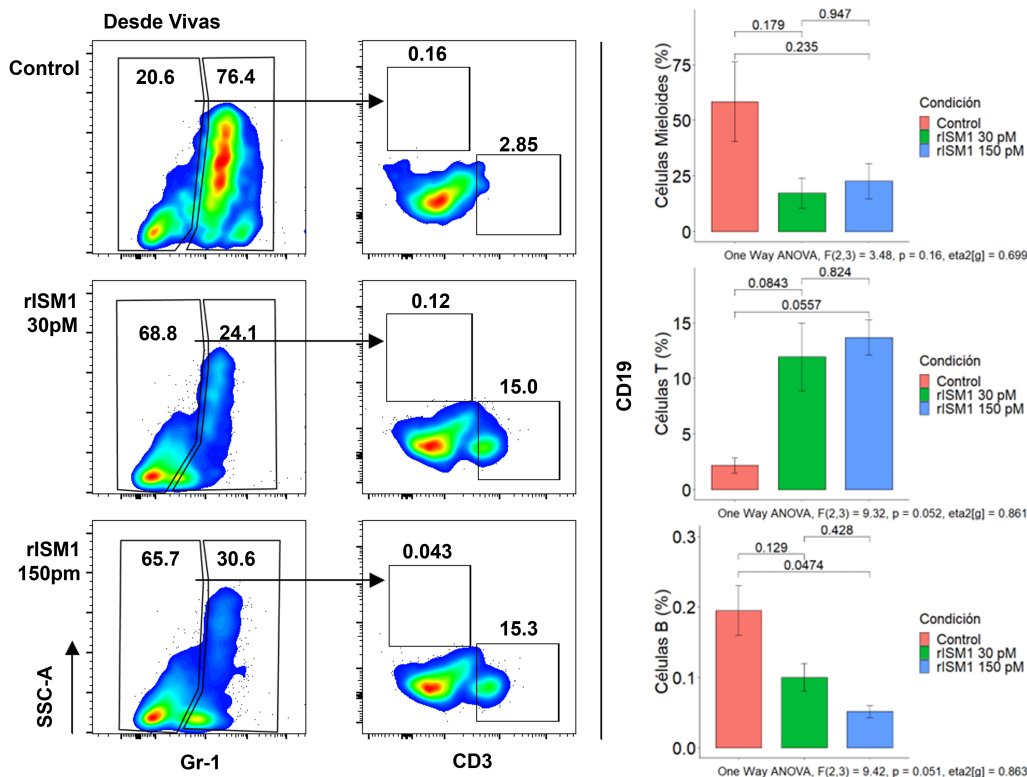


**Figura 16: Niveles plasmáticos de ISM1.** Se determinaron los niveles plasmáticos de ISM1 en ratones C57BL6/J adultos, en humanos adultos y pediátricos. Datos mostrados son la media  $\pm$ SEM.



**Figura 17: La adición de rISM1 promueve el establecimiento de células CD45<sup>+</sup>.** Se cultivaron células de pulmón en presencia de ISM1 recombinante (rISM1) sobre células OP9. Se analizaron las poblaciones de leucocitos 5 días después. A. Figuras representativas mostrando células CD45<sup>+</sup> vivas, en presencia de rISM1 o con el vehículo (Control PBS 1x). B. Microscopía de campo claro de co-cultivos al día 0 y al día 5. La barra representa 500  $\mu$ m C. Porcentajes de células vivas CD45<sup>+</sup>.

las hematopoyéticas, encontramos que la adición de rISM1 favoreció la generación células T sobre la de células B o Ly6G (Figura 18).



**Figura 18: La adición de rISM1 promueve el establecimiento de linfocitos T.** Se cultivaron células de pulmón en presencia de ISM1 recombinante (rISM1) sobre células OP9. Se analizaron las poblaciones de leucocitos 5 días después. Se evaluaron las poblaciones de leucocitos de forma general en: Células Gr-1 (CD45<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>), células T (CD45<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>) y células B (CD45<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>).

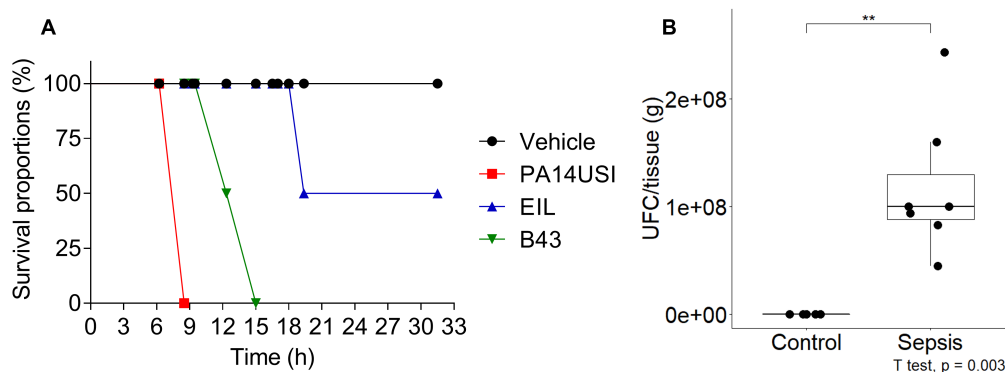
En resumen, nuestros datos indican que ISM1 podría estar funcionando como un factor que promueve la diferenciación de células hematopoyéticas.

## 5.6. Las células ISM1<sup>+</sup> responden a las infecciones

Los estímulos proinflamatorios funcionan como señales de emergencia que regulan a las células hematopoyéticas de la médula ósea para generar células nuevas que puedan combatir la infección o daño. Estas señales también afectan la producción de factores solubles necesarios

para el control hematopoyético [60].

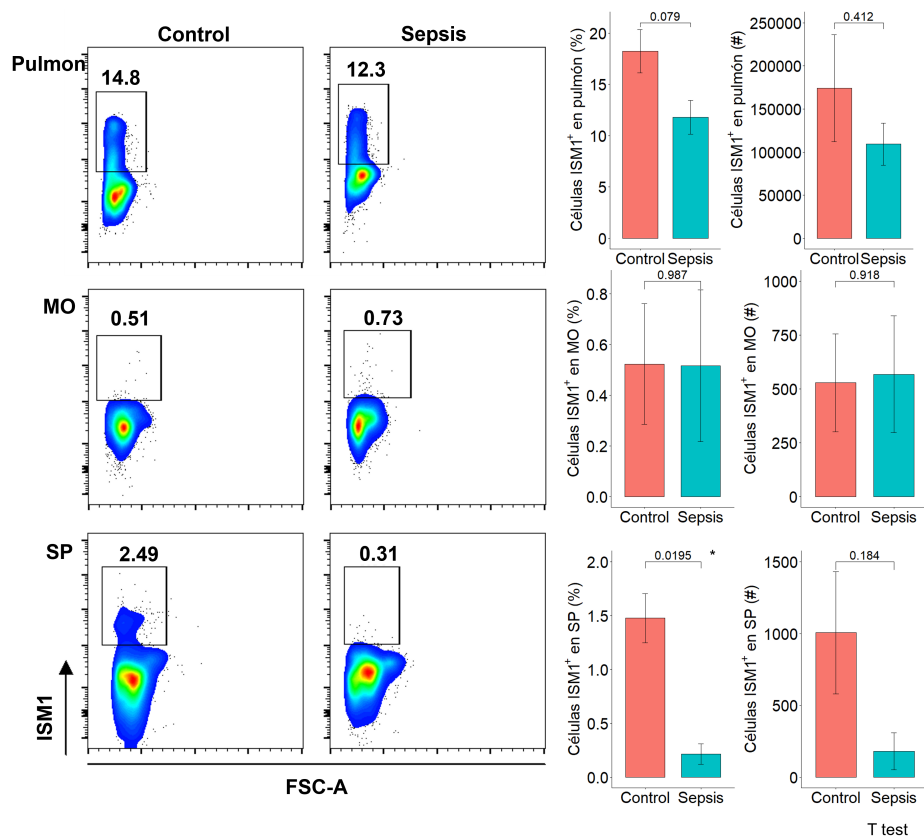
Para conocer los efectos de un proceso inflamatorio sobre las poblaciones ISM1<sup>+</sup>) y las concentraciones de ISM1 soluble en la periferia, se generó un modelo de infección aguda con *Pseudomonas aeruginosa* aislada de pacientes con neumonía severa. Se inocularon ratones C57BL6/J con 3 cepas, mostrando que la de mayor letalidad es la PA14-USI (Figura 19A). Adicionalmente, se confirmó la presencia en pulmón murino *post mortem* (Figura 19B).



**Figura 19: Protocolo de infección con *P. aeruginosa* PA14USI.** A. Se probaron 3 cepas de *P. aeruginosa* a  $2 \times 10^7$  UFC/ml de PBS. B. Se infectaron ratones con  $2 \times 10^7$  UFC/ml y se sacrificaron 8 h posteriores a la infección, se confirmó la presencia de colonias bacterianas en los pulmones, así como signos de sepsis. Datos mostrados son la media  $\pm$ SEM.

Una vez establecido el modelo, se analizaron los niveles globales de células ISM1<sup>+</sup> posterior a la infección. No se encontraron cambios marcados en pulmón ni médula ósea, sin embargo, se encontró que las células ISM1 de sangre periférica disminuyeron (Figura 20). Este fenómeno se comprobó al evaluar los niveles plasmáticos de ISM1 posterior a la infección (Figura 21A).

La disminución ISM1 en plasma posterior a la infección en ratones nos llevó a preguntarnos si este fenómeno ocurría en humanos. Se analizaron muestras de niños hospitalizados con hemocultivo positivo y síntomas de sepsis, encontrando una disminución en los niveles de ISM1 plasmático

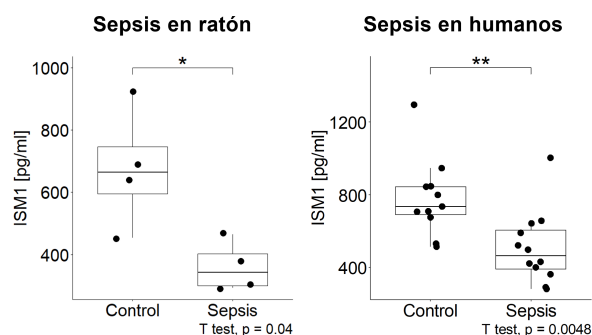


**Figura 20: La infección con *P. aeruginosa* PA14USI disminuye el porcentaje de células ISM1<sup>+</sup> circulantes en sangre periférica.** Del modelo de infección se analizaron las células de pulmón, médula ósea y sangre periférica por citometría de flujo para determinar los porcentajes y conteos de células ISM1<sup>+</sup>. Datos mostrados son la media  $\pm$  SEM. Análisis estadístico *T de Student* para datos no pareados, n=3, p<0.05.

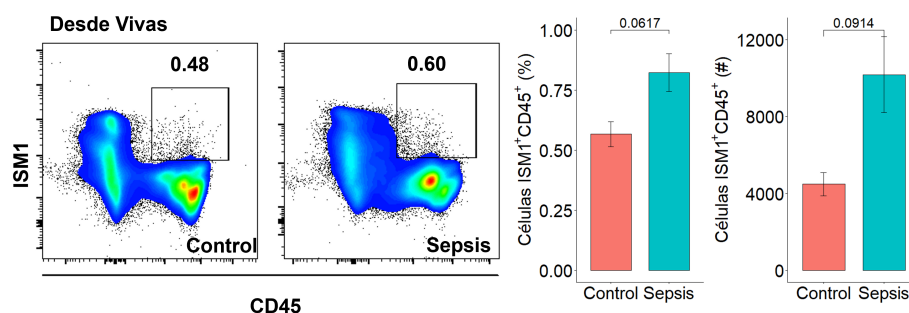
(Figura 20A). Adicionalmente, se recabaron muestras de pacientes adultos hospitalizados no asociados a bacteremia y se encontró el mismo patrón de disminución (Figura 21B)

En nuestro modelo murino de infección hubo cierta tendencia al incremento en células ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> de pulmón (Figura 22).

De manera interesante, las proporciones de células LSK incrementan en respuesta al daño (Figura 23A), similar a lo reportado en médula ósea y a los ensayos hechos en pulmón [131]. Así mismo las células ISM1 LSK



**Figura 21: Los eventos inflamatorios sistémicos disminuyen los niveles plasmáticos de ISM1.** Se determinaron los niveles en plasma por el método de ELISA. Niveles de ISM1 en ratones infectados con *P. aeruginosa* PA14-USI (Izquierda) y en pacientes pediátricos hospitalizados con sepsis (Derecha). Datos mostrados son la media  $\pm$ SEM. Análisis estadístico *T de Student* para datos no pareados, \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ .

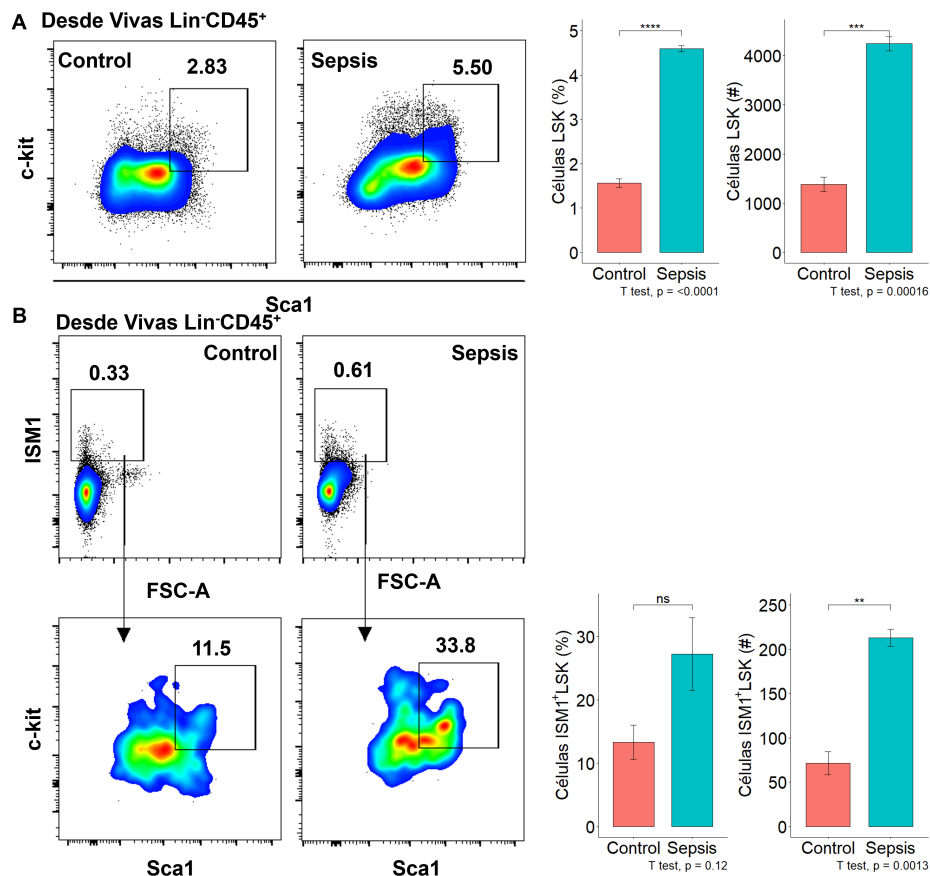


**Figura 22: Cambios globales en las células ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>.** Se determinaron los porcentajes y números absolutos de las células ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> tras la infección con *P. aeruginosa* PA14USI. Datos mostrados son la media  $\pm$ SEM. Se analizaron por *T de Student* para datos no pareados,  $n=3$ .

también incrementan tras la infección con *P. aeruginosa* (Figura 23B).

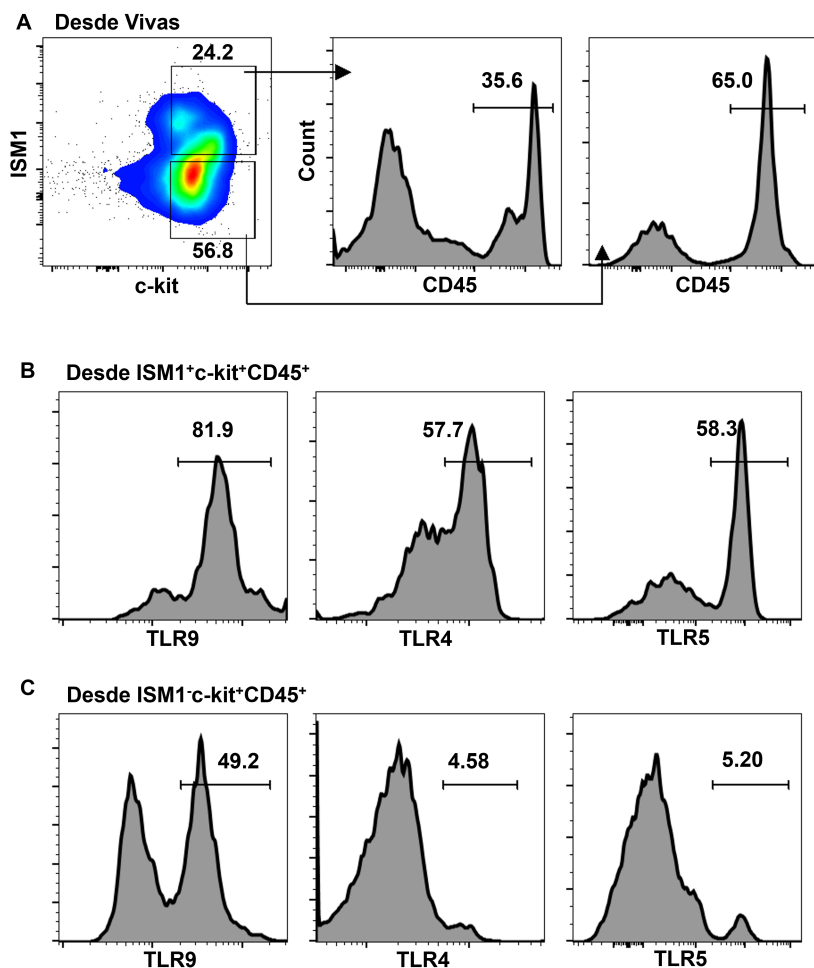
Se sabe que en el pulmón las células inmunológicas como PMN o monocitos expresan TLRs, que funcionan como sensores de patógenos y de daño [227]. Así mismo, se sabe que las HSPCs también expresan ciertos TLRs y su estímulo promueve la expansión y diferenciación [233].

Dado que durante el proceso inflamatorio las concentraciones de ISM1 disminuyen y la frecuencia de células ISM1<sup>+</sup> se altera, quisimos verificar si



**Figura 23: Cambios en las poblaciones LSK e ISM1<sup>+</sup>LSK tras la infección con *P. aeruginosa*.** A. Se analizaron LSK (Lin<sup>-</sup>CD45<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> totales de pulmón, se muestran porcentajes y números absolutos. B. Se analizó la subpoblación ISM1<sup>+</sup>LSK y se muestran los porcentajes y números absolutos. Los datos son la media  $\pm$ SEM, n=3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue *T de Student* para datos no pareados, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001.

la presencia de TLRs podría asociarse con las observaciones efectuadas. Primero se exploró si las células ISM1 con fenotipo progenitor hematopoyético también expresan algunos de los TLRs más comunes. El 80 % de las células ISM1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> co-expresan TLR9 y poco más de 50 % expresan TLR4 y TLR5 (Figura 24A-B). De manera interesante, solo la mitad de las células ISM1<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> co-expresan TLR9 y menos del 6 % expresan TLR4 y TLR5 (Figura 24).

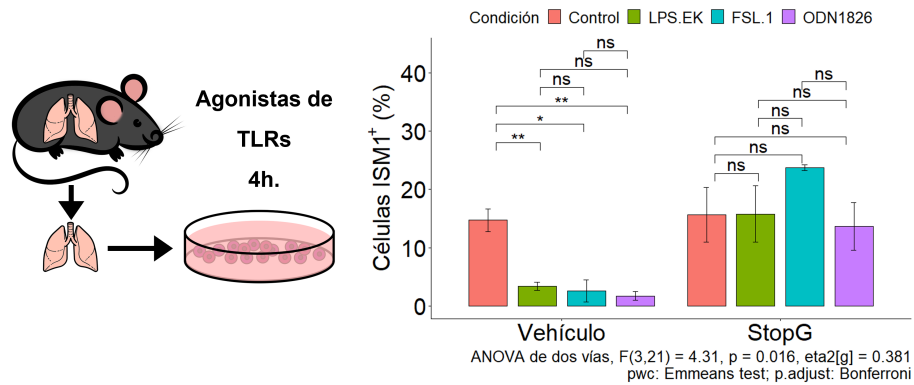


**Figura 24: Las células tipo progenitoras ISM1<sup>+</sup> de pulmón expresan receptores TLR9, TLR4 y TLR5.** Se analizaron células de pulmón con los marcadores ISM1, CD45, c-kit, TLR9, TLR4 y TLR5. A. Células ISM1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> y ISM1<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>. B. TLRs en células ISM1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>. C. TLRs en células ISM1<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>.

Para visualizar el efecto que podría tener esta distribución de TLRs, se realizaron ensayos *in vitro* con los ligandos específicos de cada TLR. Se observó que la frecuencia de células ISM1<sup>+</sup> disminuyó en presencia de los ligandos correspondientes a los TLRs evaluado. Sin embargo, la adición un inhibidor de la ruta secretoria convencional mantuvo la frecuencia de células ISM1<sup>+</sup> sugiriendo que al estimarse los TLRs, ISM1 se secreta



(Figura 25).



**Figura 25: Las células ISM1<sup>+</sup> de pulmón son susceptibles a los ligandos de TLR9, TLR4 y TLR5.** Se extrajeron células totales de pulmón y se retaron con los agonistas de los TLRs *in vitro* durante 4 horas en presencia y ausencia de *StopGolgi*. Datos representan la media  $\pm$ SEM, n=3-5 experimentos. Se analizaron con ANOVA de una vía con *post-test* de Bonferroni,  $p < 0.05$

En general, nuestros datos indican que ISM1 tiene funciones de soporte en las células progenitoras hematopoyéticas. Por otro lado, las células ISM1<sup>+</sup> son responsivas a daño e inflamación, además promueve la diferenciación de ciertos tipos celulares.

## 6. Discusión

ISM1 es un gen conservado entre diferentes especies y su expresión de ARN mensajero (ARNm) en el tracto respiratorio, en las mucosas y en las células hematopoyéticas es elevada [265]. Sin embargo, la medición de ISM1 en poblaciones celulares purificadas provenientes de otros tejidos asociados al sistema inmune no ha sido explorada.

En este trabajo se evaluó la presencia de ISM1 intracelularmente en células purificadas de pulmón, en lámina propia de intestino delgado, médula ósea y sangre periférica de ratón. Confirmamos que las células ISM1<sup>+</sup> se encuentran enriquecidas en los pulmones comparado con los demás tejidos estudiados, tal como la expresión de RNAm ha mostrado [186, 265]. De tal manera que se decidió enfocar nuestro estudio en este órgano.

Dado que el pulmón es un órgano enriquecido en diversos tipos celulares, quisimos encontrar que tipos celulares concentraban la mayor expresión de ISM1. En primer lugar, encontramos que parte de las células CD11b<sup>+</sup>, co-expresan ISM1 intracelularmente. Estas células pueden corresponder a macrófagos alveolares, intersticiales y algunos tipos de monocitos [19].

Por otro lado, se corroboró la presencia de algunas células CD3ε<sup>+</sup> positivas para ISM1 como se había observado anteriormente [265]. Adicionalmente, algunos linfocitos B también mostraron ser positivos para ISM1 al co-expresar CD19 [273]. Entre otras células maduras de linaje hematopoyético encontramos a las ILC, sin embargo, no encontramos una fuerte correlación con la expresión de ISM1 y marcadores comunes de ILCs, a excepción de c-kit, que además de estar presente en algunas ILC3, es un marcador de células progenitoras [64, 183, 268].

El desarrollo pulmonar se origina a partir del tejido endodérmico del intestino anterior. El endodermo pulmonar genera todos los linajes epiteliales que forman las vías aéreas superiores, los alvéolos y la tráquea. Los llamados divertículos respiratorios, reciben señales del mesodermo ventral cercano, lo que promueve su desarrollo [250]. ISM1 es expresado

por estructuras mesodérmicas durante el desarrollo, pero no estrictamente con estructuras del endodermo [186, 196].

Pese a que se ha reportado que ISM1 en pulmón adulto es expresado por tejidos de origen endodérmico como el epitelio bronquial [186, 294], nuestros análisis mostraron una baja frecuencia de células ISM1<sup>+</sup> dobles positivas contra el marcador de células epiteliales EpCAM [134], por lo que es más probable que las células que expresan ISM1 sean de origen mesodérmico, tales como células endoteliales, mesenquimales, hematopoyéticas y de tejido conectivo [189].

La mayoría de las células ISM1<sup>+</sup> expresan CD31 en su superficie, CD31 o PECAM es una molécula de adhesión típicamente expresada por células endoteliales [212] y algunas células del sistema hematopoyético [15]. Al hacer un análisis multiparamétrico encontramos que además de co-expresar CD31<sup>+</sup>, la mayoría de las células ISM1<sup>+</sup> tienen fenotipo progenitor endotelial al ser principalmente ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>. Esta subpoblación pulmonar ha sido descrita con anterioridad y se ha probado experimentalmente su capacidad para generar vasos sanguíneos tanto *in vitro* como *in vivo* [64].

Diversos estudios sobre ISM1<sup>+</sup> resaltan sus efectos sobre células endoteliales, principalmente por su actividad antiangiogénica [284, 291], como promotor de permeabilidad [266] e incluso de sobrevivencia cuando se encuentra en fijo al sustrato [294]. Con lo cual podríamos asumir que estos efectos entre las células endoteliales son autocrinos y parácrinos. Se ha mencionado que células de carácter estromal o “de soporte” en pez cebra son las principales productoras de ISM1 [18]. Sin embargo, no encontramos gran cantidad de MSCs ISM1<sup>+</sup> definidas por ser CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> [54] ni tampoco células CD140 $\alpha$ <sup>+</sup> que corresponden a mesenquimales o fibroblastos [58], por lo que probablemente el fenotipo de células ISM1 de tipo estromal sea distinto.

En la médula ósea el nicho hematopoyético está constituido por células estromales y endoteliales sinusoidales, se ha implicado que ambas poblaciones son necesarias para mantener el nicho de HSPCs, por lo que es probable que parte de las células ISM1<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> mantengan a las HSPCs de pulmón, como lo descrito en pez cebra, donde sus células estromales

que dan soporte a células hematopoyéticas son de tipo endotelial [137]. Además, las células endoteliales han mostrado servir como nicho y contribuir a la diferenciación de macrófagos hacia fenotipo M2 [81]. Por lo que también podrían estar participando en la regulación de la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas.

Por otro lado, una población importante que encontramos fue la de ISM1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>, cabe resaltar que las células CD105 son generalmente Sca-1<sup>+</sup>. Más del 90 % de las células ISM1<sup>+</sup> expresan ambas moléculas, parte de esta subpoblación además expresa además CD45<sup>+</sup> lo que las caracteriza como progenitores hematopoyéticos [199]. Una caracterización más profunda nos mostró que existen subpoblaciones ISM1<sup>+</sup> que son principalmente MPP3/4 y ST-HSC. Se ha reportado que los MPP3 dan origen a células linfoides y mieloides, mientras que los MPP4 preferentemente dan origen solo a células linfoides [33]. Las células ST-HSC son pluripotenciales, son las que han salido del estado de quiescencia y están listas para dividirse y diferenciarse [280]. Tomando en cuenta esto, es posible que ISM1 favorezca la diferenciación de ciertos tipos celulares sobre otros. Por tanto, se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar el efecto de ISM1 en la diferenciación de células hematopoyéticas. De forma interesante encontramos cierta tendencia a favorecer la producción células T sobre células B o de linaje mielóide. Es posible que lo observado en pez cebra [18] se traslade a mamíferos y que ISM1 sea un regulador de la hematopoyesis extramedular en pulmón.

Los mecanismos por los cuales ISM1 podría estar regulando la hematopoyesis aún son desconocidos; sin embargo, se conoce que ISM1 puede unirse a los receptores de activina y antagonizar las funciones de NODAL tanto *in vitro* como en embrión de pollo [185]. La vía de señalización de Activina/NODAL es parte de la superfamilia de TGF- $\beta$  (*Transforming growing factor beta*), la cual además de sus funciones en desarrollo posee efectos en la polarización y activación de macrófagos [173], en la proliferación de células T humanas [133], en la eritropoyesis [83, 239] y la decisión sobre linajes hematopoyéticos [41, 207]. Por otro lado, el receptor de alta afinidad de ISM1, GRP78 participa en la regulación de las HSPCs en la médula ósea mediante Cripto, una molécula que también forma parte de la vía Activina/NODAL [158]. En general, se requieren estudios más profundos para saber las vías de señalización que ISM1 afecta

en HSPCs. Esto podría dar pie a proyectos futuros que podrán enriquecer el conocimiento que se tiene sobre ISM1.

La inflamación aguda ocasionada por infecciones bacterianas o daño activa a las HSPCs en la médula ósea [115]. Mediadores inflamatorios como lo son: la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el IFN- $\alpha$ , el IFN- $\gamma$ , el TGF- $\beta$  o GM-CSF; regulan la proliferación de las HSPCs [12, 41, 61, 206, 258]. Sin embargo, se desconoce si las HSPCs de pulmón comparten la misma capacidad de respuesta a daño como lo son las que se encuentran en médula ósea. Nuestro modelo de infección sistémica sub-lethal con *P. aeruginosa* mostró que hay un incremento en la población total de LSK, similar al aumento de esta población en médula ósea, observado durante la infección con bacterias como *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis* y *E. muris* [107, 141, 218]. Así mismo, la subpoblación ISM1<sup>+</sup>LSK también mostró el mismo efecto, por lo tanto, es posible que ambas poblaciones tengan mecanismos similares para responder al daño por bacterias.

Actualmente sabemos que las células hematopoyéticas, maduras e inmaduras, pueden ser directamente estimuladas por PAMPs debido a la activación de PRRs, tales como los TLRs [23, 109]. Quisimos explorar si las poblaciones tipo progenitor hematopoyético de pulmón comparten la expresión de TLRs comunes en el tejido. Encontramos que las células ISM1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> co-expresan principalmente TLR9 y en menor proporción TLR4 y TLR5 [227]. En contraste, muy pocas ISM1<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> co-expresan los TLRs mencionados. Además, observamos que las células de pulmón responden al estímulo con los ligandos específicos de TLR9, TLR4 y TLR5 liberando ISM1<sup>+</sup>, sugiriendo que es parte de un mecanismo que regula el microambiente celular al existir un proceso inflamatorio. Es notable mencionar que la estimulación de TLRs afecta de manera diferencial a los subtipos de HSPCs. Algunas ST-HSCs y MPPs puede producir citocinas proinflamatorias después de ser estimuladas contribuyendo a la diferenciación de otras HSPCs [295]. Aunque la producción principal de citocinas proviene de células del sistema inmunológico maduras es importante considerar la secreción de HSPCs vecinas en el nicho troncal. Debido a que el modelo de infección utilizado provoca una respuesta sistémica similar a la sepsis en humanos [279]. Quisimos explorar si las células ISM1<sup>+</sup> de otros tejidos como médula ósea y sangre periférica re-

sultaron afectados por estrés celular. En general, encontramos una menor proporción de las células ISM1<sup>+</sup> en sangre periférica, incluso los niveles plasmáticos de ISM1 tras la infección se encontraron disminuidos. Esta última observación fue reproducible en seres humanos, tanto en aquellos con sepsis y bacteremia, así como en inflamación estéril e infección viral.

Adicionalmente, el receptor de mayor afinidad descrito para ISM1, GRP78, incrementa su expresión y su traslocación a superficie celular cuando hay daño por estrés mecánico o infecciones [21, 135, 198, 240, 274]. Recientemente se reportó que GRP78 se incrementa en la superficie de macrófagos alveolares tanto en humano como en ratón. Además, se describió ISM1 es una molécula necesaria para regular a estos macrófagos GRP78<sup>hi</sup>, ya que en ausencia de ISM1 se genera un modelo de enfisema pulmonar espontáneo [126]. Por lo que, es probable que uno de los motivos de la disminución de ISM1 en plasma se deba a que está siendo internalizada por el GRP78 en superficie de células como los macrófagos alveolares proinflamatorios [126] o células endoteliales [45]. Otra posibilidad es que la ISM1 se retenga en pulmón y se libere al líquido bronquioloalveolar como se ha reportado anteriormente [266]. En general, podemos sugerir que ISM1 forma parte de un sistema para regular el microambiente celular en el pulmón y en menor medida en circulación y médula ósea.

## 7. Conclusión

En conclusión, nuestro estudio muestra que ISM1 está intrínsecamente relacionado con células progenitoras en pulmón murino. Su fuerte asociación con estructuras mesodérmicas y sus efectos de soporte en las células hematopoyéticas respaldan esto.

Adicionalmente, los cambios encontrados en el modelo de infección resaltan un probable papel de ISM1 en la hematopoyesis de emergencia al responder a ligandos específicos de TLRs al poseer una correlación negativa con proteínas de fase aguda y promover la diferenciación de células T *in vitro*.

## 8. Perspectivas

1. Evaluar la señalización mediada por ISM1 en células con fenotipo troncal hematopoyético de pulmón *in vitro*.
2. Evaluar la respuesta transcripcional mediada por ISM1 en células con fenotipo troncal hematopoyético de pulmón *in vitro*.
3. Evaluar el efecto sistémico de rISM1, en las células con fenotipo troncal hematopoyético *ex vivo*.
4. Generar un modelo *knock-out* o *knock-down* de ISM1 en células con fenotipo troncal hematopoyético *in vitro*.
5. Evaluar el efecto de la disminución de ISM1 en células con fenotipo troncal hematopoyético *in vitro*.



## 9. Referencias

- [1] *CATALYST: Cytometry dATa anALYSis Tools* (2020), Bioconductor.
- [2] ABBAS, A., LICHTMAN, A., AND SHIV, P. *Inmunología celular y molecular*, 9th edition ed. Elsevier, 2018.
- [3] ABDULLA, M. A. J., YASSIN, M. A., ABDELRAZEK, M., MUDAWI, D., IBRAHIM, F., SOLIMAN, D. S., ELOMRI, H., NASHWAN, A. J., FERNIHOUGH, L., DE SANCTIS, V., AND SOLIMAN, A. T. A persistent cough as atypical clinical presentation of intrathoracic extramedullary hematopoiesis (EMH) in a female with thalassemia intermedia. *Acta Biomedica* 89, Suppl 2 (feb 2018), 41–46.
- [4] AKSOY, M. O., KIM, V., CORNWELL, W. D., ROGERS, T. J., KOSMIDER, B., BAHMED, K., BARRERO, C., MERALI, S., SHETTY, N., AND KELSEN, S. G. Secretion of the endoplasmic reticulum stress protein, GRP78, into the BALF is increased in cigarette smokers. *Respiratory research* 18, 1 (may 2017), 78.
- [5] ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., AND WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Science, Garland, New York, 2002.
- [6] ALWAY, S. E., MYERS, M. J., AND MOHAMED, J. S. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Frontiers in aging neuroscience* 6 (2014), 246.
- [7] AN, J., WENG, Y., HE, J., LI, Y., HUANG, S., CAI, S., AND ZHANG, J. Intrathoracic extramedullary hematopoiesis presenting as tumor-simulating lesions of the mediastinum in  $\alpha$ -thalassemia: A case report. *Oncology Letters* 10, 4 (oct 2015), 1993–1996.
- [8] ANTHONY, B. A., AND LINK, D. C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends in Immunology* 35, 1 (jan 2014), 32–37.
- [9] ASTUTI, I., AND YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 14, 4 (jul 2020), 407–412.

- [10] BALDANE, S., SIVGIN, S., KAYNAR, L., OZASLAN, E., YILDIRIM, A., CANOZ, O., AND ESER, B. Pulmonary Extramedullary Hematopoiesis Mimicking Plasmacytoma in a Patient with Multiple Myeloma. *Romanian Journal Of Internal Medicine* (2015).
- [11] BALDRIDGE, M. T., KING, K. Y., BOLES, N. C., WEKSBERG, D. C., AND GOODELL, M. A. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- $\gamma$  in response to chronic infection. *Nature* 465, 7299 (jun 2010), 793–797.
- [12] BALDRIDGE, M. T., KING, K. Y., AND GOODELL, M. A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends in Immunology* 32, 2 (feb 2011), 57–65.
- [13] BARLETTA, K. E., CAGNINA, R. E., WALLACE, K. L., RAMOS, S. I., MEHRAD, B., AND LINDEN, J. Leukocyte compartments in the mouse lung: Distinguishing between marginated, interstitial, and alveolar cells in response to injury. *Journal of Immunological Methods* 375, 1-2 (jan 2012), 100–110.
- [14] BARON, M. H., ISERN, J., AND FRASER, S. T. The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* 119, 21 (may 2012), 4828–4837.
- [15] BAUMANN, C. I., BAILEY, A. S., LI, W., FERKOWICZ, M. J., YODER, M. C., AND FLEMING, W. H. PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors. *Blood* (2004).
- [16] BENDER KIM, C. F., JACKSON, E. L., WOOLFENDEN, A. E., LAWRENCE, S., BABAR, I., VOGEL, S., CROWLEY, D., BRONSON, R. T., AND JACKS, T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* (2005).
- [17] BENMOHAMED, F., MEDINA, M., WU, Y. Z., MASCHALIDI, S., JOUVION, G., GUILLEMOT, L., CHIGNARD, M., MANOURY, B., AND TOUQUI, L. Toll-like receptor 9 deficiency protects mice against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *PLoS ONE* 9, 3 (mar 2014).

- [18] BERRUN, A., HARRIS, E., AND STACHURA, D. L. Isthmin 1 (*ism1*) is required for normal hematopoiesis in developing zebrafish. *PLoS ONE* (2018).
- [19] BHARAT, A., BHORADE, S. M., MORALES-NEBRED, L., MCQUATTIE-PIMENTEL, A. C., SOBERANES, S., RIDGE, K., DECAMP, M. M., MESTAN, K. K., PERLMAN, H., BUDINGER, G. R. S., AND MISHARIN, A. V. Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54, 1 (dec 2015), 147–149.
- [20] BIRBRAIR, A., AND FRENETTE, P. S. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1370, 1 (apr 2016), 82–96.
- [21] BIRUKOVA, A. A., SINGLETON, P. A., GAWLAK, G., TIAN, X., MIRZAPOIAZOVA, T., MAMBETSARIEV, B., DUBROVSKYI, O., OSKOLKOVA, O. V., BOCHKOV, V. N., AND BIRUKOV, K. G. GRP78 is a novel receptor initiating a vascular barrier protective response to oxidized phospholipids. *Molecular biology of the cell* 25, 13 (July 2014), 2006–2016.
- [22] BOETTCHER, S., GEROSA, R. C., RADPOUR, R., BAUER, J., AMPENBERGER, F., HEIKENWALDER, M., KOPF, M., AND MANZ, M. G. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* 124, 9 (aug 2014), 1393–1403.
- [23] BOIKO, J. R., AND BORGHESI, L. Hematopoiesis sculpted by pathogens: Toll-like receptors and inflammatory mediators directly activate stem cells. *Cytokine* 57, 1 (jan 2012), 1–8.
- [24] BOISSET, J.-C., VAN CAPPELLEN, W., ANDRIEU-SOLER, C., GALJART, N., DZIERZAK, E., AND ROBIN, C. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464, 7285 (2010), 116–120.
- [25] BORGER, J. G., LAU, M., AND HIBBS, M. L. The Influence of Innate Lymphoid Cells and Unconventional T Cells in Chronic Inflammatory Lung Disease. *Frontiers in Immunology* 0, JULY (2019), 1597.

- [26] BORGES, I., SENA, I., AZEVEDO, P., ANDREOTTI, J., ALMEIDA, V., PAIVA, A., SANTOS, G., GUERRA, D., PRAZERES, P., MESQUITA, L. L., SILVA, L. S. D. B., LEONEL, C., MINTZ, A., AND BIRBRAIR, A. Lung as a Niche for Hematopoietic Progenitors. *Stem Cell Reviews and Reports* 13, 5 (oct 2017), 567–574.
- [27] BOWLING, M. R., CAUTHEN, C. G., PERRY, C. D., PATEL, N. P., BERGMAN, S., LINK, K. M., SANE, A. C., AND CONFORTI, J. F. Pulmonary extramedullary hematopoiesis. *Journal of Thoracic Imaging* (2008).
- [28] BRAHAM, M. V. J., YIM, A. S. P. L., MATEOS, J. G., MINNEMA, M. C., DHERT, W. J. A., ÖNER, F. C., ROBIN, C., AND ALBLAS, J. A Human Hematopoietic Niche Model Supporting Hematopoietic Stem and Progenitor Cells In Vitro. *Advanced Healthcare Materials* 8, 10 (may 2019), 1801444.
- [29] BRYDER, D., ROSSI, D. J., AND WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *American Journal of Pathology* (2006).
- [30] BURBERRY, A., ZENG, M. Y., DING, L., WICKS, I., INOHARA, N., MORRISON, S. J., AND NÚÑEZ, G. Infection mobilizes hematopoietic stem cells through cooperative NOD-like receptor and toll-like receptor signaling. *Cell Host and Microbe* (2014).
- [31] BURGER, J. A., AND KIPPS, T. J. CXCR4: A key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 5 (mar 2006), 1761–1767.
- [32] BUTLER, J. M., NOLAN, D. J., VERTES, E. L., VARNUM-FINNEY, B., KOBAYASHI, H., HOOPER, A. T., SEANDEL, M., SHIDO, K., WHITE, I. A., KOBAYASHI, M., WITTE, L., MAY, C., SHAWBER, C., KIMURA, Y., KITAJEWSKI, J., ROSENWAKS, Z., BERNSTEIN, I. D., AND RAFII, S. Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 6, 3 (mar 2010), 251–264.
- [33] CABEZAS-WALLSCHEID, N., KLIMMECK, D., HANSSON, J., LIPKA, D. B., REYES, A., WANG, Q., WEICHENHAN, D., LIER, A., VON PALLESCHE, L., RENDERS, S., WÜNSCHE, P., ZEISBERGER, P., BROCKS,

- D., GU, L., HERRMANN, C., HAAS, S., ESSERS, M. A. G., BRORS, B., EILS, R., HUBER, W., MILSOM, M. D., PLASS, C., KRIJGSVELD, J., AND TRUMPP, A. Identification of Regulatory Networks in HSCs and Their Immediate Progeny via Integrated Proteome, Transcriptome, and DNA Methylation Analysis. *Cell Stem Cell* 15, 4 (oct 2014), 507–522.
- [34] CALVANI, R., JOSEPH, A.-M., AND BOSSOLA, M. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biological chemistry* 394, 3 (2013), 393–414.
- [35] CAO, D. B., AND WANG, Y. S. Gastrointestinal: Intrahepatic periportal masses with uncommon computed tomography patterns: Hepatic extramedullary hematopoiesis of primary myofibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* (2020).
- [36] CARDIER, J. E., AND BARBERÁ-GUILLEM, E. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 26, 1 (jul 1997), 165–175.
- [37] CASANOVA, E. A., BÜRKI, K., AND CINELLI, P. Molecular Mechanisms of Pluripotency in Murine Embryonic Stem Cells. *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis* (apr 2011).
- [38] CERUTTI, A., COLS, M., AND PUGA, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 13, 2 (jan 2013), 118–132.
- [39] CHAKKALAKAL, J., AND BRACK, A. Extrinsic Regulation of Satellite Cell Function and Muscle Regeneration Capacity during Aging. *Journal of stem cell research & therapy Suppl* 11 (2012), 001.
- [40] CHAKKALAKAL, J. V., JONES, K. M., BASSON, M. A., AND BRACK, A. S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* 490, 7420 (2012), 355–60.
- [41] CHALLEN, G. A., BOLES, N. C., CHAMBERS, S. M., AND GOODELL, M. A. Distinct Hematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGF- $\beta$ 1. *Cell Stem Cell* 6, 3 (mar 2010), 265–278.

- [42] CHALLIER, J. C., GALTIER, M., CORTEZ, A., BINTEIN, T., RABREAU, M., AND UZAN, S. Immunocytological evidence for hematopoiesis in the early human placenta. *Placenta* 26, 4 (apr 2005), 282–288.
- [43] CHEEMARLA, N. R., BAÑOS-LARA, M. D. R., NAIDU, S., AND GUERRERO-PLATA, A. Neutrophils regulate the lung inflammatory response via  $\gamma\delta$  T cell infiltration in an experimental mouse model of human metapneumovirus infection. *Journal of Leukocyte Biology* 101, 6 (jun 2017), 1383.
- [44] CHEN, M., QIU, T., WU, J., YANG, Y., WRIGHT, G. D., WU, M., AND GE, R. Extracellular anti-angiogenic proteins augment an endosomal protein trafficking pathway to reach mitochondria and execute apoptosis in HUVECs. *Cell Death and Differentiation* (2018).
- [45] CHEN, M., ZHANG, Y., YU, V. C., CHONG, Y. S., YOSHIOKA, T., AND GE, R. Isthmin targets cell-surface GRP78 and triggers apoptosis via induction of mitochondrial dysfunction. *Cell Death and Differentiation* 21, 5 (2014), 797–810.
- [46] CHOU, K. J., HSU, C. Y., HUANG, C. W., CHEN, H. Y., OU, S. H., CHEN, C. L., LEE, P. T., AND FANG, H. C. Secretome of Hypoxic Endothelial Cells Stimulates Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Enhance Alternative Activation of Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 12 (jun 2020), 4409.
- [47] CHUNG, J. B., SILVERMAN, M., AND MONROE, J. G. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in Immunology* 24, 6 (jun 2003), 342–348.
- [48] CHUTE, D. J., AND FOWLER, D. R. Fatal Hemothorax Due to Rupture of an Intrathoracic Extramedullary Hematopoietic Nodule. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 25, 1 (mar 2004), 74–77.
- [49] CONOR O'KEANE, J., WOLF, B. C., AND NEIMAN, R. S. The pathogenesis of splenic extramedullary hematopoiesis in metastatic carcinoma. *Cancer* 63, 8 (apr 1989), 1539–1543.

- [50] COOPER, M. D., AND ALDER, M. N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124, 4 (feb 2006), 815–822.
- [51] COWIN, P., ROWLANDS, T. M., AND HATSELL, S. J. Cadherins and catenins in breast cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 5 SPEC. ISS. (2005), 499–508.
- [52] CUSCHIERI, J., BULGER, E., GRINSELL, R., GARCIA, I., AND MAIER, R. V. Insulin regulates macrophage activation through activin A1. *Shock* 29, 2 (feb 2008), 285–290.
- [53] DING, L., SAUNDERS, T. L., ENIKOLOPOV, G., AND MORRISON, S. J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 7382 (2012), 457–462.
- [54] DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., DEANS, R. J., KEATING, A., PROCKOP, D. J., AND HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006).
- [55] DRAKE, L. Y., AND KITA, H. Group 2 innate lymphoid cells in the lung. *Advances in immunology* 124 (2014), 1–16.
- [56] DU, Y., GUO, M., WHITSETT, J. A., AND XU, Y. 'LungGENS': A web-based tool for mapping single-cell gene expression in the developing lung. *Thorax* 70, 11 (nov 2015), 1092–1094.
- [57] DU, Y., KITZMILLER, J. A., SRIDHARAN, A., PERL, A. K., BRIDGES, J. P., MISRA, R. S., PRYHUBER, G. S., MARIANI, T. J., BHATTACHARYA, S., GUO, M., POTTER, S. S., DEXHEIMER, P., ARONOW, B., JOBE, A. H., WHITSETT, J. A., AND XU, Y. Lung Gene Expression Analysis (LGEA): An integrative web portal for comprehensive gene expression data analysis in lung development. *Thorax* 72, 5 (jan 2017), 481–484.
- [58] ENDALE, M., AHLFELD, S., BAO, E., CHEN, X., GREEN, J., BESS, Z., WEIRAUCH, M. T., XU, Y., AND PERL, A. K. Temporal, spatial, and phenotypical changes of PDGFR $\alpha$  expressing fibroblasts during late lung development. *Developmental Biology* 425, 2 (may 2017), 161–175.

- [59] ESKAZAN, A. E., AR, M. C., AND BASLAR, Z. Intracranial extra-medullary hematopoiesis in patients with thalassemia: a case report and review of the literature. *Transfusion* 52, 8 (aug 2012), 1715–1720.
- [60] ESPÍN-PALAZÓN, R., STACHURA, D. L., CAMPBELL, C. A., GARCÍA-MORENO, D., DEL CID, N., KIM, A. D., CANDEL, S., MESEGUER, J., MULERO, V., AND TRAVER, D. Proinflammatory signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Cell* (2014).
- [61] ESSERS, M. A., OFFNER, S., BLANCO-BOSE, W. E., WAIBLER, Z., KALINKE, U., DUCHOSAL, M. A., AND TRUMPP, A. IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* (2009).
- [62] FAN, N., LAVU, S., HANSON, C. A., AND TEFFERI, A. Extramedullary hematopoiesis in the absence of myeloproliferative neoplasm: Mayo Clinic case series of 309 patients. *Blood Cancer Journal* 8, 12 (dec 2018), 119.
- [63] FAN, X., AND RUDENSKY, A. Y. Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell* (2016).
- [64] FANG, S., WEI, J., PENTINMIKKO, N., LEINONEN, H., AND SALVEN, P. Generation of Functional Blood Vessels from a Single c-kit<sup>+</sup> Adult Vascular Endothelial Stem Cell. *PLoS Biology* 10, 10 (oct 2012).
- [65] FERNÁNDEZ-GARCÍA, V., GONZÁLEZ-RAMOS, S., MARTÍN-SANZ, P., CASTRILLO, A., AND BOSCA, L. Contribution of Extramedullary Hematopoiesis to Atherosclerosis. The Spleen as a Neglected Hub of Inflammatory Cells. *Frontiers in Immunology* 11 (oct 2020), 2790.
- [66] FU, J., ZUBER, J., MARTINEZ, M., SHONTS, B., OBRADOVIC, A., WANG, H., LAU, S.-P., XIA, A., WAFFARN, E. E., FRANGAJ, K., SAVAGE, T. M., SIMPSON, M. T., YANG, S., GUO, X. V., MIRON, M., SENDA, T., ROGERS, K., RAHMAN, A., HO, S.-H., SHEN, Y., GRIESEMER, A., FARBER, D. L., KATO, T., AND SYKES, M. Human Intestinal Allografts Contain Functional Hematopoietic Stem and Progenitor Cells that Are Maintained by a Circulating Pool. *Cell stem cell* (nov 2018).



- [67] GARMY-SUSINI, B., AND VARNER, J. A. Circulating endothelial progenitor cells. *British journal of cancer* 93, 8 (oct 2005), 855–858.
- [68] GEKAS, C., DIETERLEN-LIÈVRE, F., ORKIN, S. H., AND MIKKOLA, H. K. A. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Developmental Cell* 8, 3 (mar 2005), 365–375.
- [69] GERMAIN, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology* 2, 5 (2002), 309–322.
- [70] GILLARD, G. O., SAENZ, S. A., HUSS, D. J., AND FONTENOT, J. D. Circulating innate lymphoid cells are unchanged in response to DAC HYP therapy. *Journal of Neuroimmunology* (2016).
- [71] GODIN, I. E., GARCIA-PORRERO, J. A., COUTINHO, A., DIETERLEN-LIÈVRE, F., AND MARCOS, M. A. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 6432 (1993), 67–70.
- [72] GOMEZ PERDIGUERO, E., KLAPPROTH, K., SCHULZ, C., BUSCH, K., AZZONI, E., CROZET, L., GARNER, H., TROUILLET, C., DE BRUIJN, M. F., GEISSMANN, F., AND RODEWALD, H. R. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* 518, 7540 (Feb. 2015), 547–551.
- [73] GONZALEZ-GRONOW, M., SELIM, M. A., PAPALAS, J., AND PIZZO, S. V. GRP78: A multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxidants and Redox Signaling* 11, 9 (2009), 2299–2306.
- [74] GOUGH, N. M., GOUGH, J., METCALF, D., KELSO, A., GRAIL, D., NICOLA, N. A., BURGESS, A. W., AND DUNN, A. R. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte—macrophage colony stimulating factor. *Nature* 309, 5971 (1984), 763–767.
- [75] GRITZ, E., AND HIRSCHI, K. K. Specification and function of hemogenic endothelium during embryogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, 8 (apr 2016), 1547–1567.

- [76] GUIA, S., AND NARNI-MANCINELLI, E. Helper-like Innate Lymphoid Cells in Humans and Mice. *Trends in Immunology* 41, 5 (may 2020), 436–452.
- [77] HA, D. P., VAN KRIEKEN, R., CARLOS, A. J., AND LEE, A. S. The stress-inducible molecular chaperone GRP78 as potential therapeutic target for coronavirus infection. *Journal of Infection* 81, 3 (sep 2020), 452–482.
- [78] HALL, M. W., AND MUSZYNSKI, J. A. Immune modulation in sepsis. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* (2009).
- [79] HANAZAWA, A., LÖHNING, M., RADBRUCH, A., AND TOKOYODA, K. CD49b/CD69-dependent generation of resting T helper cell memory. *Frontiers in Immunology* 4, JUL (2013), 183.
- [80] HASHMI, M., GUHA, S., SENGUPTA, P., BASU, D., NEHA, AND BABOO, S. Thoracic cord compression by extramedullary hematopoiesis in thalassemia. *Asian Journal of Neurosurgery* 9, 2 (2014), 102.
- [81] HE, H., XU, J., WARREN, C. M., DUAN, D., LI, X., WU, L., AND IRUELA-ARISPE, M. L. Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. *Blood* 120, 15 (oct 2012), 3152–3162.
- [82] HE, W., HOLTkamp, S., HERGENHAN, S. M., KRAUS, K., DE JUAN, A., WEBER, J., BRADFIELD, P., GRENIER, J. M. P., PELLETIER, J., DRUZD, D., CHEN, C.-S., INCE, L. M., BIRSCHENK, S., PICK, R., SPERANDIO, M., AURRAND-LIONS, M., AND SCHEIERMANN, C. Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity* 49, 6 (dec 2018), 1175–1190.e7.
- [83] HELDIN, C.-H., AND MOUSTAKAS, A. Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8, 8 (aug 2016).
- [84] HILLEL-KARNIEL, C., ROSEN, C., MILMAN-KRENTSIS, I., ORGAD, R., BACHAR-LUSTIG, E., SHEZEN, E., AND REISNER, Y. Multi-

lineage Lung Regeneration by Stem Cell Transplantation across Major Genetic Barriers. *Cell Reports* 30, 3 (jan 2020), 807—819.e4.

- [85] HOLMES, R., AND ZUÑIGA-PFLÜCKER, J. C. The OP9-DL1 system: Generation of T-lymphocytes from embryonic or hematopoietic stem cells in vitro. *Cold Spring Harbor Protocols* 4, 2 (feb 2009), pdb.prot5156.
- [86] HOU, Y. J., OKUDA, K., EDWARDS, C. E., MARTINEZ, D. R., ASAKURA, T., DINNON, K. H., KATO, T., LEE, R. E., YOUNT, B. L., MASCENIK, T. M., CHEN, G., OLIVIER, K. N., GHIO, A., TSE, L. V., LEIST, S. R., GRALINSKI, L. E., SCHÄFER, A., DANG, H., GILMORE, R., NAKANO, S., SUN, L., FULCHER, M. L., LIVRAGHI-BUTRICO, A., NICELY, N. I., CAMERON, M., CAMERON, C., KELVIN, D. J., DE SILVA, A., MARGOLIS, D. M., MARKMANN, A., BARTELT, L., ZUMWALT, R., MARTINEZ, F. J., SALVATORE, S. P., BORCZUK, A., TATA, P. R., SONTAKE, V., KIMPLE, A., JASPERS, I., O'NEAL, W. K., RANDELL, S. H., BOUCHER, R. C., AND BARIC, R. S. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* 182, 2 (jul 2020), 429—446.e14.
- [87] HSU, J., KRISHNAN, A., LEE, S. A., DODD-O, J. M., KIM, B. S., ILLEI, P., YARNOFF, K., HAMAD, A. A., RABB, H., AND BUSH, E. L. CD3+CD4–CD8– Double-negative  $\alpha\beta$  T cells attenuate lung ischemia-reperfusion injury. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 161, 1 (jan 2021), e81–e90.
- [88] HUERGO-ZAPICO, L., GONZALEZ-RODRIGUEZ, A. P., CONTESTI, J., GONZALEZ, E., LÓPEZ-SOTO, A., FERNANDEZ-GUIZAN, A., ACEBES-HUERTA, A., DE LOS TOYOS, J. R., LOPEZ-LARREA, C., GROH, V., SPIES, T., AND GONZALEZ, S. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: Association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61, 8 (aug 2012), 1201–1210.
- [89] HWANG, J. W., DESTERKE, C., LOISEL-DUWATTEZ, J., GRISCELLI, F., BENNACEUR-GRISCELLI, A., AND TURHAN, A. G. Detection of Hematopoietic Stem Cell Transcriptome in Human Fetal Kidneys and Kidney Organoids Derived From Human Induced Pluripo-

tent Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (jun 2021), 668833.

- [90] IBRAHIM, I. M., ABDELMALEK, D. H., ELSHAHAT, M. E., AND ELFIKY, A. A. COVID-19 spike-host cell receptor GRP78 binding site prediction. *Journal of Infection* 80, 5 (may 2020), 554–562.
- [91] IKONOMI, N., KÜHLWEIN, S. D., SCHWAB, J. D., AND KESTLER, H. A. Awakening the HSC: Dynamic Modeling of HSC Maintenance Unravels Regulation of the TP53 Pathway and Quiescence. *Frontiers in physiology* 11 (jul 2020), 848.
- [92] IMAI, Y., SHIMAOKA, M., AND KUROKAWA, M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *International Journal of Hematology* 91, 4 (mar 2010), 569–575.
- [93] INRA, C. N., ZHOU, B. O., ACAR, M., MURPHY, M. M., RICHARDSON, J., ZHAO, Z., AND MORRISON, S. J. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature* 527, 7579 (Nov. 2015), 466–471.
- [94] ITO, C., YAMAZAKI, H., AND YAMANE, T. Earliest hematopoietic progenitors at embryonic day 9 preferentially generate B-1 B cells rather than follicular B or marginal zone B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 437, 2 (jul 2013), 307–313.
- [95] ITO, C. Y., LI, C. Y. J., BERNSTEIN, A., DICK, J. E., AND STANFORD, W. L. Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. *Blood* (2003).
- [96] ITO, T., SCHALLER, M., RAYMOND, T., JOSHI, A. D., COELHO, A. L., FRANTZ, F. G., CARSON IV, W. F., HOGABOAM, C. M., LUKACS, N. W., STANDIFORD, T. J., PHAN, S. H., CHENSUE, S. W., AND KUNKEL, S. L. Toll-like receptor 9 activation is a key mechanism for the maintenance of chronic lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2009).
- [97] JAIN, M., RIVERA, S., MONCLUS, E. A., SYNENKI, L., ZIRK, A., EISENBART, J., FEGHALI-BOSTWICK, C., MUTLU, G. M., BUDINGER,

- G. R. S., AND CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- $\beta$  signaling. *The Journal of biological chemistry* 288, 2 (2013), 770–7.
- [98] JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., AND SHLOMCHIK., M. J. *Immunobiology*, 5th editio ed. Science, Garland, New York, 2017.
- [99] JANTUNEN, E., HÄNNINEN, A., NAUKKARINEN, A., VORNANEN, M., AND LAHTINEN, R. Gray platelet syndrome with splenomegaly and signs of extramedullary hematopoiesis: A case report with review of the literature. *American Journal of Hematology* 46, 3 (jul 1994), 218–224.
- [100] JINQUAN, T., QUAN, S., JACOBI, H. H., JING, C., MILLNER, A., JENSEN, B., MADSEN, H. O., RYDER, L. P., SVEJGAARD, A., MALLING, H. J., SKOV, P. S., AND POULSEN, L. K. CXCR3 chemokine receptor 3 expression on CD34(+) hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon gamma-inducible protein 10 and monokine . *Blood* 96, 4 (aug 2000), 1230–1238.
- [101] JORDAN, S., RUZSICS, Z., MITROVIĆ, M., BARANEK, T., ARAPOVIĆ, J., KRMPOTIĆ, A., VIVIER, E., DALOD, M., JONJIĆ, S., DÖLKEN, L., AND KOSZINOWSKI, U. H. Natural killer cells are required for extramedullary hematopoiesis following murine cytomegalovirus infection. *Cell Host and Microbe* 13, 5 (may 2013), 535–545.
- [102] JOSE, R. J., AND MANUEL, A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *The Lancet Respiratory Medicine* 8, 6 (jun 2020), e46—e47.
- [103] JX, W., AM, B., SL, K., R, S., YF, H., CC, S., RJ, S., RC, F., AND PA, N. Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a  $\beta$ 2-integrin-dependent mechanism. *Blood* 120, 7 (aug 2012), 1489–1498.
- [104] KASTRINAKI, M.-C., ANDREAKOU, I., CHARBORD, P., AND PAPADAKI, H. A. Isolation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Using Different Membrane Markers: Comparison of Colony/Cloning Efficiency, Differentiation Potential, and Molecular Profile. *Tissue Engineering Part C: Methods* 14, 4 (dec 2008), 333–339.

- [105] KATCHI, T., KOLANDAIVEL, K., KHATTAR, P., FAROOQ, T., ISLAM, H., AND LIU, D. Extramedullary hematopoiesis presented as cytopenia and massive paraspinal masses leading to cord compression in a patient with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Biomarker Research* 4, 1 (dec 2016), 17.
- [106] KATO, K., DIÉGUEZ-HURTADO, R., PARK, D. Y., HONG, S. P., KATO-AZUMA, S., ADAMS, S., STEHLING, M., TRAPPMANN, B., WRANA, J. L., KOH, G. Y., AND ADAMS, R. H. Pulmonary pericytes regulate lung morphogenesis. *Nature Communications* 9, 1 (jun 2018), 1–14.
- [107] KAUFMANN, E., SANZ, J., DUNN, J. L., KHAN, N., MENDONÇA, L. E., PACIS, A., TZELEPIS, F., PERNET, E., DUMAINE, A., GRENIER, J. C., MAILHOT-LÉONARD, F., AHMED, E., BELLE, J., BESLA, R., MAZER, B., KING, I. L., NIJNIK, A., ROBBINS, C. S., BARREIRO, L. B., AND DIVANGAHI, M. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 172, 1-2 (jan 2018), 176—190.e19.
- [108] KAWAHARA, R. Hematopoiesis. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (jan 2007), 1–5.
- [109] KAWAI, T., AND AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34, 5 (may 2011), 637–650.
- [110] KELBER, J. A., PANOPOULOS, A. D., SHANI, G., BOOKER, E. C., BELMONTE, J. C., VALE, W. W., AND GRAY, P. C. Blockade of Cripto binding to cell surface GRP78 inhibits oncogenic Cripto signaling via MAPK/PI3K and Smad2/3 pathways. *Oncogene* 28, 24 (May 2009), 2324–2336.
- [111] KIEL, M. J., AND MORRISON, S. J. Maintaining Hematopoietic Stem Cells in the Vascular Niche. *Immunity* 25, 6 (dec 2006), 862–864.

- [112] KIEL, M. J., YILMAZ, Ö. H., IWASHITA, T., YILMAZ, O. H., TERHORST, C., AND MORRISON, S. J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* (2005).
- [113] KIM, C. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of Blood Medicine* (2010).
- [114] KINA, T., IKUTA, K., TAKAYAMA, E., WADA, K., MAJUMDAR, A. S., WEISSMAN, I. L., AND KATSURA, Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *British Journal of Haematology* 109, 2 (2000), 280–287.
- [115] KING, K. Y., AND GOODELL, M. A. Inflammatory modulation of HSCs: Viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nature Reviews Immunology* 11, 10 (oct 2011), 685–692.
- [116] KLOSE, C. S. N., AND ARTIS, D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nature Immunology* (2016).
- [117] KOENITZER, J. R., WU, H., ATKINSON, J. J., BRODY, S. L., AND HUMPHREYS, B. D. Single-nucleus RNA-sequencing profiling of mouse lung reduced dissociation bias and improved rare cell-type detection compared with single-cell RNA sequencing. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 63, 6 (dec 2020), 739–747.
- [118] KOHARA, H., OMATSU, Y., SUGIYAMA, T., NODA, M., FUJII, N., AND NAGASAWA, T. Development of plasmacytoid dendritic cells in bone marrow stromal cell niches requires CXCL12-CXCR4 chemokine signaling. *Blood* 110, 13 (dec 2007), 4153–4160.
- [119] KONDO, M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunological Reviews* 238, 1 (nov 2010), 37–46.
- [120] KOTTON, D. N., FABIAN, A. J., AND MULLIGAN, R. C. A novel stem-cell population in adult liver with potent hematopoietic-reconstitution

activity. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* (2005).

- [121] KOTTON, D. N., SUMMER, R. S., SUN, X., MA, B. Y., AND FINE, A. Stem cell antigen-1 expression in the pulmonary vascular endothelium. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* (2003).
- [122] KRAUSGRUBER, T., FORTELNY, N., FIFE-GERNEDL, V., SENEKOWITSCH, M., SCHUSTER, L. C., LERCHER, A., NEMC, A., SCHMIDL, C., RENDEIRO, A. F., BERGTHALER, A., AND BOCK, C. Structural cells are key regulators of organ-specific immune response. *Nature* 583, 7815 (July 2020), 296.
- [123] KULKARNI, R., AND KALE, V. Physiological Cues Involved in the Regulation of Adhesion Mechanisms in Hematopoietic Stem Cell Fate Decision. *Frontiers in cell and developmental biology* 8 (jul 2020), 611.
- [124] KUMAR, A., AND VERFAILLIE, C. *Progenitor and Stem Cell Technologies and Therapiess* . Woodhead Publishing, 2012, ch. 6 - Basic principles of multipotent stem cells, pp. 100–117.
- [125] LA, V. T., DIATTE, M., GASTON, J., DICK, D., SWEISS, R., AND PAKBAZ, Z. Spinal cord compression due to extramedullary hematopoiesis in a patient with E-beta-thalassemia managed without radiation or surgery. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives* 8, 4 (jul 2018), 246–249.
- [126] LAM, T. Y., NGUYEN, N., PEH, H. Y., SHANMUGASUNDARAM, M., CHANDNA, R., TEE, J. H., ONG, C. B., HOSSAIN, M. Z., VENUGOPAL, S., ZHANG, T., XU, S., QIU, T., KONG, W. T., CHAKAROV, S., SRIVASTAVA, S., LIAO, W., KIM, J. S., TEH, M., GINHOUX, F., WONG, W. S., AND GE, R. ISM1 protects lung homeostasis via cell-surface GRP78-mediated alveolar macrophage apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119, 4 (jan 2022).
- [127] LANSDON, L. A., DARBRO, B. W., PETRIN, A. L., HULSTRAND, A. M., STANDLEY, J. M., BROUILLETTE, R. B., LONG, A., MANSILLA, M. A., CORNELL, R. A., MURRAY, J. C., HOUSTON, D. W.,



- AND MANAK, J. R. Identification of isthmin 1 as a novel clefting and craniofacial patterning gene in humans. *Genetics* (2018).
- [128] LARSSON, J., AND KARLSSON, S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24, 37 (aug 2005), 5676–5692.
- [129] LAWSON, K. A., AND PEDERSEN, R. A. Early Mesoderm formation in the Mouse Embryo. In *Formation and Differentiation of Early Embryonic Mesoderm*. Springer US, 1992, pp. 33–46.
- [130] LAXER, R. M., ROBERTS, E. A., GROSS, K. R., BRITTON, J. R., CUTZ, E., DIMMICK, J., PETTY, R. E., AND SILVERMAN, E. D. Liver disease in neonatal lupus erythematosus. *The Journal of Pediatrics* 116, 2 (feb 1990), 238–242.
- [131] LEFRANÇOIS, E., ORTIZ-MUÑOZ, G., CAUDRILLIER, A., MALLAVIA, B., LIU, F., SAYAH, D. M., THORNTON, E. E., HEADLEY, M. B., DAVID, T., COUGHLIN, S. R., KRUMMEL, M. F., LEAVITT, A. D., PASSEGUÉ, E., AND LOONEY, M. R. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* 544, 7648 (2017), 105–109.
- [132] LI, R., REDDY, V. V. B., AND PALMER, C. A. Extramedullary Hematopoiesis: An Unusual Finding in Subdural Hematomas. *Case Reports in Pathology* 2011 (2011), 1–3.
- [133] LICONA, P., CHIMAL-MONROY, J., AND SOLDEVILA, G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Developmental Dynamics* 235, 4 (apr 2006), 1124–1132.
- [134] LITVINOV, S. V., VELDEERS, M. P., BAKKER, H. A., FLEUREN, G. J., AND WARNAAR, S. O. Ep-CAM: A human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *Journal of Cell Biology* (1994).
- [135] LIU, Q., ZHAO, D., JI, Y.-X., HUANG, X.-Y., YANG, P., WANG, Y.-Z., AND LEI, T. Role of glucose-regulated protein 78 in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* 36, 2 (apr 2016), 168–173.

- [136] LUCKHEERAM, R. V., ZHOU, R., VERMA, A. D., AND XIA, B. CD4 +T cells: Differentiation and functions. *Clinical and Developmental Immunology* 2012 (2012).
- [137] LUND, T. C., GLASS, T. J., SOMANI, A., NAIR, S., TOLAR, J., NYQUIST, M., PATRINOSTRO, X., AND BLAZAR, B. R. Zebrafish stromal cells have endothelial properties and support hematopoietic cells. *Experimental Hematology* 40, 1 (2012), 61.
- [138] LYDYARD, P., WHELAN, A., AND FANGER, M. *Immunology*, 3th edition ed. Garland Science, New York, 2011.
- [139] LYNCH, L., O'DONOGHUE, D., DEAN, J., O'SULLIVAN, J., O'FARRELLY, C., AND GOLDEN-MASON, L. Detection and characterization of hemopoietic stem cells in the adult human small intestine. *Journal of immunology* 176, 9 (may 2006), 5199–5204.
- [140] M, R., SJ, R., TJ, C., SJ, A., J, R., TR, M., H, G., V, K., DEFOUGEROLLES AR, AND DJ, T. Collagen distribution and expression of collagen-binding alpha1beta1 (VLA-1) and alpha2beta1 (VLA-2) integrins on CD4 and CD8 T cells during influenza infection. *Journal of immunology* 178, 7 (apr 2007), 4506–4516.
- [141] MACNAMARA, K. C., ODURO, K., MARTIN, O., JONES, D. D., MCLAUGHLIN, M., CHOI, K., BORJESSON, D. L., AND WINSLOW, G. M. Infection-Induced Myelopoiesis during Intracellular Bacterial Infection Is Critically Dependent upon IFN- $\gamma$  Signaling. *The Journal of Immunology* 186, 2 (jan 2011), 1032–1043.
- [142] MAJKA, M., JANOWSKA-WIECZOREK, A., RATAJCZAK, J., EHRENMANN, K., PIETRZKOWSKI, Z., ANNA KOWALSKA, M., GEWIRTZ, A. M., EMERSON, S. G., AND RATAJCZAK, M. Z. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97, 10 (may 2001), 3075–3085.
- [143] MARTIN, THOMAS R; FREVERT, C. W. Innate immunity in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2, 5 (2005), 403–411.

- [144] MARTINEZ MENDIOLA, C. A. Identificación de una población residente de pulmón con características de troncalidad que expresa Isthmin 1, 2018.
- [145] MATTEI, T. A., HIGGINS, M., JOSEPH, F., AND MENDEL, E. Ectopic extramedullary hematopoiesis: Evaluation and treatment of a rare and benign paraspinal/epidural tumor. *Journal of Neurosurgery: Spine* 18, 3 (mar 2013), 236–242.
- [146] MCCULLOCH, E. A., AND TILL, J. E. The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice. *Radiation Research* 13, 1 (oct 1960), 115–125.
- [147] MCISAAC, S. M., STADNYK, A. W., AND LIN, T.-J. Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *Journal of Leukocyte Biology* 92, 5 (nov 2012), 977–985.
- [148] MCQUALTER, J. L., BROUARD, N., WILLIAMS, B., BAIRD, B. N., SIMS-LUCAS, S., YUEN, K., NILSSON, S. K., SIMMONS, P. J., AND BERTONCELLO, I. Endogenous Fibroblastic Progenitor Cells in the Adult Mouse Lung Are Highly Enriched in the Sca-1 Positive Cell Fraction. *Stem Cells* (2009).
- [149] MCQUALTER, J. L., YUEN, K., WILLIAMS, B., AND BERTONCELLO, I. Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2010).
- [150] MEDVINSKY, A. L., SAMOYLINA, N. L., MÜLLER, A. M., AND DZIERZAK, E. A. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 6432 (1993), 64–67.
- [151] MEDZHITOV, RUSLAN; JANEWAY, C. A. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 3 (Oct. 1997), 295–298.
- [152] MEGÍAS, J., YÁÑEZ, A., MORIANO, S., O’CONNOR, J.-E., GOZALBO, D., AND GIL, M.-L. Direct Toll-Like Receptor-Mediated Stimulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Occurs In Vivo and

Promotes Differentiation Toward Macrophages. *STEM CELLS* 30, 7 (jul 2012), 1486–1495.

- [153] MEHAL, A. S., MEENA, K., SINGH, R. B., AND SHAMBHARKAR, P. G. Movie genres and beyond: An analytical survey of classification techniques. *Proceedings of the 5th International Conference on Trends in Electronics and Informatics, ICOEI 2021* (jun 2021), 1193–1198.
- [154] MEHTA, P., MCAULEY, D. F., BROWN, M., SANCHEZ, E., TATTERSALL, R. S., AND MANSON, J. J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* 395, 10229 (mar 2020), 1033–1034.
- [155] MENDE, N., BASTOS, H. P., SANTORO, A., MAHBUBANI, K. T., CIAURRO, V., CALDERBANK, E. F., QUIROGA LONDOÑO, M., SHAM, K., MANTICA, G., MORISHIMA, T., MITCHELL, E., LIDONNICI, M. R., MEIER-ABT, F., HAYLER, D., JARDINE, L., CURD, A., HANIFFA, M., FERRARI, G., TAKIZAWA, H., WILSON, N. K., GÖTTGENS, B., SAEB-PARSY, K., FRONTINI, M., AND LAURENTI, E. Unique molecular and functional features of extramedullary hematopoietic stem and progenitor cell reservoirs in humans. *Blood* 139, 23 (06 2022), 3387–3401.
- [156] MENDT, M., AND CARDIER, J. E. Stromal-derived factor-1 and its receptor, CXCR4, are constitutively expressed by mouse liver sinusoidal endothelial cells: Implications for the regulation of hematopoietic cell migration to the liver during extramedullary hematopoiesis. *Stem Cells and Development* 21, 12 (Aug. 2012), 2142–2151.
- [157] METCALF, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 2 (2008), 485–491.
- [158] MIHARADA, K., KARLSSON, G., REHN, M., RÖRBY, E., SIVA, K., CAMMENGA, J., AND KARLSSON, S. Cripto Regulates Hematopoietic Stem Cells as a Hypoxic-Niche-Related Factor through Cell Surface Receptor GRP78. *Cell Stem Cell* 9, 4 (oct 2011), 330–344.
- [159] MIÑANA, M.-D., CARBONELL-UBEROS, F., MIRABET, V., MARÍN, S., AND ENCABO, A. IFATS Collection: Identification of Hemangioblasts

in the Adult Human Adipose Tissue. *STEM CELLS* 26, 10 (oct 2008), 2696–2704.

- [160] MIRANTES, C., PASSEGUÉ, E., AND PIETRAS, E. M. Pro-inflammatory cytokines: Emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Experimental Cell Research* 329, 2 (dec 2014), 248–254.
- [161] MITROULIS, I., KALAFATI, L., BORNHÄUSER, M., HAJISHENGALLIS, G., AND CHAVAKIS, T. Regulation of the Bone Marrow Niche by Inflammation. *Frontiers in Immunology* 11 (jul 2020).
- [162] MIZUNO, K., HIGUCHI, O., IHLE, J. N., AND NAKAMURA, T. Hepatocyte Growth Factor Stimulates Growth of Hematopoietic Progenitor Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194, 1 (jul 1993), 178–186.
- [163] MOHYUDDIN, G. R., AND YACOUB, A. Primary Myelofibrosis Presenting as Extramedullary Hematopoiesis in a Transplanted Liver Graft: Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Hematology* 2016 (2016), 1–3.
- [164] MONGA, V., AND SILVERMAN, M. Pulmonary extramedullary hematopoiesis involving the pulmonary artery. *Hematology Reports* 7, 1 (2015), 9–11.
- [165] MORAES, D. A., SIBOV, T. T., PAVON, L. F., ALVIM, P. Q., BONADIO, R. S., DA SILVA, J. R., PIC-TAYLOR, A., TOLEDO, O. A., MARTI, L. C., AZEVEDO, R. B., AND OLIVEIRA, D. M. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy* 7, 1 (jul 2016), 1–14.
- [166] MORCOS, M. N., SCHOEDEL, K. B., HOPPE, A., BEHRENDT, R., BASAK, O., CLEVERS, H. C., ROERS, A., AND GERBAULET, A. SCA-1 Expression Level Identifies Quiescent Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cell Reports* (2017).
- [167] MORRISON, S. J., AND SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 7483 (2014), 327–334.

- [168] MÜLLER, E., WANG, W., QIAO, W., BORNHÄUSER, M., ZANDSTRA, P. W., WERNER, C., AND POMPE, T. Distinguishing autocrine and paracrine signals in hematopoietic stem cell culture using a biofunctional microcavity platform. *Scientific Reports* 6, 1 (aug 2016), 1–12.
- [169] MULLER, W. A., WEIGL, S. A., DENG, X., AND PHILLIPS, D. M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *Journal of Experimental Medicine* 178, 2 (1993), 449–460.
- [170] MURAMOTO, G. G., CHEN, B., CUI, X., CHAO, N. J., AND CHUTE, J. P. Vascular Endothelial Cells Produce Soluble Factors That Mediate the Recovery of Human Hematopoietic Stem Cells after Radiation Injury. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 12, 5 (may 2006), 530–540.
- [171] NAGAI, Y., GARRETT, K. P., OHTA, S., BAHRUN, U., KOURO, T., AKIRA, S., TAKATSU, K., AND KINCADE, P. W. Toll-like Receptors on Hematopoietic Progenitor Cells Stimulate Innate Immune System Replenishment. *Immunity* 24, 6 (jun 2006), 801–812.
- [172] NAGASAWA, T., OMATSU, Y., AND SUGIYAMA, T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: The role of reticular cells. *Trends in Immunology* 32, 7 (jul 2011), 315–320.
- [173] NAKA, K., AND HIRAO, A. Regulation of hematopoiesis and hematological disease by TGF- $\beta$  family signaling molecules. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9, 9 (2017), 25.
- [174] NAVARRO, M., CRESPO, C., PÉREZ, L., MARTÍNEZ, C., GALANT, J., AND GONZÁLEZ, I. Massive intrahepatic extramedullary hematopoiesis in myelofibrosis. *Abdominal Imaging* 25, 2 (Mar. 2000), 184–186.
- [175] NEO, W. H., LIE-A-LING, M., FADLULLAH, M. Z. H., AND LACAUD, G. Contributions of Embryonic HSC-Independent Hematopoiesis to Organogenesis and the Adult Hematopoietic System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (feb 2021), 211.

- [176] NERVI, B., LINK, D. C., AND DIPERSIO, J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *Journal of Cellular Biochemistry* 99, 3 (oct 2006), 690–705.
- [177] NG, A. P., AND ALEXANDER, W. S. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell death discovery* 3 (2017), 17002.
- [178] NIE, Y., HAN, Y. C., AND ZOU, Y. R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine* 205, 4 (apr 2008), 777–783.
- [179] NISHIKAWA, S. I., NISHIKAWA, S., HIRASHIMA, M., MATSUYOSHI, N., AND KODAMA, H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 9 (1998), 1747–1757.
- [180] NODA, M., OMATSU, Y., SUGIYAMA, T., OISHI, S., FUJII, N., AND NAGASAWA, T. CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK-cell development in adult mice. *Blood* 117, 2 (Jan. 2011), 451–458.
- [181] OATLEY, M., BÖLÜKBASI, Ö. V., SVENSSON, V., SHVARTSMAN, M., GANTER, K., ZIRNGIBL, K., PAVLOVICH, P. V., MILCHEVSKAYA, V., FOTEVA, V., NATARAJAN, K. N., BAYING, B., BENES, V., PATIL, K. R., TEICHMANN, S. A., AND LANCRIN, C. Single-cell transcriptomics identifies CD44 as a marker and regulator of endothelial to haematopoietic transition. *Nature Communications* 11, 1 (dec 2020).
- [182] ODA, A., TEZUKA, T., UENO, Y., HOSODA, S., AMEMIYA, Y., NOTSU, C., KASAHARA, T., NISHIYAMA, C., AND GOITSUKA, R. Niche-induced extramedullary hematopoiesis in the spleen is regulated by the transcription factor *tlx1*. *Scientific Reports* 8, 1 (May 2018), 8308.
- [183] OGAWA, M., MATSUZAKI, Y., NISHIKAWA, S., HAYASHI, S. I., KUNISADA, T., SUDO, T., KINA, T., NAKAUCHI, H., AND NISHIKAWA, S. I. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine* 174, 1 (1991), 63–71.

- [184] OSAWA, M., HANADA, K. I., HAMADA, H., AND NAKAUCHI, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* (1996).
- [185] OSÓRIO, L., WU, X., WANG, L., JIANG, Z., NEIDECK, C., SHENG, G., AND ZHOU, Z. ISM1 regulates NODAL signaling and asymmetric organ morphogenesis during development. *Journal of Cell Biology* 218, 7 (July 2019), 2388–2402.
- [186] OSÓRIO, L., WU, X., AND ZHOU, Z. Distinct spatiotemporal expression of ISM1 during mouse and chick development. *Cell Cycle* (2014).
- [187] OZBUDAK, I. H., SHILO, K., HALE, S., AGUILERA, N. S., GALVIN, J. R., AND FRANKS, T. J. Alveolar Airspace and Pulmonary Artery Involvement by Extramedullary Hematopoiesis A Unique Manifestation of Myelofibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 132, 1 (jan 2008), 99–103.
- [188] PANG, J., TAYLOR, G. R., MUNROE, D. G., ISHAQUE, A., FUNG-LEUNG, W. P., LAU, C. Y., LIU, F. T., AND ZHOU, L. Characterization of the gene for the human high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) alpha-chain. *The Journal of Immunology* 151, 11 (1993).
- [189] PANIAGUA, R., NISTAL, M., SESMA, P., ÁLVAREZ-URÍA, M., FRAILE, B., ANADÓN, R., AND SAÉZ, F. J. Desarrollo embrionario. In *Desarrollo embrionario*, 4th ed. McGraw-Hill Education, New York, NY, aug 2017.
- [190] PAPAYANNOPOULOU, T., PRIESTLEY, G. V., NAKAMOTO, B., ZAFIROPOULOS, V., AND SCOTT, L. M. Molecular pathways in bone marrow homing: Dominant role of  $\alpha 4 \beta 1$  over  $\alpha 2 \beta 1$ -integrins and selectins. *Blood* (2001).
- [191] PARK, T. S., BHUTTO, I., ZIMMERLIN, L., HUO, J. S., NAGARIA, P., MILLER, D., RUFAlHAH, A. J., TALBOT, C., AGUILAR, J., GREBE, R., MERGES, C., REIJO-PERA, R., FELDMAN, R. A., RASSOOL, F., COOKE, J., LUTTY, G., AND ZAMBIDIS, E. T. Vascular progenitors from cord blood-derived induced pluripotent stem cells possess



augmented capacity for regenerating ischemic retinal vasculature. *Circulation* (2014).

- [192] PARKER, M. H. The altered fate of aging satellite cells is determined by signaling and epigenetic changes. *Frontiers in genetics* 6 (2015), 59.
- [193] PASSEGUÉ, E., AND ERNST, P. IFN-alpha wakes up sleeping hematopoietic stem cells. *Nature Medicine* 15, 6 (jun 2009), 612.
- [194] PAUNOVIĆ, M., VUKČEVIĆ, B., TERZIĆ, Z., MAGDELINIĆ, M., VUČKOVIĆ, L., RAONIĆ, J., BALŠIĆ, V., AND VUČINIĆ, J. CAVERNOUS HEMANGIOMA OF THE LIVER WITH EXTRAMEDULLARY HEMATOPOIESIS AND MALIGNANT CELLS EMBOLIZATION IN AN ELDERLY PATIENT: A CASE REPORT. *Acta Medica Medianae* 59, 2 (2020), 114–119.
- [195] PENG, C., CHEN, Y., SHAN, Y., ZHANG, H., GUO, Z., LI, D., AND LI, S. LSK derived LSK- cells have a high apoptotic rate related to survival regulation of hematopoietic and leukemic stem cells. *PLoS ONE* (2012).
- [196] PERA, E. M., KIM, J. I., MARTINEZ, S. L., BRECHNER, M., LI, S. Y., WESSELY, O., AND DE ROBERTIS, E. M. Isthmin is a novel secreted protein expressed as part of the Fgf-8 synexpression group in the *Xenopus* midbrain-hindbrain organizer. *Mechanisms of Development* (2002).
- [197] PERLIN, J. R., SPORRIJ, A., AND ZON, L. I. Blood on the tracks: hematopoietic stem cell-endothelial cell interactions in homing and engraftment. *Journal of Molecular Medicine* 95, 8 (aug 2017), 809–819.
- [198] PFAFFENBACH, K. T., AND LEE, A. S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress. *Current Opinion in Cell Biology* (2011).
- [199] PIERELLI, L., BONANNO, G., RUTELLA, S., MARONE, M., SCAMBIA, G., AND LEONE, G. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia and Lymphoma* 42, 6 (2001), 1195–1206.

- [200] PIETRAS, E. M., REYNAUD, D., KANG, Y. A., CARLIN, D., CALERONIETO, F. J., LEAVITT, A. D., STUART, J. A., GÖTTGENS, B., AND PASSEGUÉ, E. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17, 1 (2015), 35–46.
- [201] PINATO, D. J., TAN, W., AND GATELY, A. An unexpected cause of pulmonary cannonball lesion. *Journal of Thoracic Oncology* 9, 2 (feb 2014), 259.
- [202] POPESCU, D. M., BOTTING, R. A., STEPHENSON, E., GREEN, K., WEBB, S., JARDINE, L., CALDERBANK, E. F., POLANSKI, K., GOH, I., EFREMOVA, M., ACRES, M., MAUNDER, D., VEGH, P., GITTON, Y., PARK, J. E., VENTO-TORMO, R., MIAO, Z., DIXON, D., ROWELL, R., McDONALD, D., FLETCHER, J., POYNER, E., REYNOLDS, G., MATHER, M., MOLDOVAN, C., MAMANOVA, L., GREIG, F., YOUNG, M. D., MEYER, K. B., LISGO, S., BACARDIT, J., FULLER, A., MILLAR, B., INNES, B., LINDSAY, S., STUBBINGTON, M. J., KOWALCZYK, M. S., LI, B., ASHENBERG, O., TABAKA, M., DIONNE, D., TICKLE, T. L., SLYPER, M., ROZENBLATT-ROSEN, O., FILBY, A., CAREY, P., VILLANI, A. C., ROY, A., REGEV, A., CHÉDOTAL, A., ROBERTS, I., GÖTTGENS, B., BEHJATI, S., LAURENTI, E., TEICHMANN, S. A., AND HANIFFA, M. Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature* 574, 7778 (Oct. 2019), 365–371.
- [203] POPESCU, L. M., GHERGHICEANU, M., SUCIU, L. C., MANOLE, C. G., AND HINESCU, M. E. Telocytes and putative stem cells in the lungs: Electron microscopy, electron tomography and laser scanning microscopy. *Cell and Tissue Research* (2011).
- [204] PORTER, R. L., GEORGER, M. A., BROMBERG, O., MCGRATH, K. E., FRISCH, B. J., BECKER, M. W., AND CALVI, L. M. Prostaglandin E2 increases hematopoietic stem cell survival and accelerates hematopoietic recovery after radiation injury. *Stem Cells* 31, 2 (feb 2013), 372–383.
- [205] PRASANNA, S. J., GOPALAKRISHNAN, D., SHANKAR, S. R., AND VASANDAN, A. B. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton

- Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. *PLoS ONE* 5, 2 (feb 2010), e9016.
- [206] PRONK, C. J. H., VEIBY, O. P., BRYDER, D., AND JACOBSEN, S. E. W. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: Involvement of two distinct receptors. *Journal of Experimental Medicine* 208, 18 (aug 2011), 1563–1570.
- [207] RAMOS-MEJIA, V., MELEN, G. J., SANCHEZ, L., GUTIERREZ-ARANDA, I., LIGERO, G., CORTES, J. L., REAL, P. J., BUENO, C., AND MENENDEZ, P. Nodal/activin signaling predicts human pluripotent stem cell lines prone to differentiate toward the hematopoietic lineage. *Molecular Therapy* 18, 12 (2010), 2173–2181.
- [208] RAOUST, E., BALLOY, V., GARCIA-VERDUGO, I., TOUQUI, L., RAMPHAL, R., AND CHIGNARD, M. Pseudomonas aeruginosa LPS or Flagellin Are Sufficient to Activate TLR-Dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 4, 10 (oct 2009), e7259.
- [209] REBEL, V. I., HARTNETT, S., HILL, G. R., LAZO-KALLANIAN, S. B., FERRARA, J. L., AND SIEFF, C. A. Essential role for the p55 tumor necrosis factor receptor in regulating hematopoiesis at a stem cell level. *The Journal of experimental medicine* 190, 10 (nov 1999), 1493–1503.
- [210] REILLY, E. C., EMO, K. L., BUCKLEY, P. M., REILLY, N. S., SMITH, I., CHAVES, F. A., YANG, H., OAKES, P. W., AND TOPHAM, D. J. TRM integrins CD103 and CD49a differentially support adherence and motility after resolution of influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117, 22 (2020), 12306–12314.
- [211] RIDER, D. A., NALATHAMBY, T., NURCOMBE, V., AND COOL, S. M. Selection using the alpha-1 integrin (CD49a) enhances the multipotentiality of the mesenchymal stem cell population from heterogeneous bone marrow stromal cells. *Journal of Molecular Histology* 38, 5 (aug 2007), 449–458.
- [212] RISAU, W. Differentiation of endothelium. *The FASEB Journal* (1995).

- [213] RIVERA-TORRUCO, G., MARTÍNEZ-MENDIOLA, C. A., ANGELES-FLORIANO, T., JAIMES-ORTEGA, G. A., MARAVILLAS-MONTERO, J. L., GARCÍA-CONTRERAS, R., GONZÁLEZ, Y., JUÁREZ, E., NAVA, P., ORTIZ-NAVARRETE, V., MEDINA-CONTRERAS, O., LICONA-LIMÓN, P., AND VALLE-RIOS, R. Isthmin 1 is Expressed by Progenitor-Like Cells in the Lung: Phenotypical Analysis of Isthmin 1+ Hematopoietic Stem-Like Cells in Homeostasis and during Infection. *Journal of Immunology Research* 2022 (apr 2022), 1–13.
- [214] ROBERTS, A. S., SHETTY, A. S., MELLNICK, V. M., PICKHARDT, P. J., BHALLA, S., AND MENIAS, C. O. Extramedullary haematopoiesis: radiological imaging features. *Clinical Radiology* 71, 9 (sep 2016), 807–814.
- [215] ROBIN, C., BOLLEROT, K., MENDES, S., HAAK, E., CRISAN, M., CERISOLI, F., LAUW, I., KAIMAKIS, P., JORNA, R., VERMEULEN, M., KAYSER, M., VAN DER LINDEN, R., IMANIRAD, P., VERSTEGEN, M., NAWAZ-YOUSAF, H., PAPAZIAN, N., STEEGERS, E., CUPEDO, T., AND DZIERZAK, E. Human Placenta Is a Potent Hematopoietic Niche Containing Hematopoietic Stem and Progenitor Cells throughout Development. *Cell Stem Cell* 5, 4 (oct 2009), 385–395.
- [216] ROBINSON, C., BOYCE, A. M., ESTRADA, A., KLEINER, D. E., MATHEW, R., STANTON, R., FRANGOUL, H., AND COLLINS, M. T. Bone marrow failure and extramedullary hematopoiesis in McCune-Albright syndrome. *Osteoporosis International* 29, 1 (jan 2018), 237–241.
- [217] ROCK, K. L., FARFÁN-ARRIBAS, D. J., AND SHEN, L. Proteases in MHC Class I Presentation and Cross-Presentation. *The Journal of Immunology* 184, 1 (jun 2010), 9–15.
- [218] RODRIGUEZ, S., CHORA, A., GOUMNEROV, B., MUMAW, C., GOEBEL, W. S., FERNANDEZ, L., BAYDOUN, H., HOGENSECH, H., DOMBKOWSKI, D. M., KARLEWICZ, C. A., RICE, S., RAHME, L. G., AND CARLESSO, N. Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood* (2009).

- [219] ROLANDSSON, S., ANDERSSON SJÖLAND, A., BRUNE, J. C., LI, H., KASSEM, M., MERTENS, F., WESTERGREN, A., ERIKSSON, L., HANSSON, L., SKOG, I., BJERMER, L., SCHEDING, S., AND WESTERGREN-THORSSON, G. Primary mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells. *BMJ Open Respiratory Research* 1, 1 (may 2014).
- [220] ROSE, S., MISHARIN, A., AND PERLMAN, H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry Part A* 81 A, 4 (apr 2012), 343–350.
- [221] ROSS, E. A., FREEMAN, S., ZHAO, Y., DHANJAL, T. S., ROSS, E. J., LAX, S., AHMED, Z., HOU, T. Z., KALIA, N., EGGINTON, S., NASH, G., WATSON, S. P., FRAMPTON, J., AND BUCKLEY, C. D. A Novel Role for PECAM-1 (CD31) in Regulating Haematopoietic Progenitor Cell Compartmentalization between the Peripheral Blood and Bone Marrow. *PLoS ONE* (2008).
- [222] ROSSI, V., BEFFAGNA, G., RAMPAZZO, A., BAUCE, B., AND DANIELI, G. A. TAIL1: An isthmin-like gene, containing type 1 thrombospondin-repeat and AMOP domain, mapped to ARVD1 critical region. *Gene* (2004).
- [223] RUMI, E., PASSAMONTI, F., BOVERI, E., DE AMICI, M., ASTORI, C., BRASCHI, M., CASTAGNOLA, C., MAGRINI, U., CAZZOLA, M., AND LAZZARINO, M. Dyspnea secondary to pulmonary hematopoiesis as presenting symptom of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *American Journal of Hematology* 81, 2 (feb 2006), 124–127.
- [224] RYAN, M. J., DUDASH, H. J., DOCHERTY, M., GERONILLA, K. B., BAKER, B. A., HAFF, G. G., CUTLIP, R. G., AND ALWAY, S. E. Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental gerontology* 45, 11 (2010), 882–95.
- [225] RYBTSOV, S., SOBIESIAK, M., TAUDI, S., SOUILHOL, C., SENSERRICH, J., LIAKHOVITSKAIA, A., IVANOV, A., FRAMPTON, J., ZHAO, S., AND MEDVINSKY, A. Hierarchical organization and early

hematopoietic specification of the developing HSC lineage in the AGM region. *Journal of Experimental Medicine* 208, 6 (jun 2011), 1305–1315.

- [226] SABATINI, F., PETECCHIA, L., TAVIAN, M., DE VILLEROCHÉ, V. J., ROSSI, G. A., AND BROUTY-BOYÉ, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Laboratory Investigation* 2005 85:8 85, 8 (may 2005), 962–971.
- [227] SATO, R., REUTER, T., HIRANUMA, R., SHIBATA, T., FUKUI, R., MO-TOI, Y., MURAKAMI, Y., TSUKAMOTO, H., YAMAZAKI, S., LIU, K., SAITOH, S. I., LATZ, E., AND MIYAKE, K. The impact of cell maturation and tissue microenvironments on the expression of endosomal Toll-like receptors in monocytes and macrophages. *International Immunology* 32, 12 (dec 2020), 785–798.
- [228] SATO, S., ONO, N., STEEBER, D. A., PISETSKY, D. S., AND TEDDER, T. F. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *The Journal of Immunology* 157, 10 (1996).
- [229] SATO, S., TAMAI, Y., OKADA, S., KANNBE, E., TAKEDA, K., AND TANAKA, E. Atraumatic Splenic Rupture Due to Ectopic Extramedullary Hematopoiesis after Autologous Stem Cell Transplantation in a Patient with AL Amyloidosis. *Intern Med* 57 (2018), 399–402.
- [230] SCHNEIDER, E., MOREAU, G., ARNOULD, A., VASSEUR, F., KHODABACCUS, N., DY, M., AND EZINE, S. Increased fetal and extramedullary hematopoiesis in Fas-deficient C57BL/6-lpr/lpr mice. *Blood* 94, 8 (oct 1999), 2613–2621.
- [231] SCHNIEDERMANN, J., RENNECKE, M., BUTTLER, K., RICHTER, G., STÄDTLER, A. M., NORGALL, S., BADAR, M., BARLEON, B., MAY, T., WILTING, J., AND WEICH, H. A. Mouse lung contains endothelial progenitors with high capacity to form blood and lymphatic vessels. *BMC Cell Biology* 11, 1 (July 2010), 1–13.
- [232] SCHÜRCH, C. M., RIETHER, C., AND OCHSENBEIN, A. F. Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cy-

tokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell* 14, 4 (apr 2014), 460–472.

- [233] SCUMPIA, P. O., KELLY-SCUMPIA, K. M., DELANO, M. J., WEINSTEIN, J. S., CUENCA, A. G., AL-QURAN, S., BOVIO, I., AKIRA, S., KUMAGAI, Y., AND MOLDAWER, L. L. Cutting Edge: Bacterial Infection Induces Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion in the Absence of TLR Signaling. *The Journal of Immunology* 184, 5 (mar 2010), 2247–2251.
- [234] SEITA, J., AND WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cell: Self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 2, 6 (nov 2010), 640–653.
- [235] SERNA, N. L. Intestino primitivo: desarrollo pulmonar. In *Intestino primitivo: desarrollo pulmonar*. McGraw-Hill Education, New York, NY, aug 2015.
- [236] SEZAKI, M., HAYASHI, Y., WANG, Y., JOHANSSON, A., UMEMOTO, T., AND TAKIZAWA, H. Immuno-Modulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Inflammation. *Frontiers in Immunology* 11 (Nov. 2020).
- [237] SHEN, J., ZHENG, J., SAXENA, R., ZHANG, C. C., AND TANG, L. Novel source of human hematopoietic stem cells from peritoneal dialysis effluents. *Stem Cell Research* 15, 2 (sep 2015), 299–304.
- [238] SHIMONY, N., CAGNANO, E., AND KANNER, A. A. Extramedullary hematopoiesis presenting as spontaneous recurrent chronic subdural hematoma: Case report and review of the literature. *Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management* 14 (dec 2018), 47–49.
- [239] SHIOZAKI, M., SAKAI, R., TABUCHI, M., NAKAMURA, T., SUGINO, K., SUGINO, H., AND ETO, Y. Evidence for the participation of endogenous activin A/erythroid differentiation factor in the regulation of erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5 (mar 1992), 1553–1556.
- [240] SHUMILOV, E., BACHER, U., PERSKE, C., MOHR, A., EIFFERT, H., HASENKAMP, J., TRUMPER, L., WULF, G. G., STROBEL, P.,

- IBRAHIM, A. S., AND VENKATARAMANI, V. In Situ Validation of the Endothelial Cell Receptor GRP78 in a Case of Rhinocerebral Mucormycosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62, 5 (may 2018).
- [241] SINCLAIR, K., YERKOVICH, S. T., AND CHAMBERS, D. C. Mesenchymal stem cells and the lung. *Respirology* 18, 3 (apr 2013), 397–411.
- [242] SINGER, A., AND QUENCER, R. Intracranial Extramedullary Hematopoiesis: A Rare Cause of Headaches. *Journal of Neuroimaging* 24, 5 (sep 2014), 524–527.
- [243] SIRACUSA, M. C., SAENZ, S. A., TAIT WOJNO, E. D., KIM, B. S., OSBORNE, L. C., ZIEGLER, C. G., BENITEZ, A. J., RUYMANN, K. R., FARBER, D. L., SLEIMAN, P. M., HAKONARSON, H., CIANFERONI, A., WANG, M. L., SPERGEL, J. M., COMEAU, M. R., AND ARTIS, D. Thymic Stromal Lymphopoietin-Mediated Extramedullary Hematopoiesis Promotes Allergic Inflammation. *Immunity* 39, 6 (dec 2013), 1158–1170.
- [244] SNIPPERT, H. J., HAEGEBARTH, A., KASPER, M., JAKS, V., VAN ES, J. H., BARKER, N., VAN DE WETERING, M., VAN DEN BORN, M., BEGTHEL, H., VRIES, R. G., STANGE, D. E., TOFTGARD, R., AND CLEVERS, H. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science* 327, 5971 (mar 2010), 1385–1389.
- [245] SOARES-DA SILVA, F., PEIXOTO, M., CUMANO, A., AND PINTO-DO Ó, P. Crosstalk Between the Hepatic and Hematopoietic Systems During Embryonic Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (jul 2020), 612.
- [246] SPANGRUDE, G. J., HEIMFELD, S., AND WEISSMAN, I. L. Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Science* 241, 4861 (1988), 58–62.
- [247] SPROSTON, N. R., AND ASHWORTH, J. J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology* 9, APR (apr 2018), 754.



- [248] STARON, M., YANG, Y., LIU, B., LI, J., SHEN, Y., ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C., AGUILA, H. L., GOLDSCHNEIDER, I., AND LI, Z. gp96, an endoplasmic reticulum master chaperone for integrins and Toll-like receptors, selectively regulates early T and B lymphopoiesis. *Blood* 115, 12 (mar 2010), 2380–2390.
- [249] SUGIYAMA, T., KOHARA, H., NODA, M., AND NAGASAWA, T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* 25, 6 (2006), 977–988.
- [250] SWARR, D. T., AND MORRISEY, E. E. Lung Endoderm Morphogenesis: Gasping for Form and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2015).
- [251] TAGHIZADEH, R. R., CETRULO, K. J., AND CETRULO, C. L. Collagenase Impacts the Quantity and Quality of Native Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived during Processing of Umbilical Cord Tissue. *Cell Transplantation* 27, 1 (Jan. 2018), 181–193.
- [252] TAKAMURA, S., YAGI, H., HAKATA, Y., MOTOZONO, C., MCMASTER, S. R., MASUMOTO, T., FUJISAWA, M., CHIKAISHI, T., KOMEDA, J., ITOH, J., UMEMURA, M., KYUSAI, A., TOMURA, M., NAKAYAMA, T., WOODLAND, D. L., KOHLMEIER, J. E., AND MIYAZAWA, M. Specific niches for lung-resident memory CD8  $\gamma$ <sup>+</sup> $\delta$ <sup>+</sup> T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. *The Journal of Experimental Medicine* (2016).
- [253] TAVIAN, M., HALLAIS, M. F., AND PÉAULT, B. Emergence of intra-embryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 126, 4 (1999), 793–803.
- [254] TAVIAN, M., AND PÉAULT, B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *The International journal of developmental biology* 49, 2-3 (2005), 243–250.
- [255] TAVIAN, M., ROBIN, C., COULOMBEL, L., AND PÉAULT, B. The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: Mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* 15, 3 (sep 2001), 487–495.

- [256] THET, T. T., NA, J. C., AND KHOO, C. S. Aspect-based sentiment analysis of movie reviews on discussion boards. *Journal of Information Science* 36, 6 (dec 2010), 823–848.
- [257] THOMAS, J., LIU, F., AND LINK, D. C. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Current Opinion in Hematology* 9, 3 (may 2002), 183–189.
- [258] TIE, R., LI, H., CAI, S., LIANG, Z., SHAN, W., WANG, B., TAN, Y., ZHENG, W., AND HUANG, H. Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Experimental and Molecular Medicine* 51, 10 (oct 2019), 1–12.
- [259] TOBIN, S. W., ALIBHAI, F. J., WEISEL, R. D., AND LI, R. K. Considering Cause and Effect of Immune Cell Aging on Cardiac Repair after Myocardial Infarction. *Cells* 9, 8 (aug 2020).
- [260] TÖRO, K., HUBAY, M., AND KELLER, É. Extramedullary haematopoiesis in liver of sudden infant death cases. *Forensic Science International* 170, 1 (jul 2007), 15–19.
- [261] TORRELLES, J. B., AND SCHLESINGER, L. S. Integrating Lung Physiology, Immunology, and Tuberculosis. *Trends in Microbiology* 25, 8 (aug 2017), 688–697.
- [262] UCCELLI, A., MORETTA, L., AND PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 8, 9 (Sept. 2008), 726–736.
- [263] ULIANICH, L., AND INSABATO, L. Endoplasmic reticulum stress in endometrial cancer. *Frontiers in Medicine* 1, DEC (2014).
- [264] UPADHYAY, G. Emerging Role of Lymphocyte Antigen-6 Family of Genes in Cancer and Immune Cells. *Frontiers in Immunology* 10 (apr 2019), 819.
- [265] VALLE-RIOS, R., MARAVILLAS-MONTERO, J. L., BURKHARDT, A. M., MARTINEZ, C., BUHREN, B. A., HOMEY, B., GERBER, P. A., ROBINSON, O., HEVEZI, P., AND ZLOTNIK, A. Isthmin 1 Is a Secreted Protein Expressed in Skin, Mucosal Tissues, and NK, NKT, and Th17 Cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research* (2014).

- [266] VENUGOPAL, S., CHEN, M., LIAO, W., ER, S. Y., WONG, W. S. F., AND GE, R. Isthmin is a novel vascular permeability inducer that functions through cell-surface GRP78-mediated Src activation. *Cardiovascular Research* (2015).
- [267] VERDONK, F., BLET, A., AND MEBAZAA, A. The new sepsis definition: Limitations and contribution to research and diagnosis of sepsis. *Current Opinion in Anaesthesiology* (2017).
- [268] VIVIER, E., ARTIS, D., COLONNA, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J. P., EBERL, G., KOYASU, S., LOCKSLEY, R. M., MCKENZIE, A. N. J., MEBIUS, R. E., POWRIE, F., AND SPITS, H. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 5 (aug 2018), 1054–1066.
- [269] VODYANIK, M. A., YU, J., ZHANG, X., TIAN, S., STEWART, R., THOMSON, J. A., AND SLUKVIN, I. I. A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells. *Cell stem cell* 7, 6 (dec 2010), 718.
- [270] WANG, A., CARBERRY, N., SOLLI, E., GILLICK, J., ISLAM, H., AND HILLARD, V. Spinal Cord Compression Secondary to Extramedullary Hematopoiesis: Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Oncology* 9, 2 (2016), 290–297.
- [271] WANG, C., HORBY, P. W., HAYDEN, F. G., AND GAO, G. F. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet* 395, 10223 (feb 2020), 470–473.
- [272] WANG, D., HU, B., HU, C., ZHU, F., LIU, X., ZHANG, J., WANG, B., XIANG, H., CHENG, Z., XIONG, Y., ZHAO, Y., LI, Y., WANG, X., AND PENG, Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 323, 11 (Mar. 2020), 1061–1069.
- [273] WANG, K., WEI, G., AND LIU, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology* 1, 1 (2012), 36.
- [274] WANG, S., LONGO, F. M., CHEN, J., BUTMAN, M., GRAHAM, S. H., HAGLID, K. G., AND SHARP, F. R. Induction of glucose regulated

protein (grp78) and inducible heat shock protein (hsp70) mRNAs in rat brain after kainic acid seizures and focal ischemia. *Neurochemistry International* (1993).

- [275] WEIDINGER, G., THORPE, C. J., WUENNENBERG-STAPLETON, K., NGAI, J., AND MOON, R. T. The Sp1-Related Transcription Factors sp5 and sp5-like Act Downstream of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mesoderm and Neuroectoderm Patterning. *Current Biology* 15, 6 (mar 2005), 489–500.
- [276] WEISSMAN, I. L. Clonal Origins of the Hematopoietic System: The Single Most Elegant Experiment. *The Journal of Immunology* 192, 11 (jun 2014), 4943–4944.
- [277] WEY, S., LUO, B., AND LEE, A. S. Acute Inducible Ablation of GRP78 Reveals Its Role in Hematopoietic Stem Cell Survival, Lymphogenesis and Regulation of Stress Signaling. *PLoS ONE* 7, 6 (2012), 39047.
- [278] WIENER, M. D., HALVORSEN, R. A., VOLLMER, R. T., FOSTER, W. L., AND ROBERTS, L. Focal intrahepatic extramedullary hematopoiesis mimicking neoplasm. *American Journal of Roentgenology* 149, 6 (1987), 1171–1172.
- [279] WIERSINGA, W. J., LEOPOLD, S. J., CRANENDONK, D. R., AND VAN DER POLL, T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 5, 1 (2014), 36–44.
- [280] WILSON, A., OSER, G. M., JAWORSKI, M., BLANCO-BOSE, W. E., LAURENTI, E., ADOLPHE, C., ESSERS, M. A., MACDONALD, H. R., AND TRUMPP, A. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2007).
- [281] WOLF, N. S., KONÉ, A., PRIESTLEY, G. V., AND BARTELMEZ, S. H. In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Experimental hematology* 21, 5 (may 1993), 614–622.

- [282] WONG, S. H., HAMEL, L., CHEVALIER, S., AND PHILIP, A. Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF- $\beta$  signalling receptors. *European Journal of Biochemistry* 267, 17 (2000), 5550–5560.
- [283] WORRELL, J. C., AND MACLEOD, M. K. Stromal–immune cell cross-talk fundamentally alters the lung microenvironment following tissue insult. *Immunology* 163, 3 (jul 2021), 239.
- [284] XIANG, W., KE, Z., ZHANG, Y., HO-YUET CHENG, G., IRWAN, I. D., SULOCHANA, K. N., POTTURI, P., WANG, Z., YANG, H., WANG, J., ZHUO, L., KINI, R. M., AND GE, R. Isthmin is a novel secreted angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (2011).
- [285] XU, H., ZHONG, L., DENG, J., PENG, J., DAN, H., ZENG, X., LI, T., AND CHEN, Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science* 12, 1 (Dec. 2020), 1–5.
- [286] XU, Y., SUN, P., WANG, J., LI, Z., GAO, R., WANG, X., PHILLIPS, WILLIAM, D., AND LIANG, SIMON, X. Differentiation of cd45-/cd31+ lung side population cells into endothelial and smooth muscle cells in vitro. *International Journal of Molecular Medicine* 43, 3 (2019), 1128–1138.
- [287] YANG, X., CHEN, D., LONG, H., AND ZHU, B. The mechanisms of pathological extramedullary hematopoiesis in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 77, 14 (jul 2020), 2723–2738.
- [288] YOSHIMOTO, S., KATAYAMA, K., SUZUKI, T., DOHMAE, N., AND SIMIZU, S. Regulation of N-glycosylation and secretion of Isthmin-1 by its C-mannosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1865, 3 (mar 2021), 129840.
- [289] YOSHIMURA, F. K., AND LUO, X. Induction of Endoplasmic Reticulum Stress in Thymic Lymphocytes by the Envelope Precursor Polyprotein of a Murine Leukemia Virus during the Preleukemic Period. *Journal of Virology* 81, 8 (2007), 4374–4377.

- [290] YU, Y.-R. A., O'KOREN, E. G., HOTTEN, D. F., KAN, M. J., KOPIN, D., NELSON, E. R., QUE, L., AND GUNN, M. D. A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. *PLoS ONE* 11, 3 (mar 2016), e0150606.
- [291] YUAN, B., XIAN, R., MA, J., CHEN, Y., LIN, C., AND SONG, Y. Isthmin inhibits glioma growth through antiangiogenesis in vivo. *Journal of Neuro-Oncology* 109, 2 (Sept. 2012), 245–252.
- [292] ZANJANI, E. D., ASCENSAO, J. L., AND TAVASSOLI, M. Liver-derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* 81, 2 (1993), 399–404.
- [293] ZHANG, C. C., AND LODISH, H. F. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. *Current Opinion in Hematology* 15, 4 (July 2008), 307–311.
- [294] ZHANG, Y., CHEN, M., VENUGOPA, S. L., ZHOU, Y., XIANG, W., LI, Y. H., LIN, Q., KINI, R. M., CHONG, Y. S., AND GE, R. Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through alphavbeta5 integrin depending on its physical state. *Cell Death and Disease* 2, 5 (2011).
- [295] ZHAO, J. L., MA, C., O'CONNELL, R. M., MEHTA, A., DILORETO, R., HEATH, J. R., AND BALTIMORE, D. Conversion of danger signals into cytokine signals by hematopoietic stem and progenitor cells for regulation of stress-induced hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 14, 4 (apr 2014), 445–459.
- [296] ZHENG, Y., ZHENG, Y., LEI, W., XIANG, L., AND CHEN, M. miR-1307-3p overexpression inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis by targeting ISM1 in colon cancer. *Molecular and Cellular Probes* 48 (Dec. 2019), 101445.
- [297] ZHOU, F., LI, X., WANG, W., ZHU, P., ZHOU, J., HE, W., DING, M., XIONG, F., ZHENG, X., LI, Z., NI, Y., MU, X., WEN, L., CHENG, T., LAN, Y., YUAN, W., TANG, F., AND LIU, B. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution. *Nature* 533, 7604 (May 2016), 487–492.

- [298] ZHOU, P., YANG, X.-L., WANG, X.-G., HU, B., ZHANG, L., ZHANG, W., SI, H.-R., ZHU, Y., LI, B., HUANG, C.-L., CHEN, H.-D., CHEN, J., LUO, Y., GUO, H., JIANG, R.-D., LIU, M.-Q., CHEN, Y., SHEN, X.-R., WANG, X., ZHENG, X.-S., ZHAO, K., CHEN, Q.-J., DENG, F., LIU, L.-L., YAN, B., ZHAN, F.-X., WANG, Y.-Y., XIAO, G.-F., AND SHI, Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579 (2012).

## Apéndices

Antígeno	Fluorocromo	Reactividad	Clona	Marca	Dilución
CD49A	APC	M	HMA1	Biologend	3:200
CD49B	EF-450	M	DX5	Ebioscience	2:200
CD49D	FITC	M	R1-2	Biologend	2:200
CD4	PE	M	GK1.5	Ebioscience	4:200
	PE-CY7	M	GK1.5	Ebioscience	4:200
	AF488	M	GK1.5	Ebioscience	4:200
	APC-CY7	M	GK1.5	Ebioscience	4:200
	PercP-CY5.5	M	GK1.5	Ebioscience	4:200
CD45	AF700	M	30F11	Biologend	1:200
	APC	M	30F11	Biologend	1:200
CD3E	PercP-CY5.5	M	145-EC11	Tonbo	5:200
CD19	PercP-CY5.5	M	1D3/CD19	Biologend	5:200
CD8A	PercP-CY5.5	M	53-6.7	Biologend	5:200
Ly6G	PercP-CY5.5	M	1A8	Biologend	5:200
TER119	PercP-CY5.5	M	TER119	Biologend	5:200
FcR?1A	PercP-CY5.5	M	1-Mar	Biologend	5:200
CD11B	PercP-CY5.5	M/H	M1-70	Tonbo	5:200
CD11C	PercP-CY5	M	N418	Biologend	5:200
NK1.1	PercP-CY5.5	M	PK136	Biologend	3:200
ST2	APC	M	DIH9	Biologend	3:200
CD335 (NKp46)	BV421	M	29A1.4	Biologend	3:200
CD127 (IL7R)	VF450	M	A7R34	Tonbo	3:200
CD90.2	AF700	M	30-H12	Biologend	1:200
CD105	FITC	M	MJ7/18	Biologend	3:200
CD146 (MCAM)	APC	M	ME-9F1	Biologend	3:200
CD326 (Ep- CAM)	PercP-CY5.5	M	G8.8	Biologend	3:200
CD31 (PECAM-1)	PE-CY7	M	MEC13.3	Biologend	3:200



CD140a (PDGFRa)	BV605	M	APA5	Biologend	3:200
CD117 (ckit)	APC750	M	2B8	Biologend	3:200
SCA-1	FITC	M	E13- 161.7	Biologend	3:200
	APC	M	E-13- 161.7	Biologend	3:200
CD34	PercP-CY5.5	M	HM34	Biologend	5:200
CD48	APC-fire	M	HM48-1	Biologend	2.5:200
CD150	VB605	M	A12 (7D4)	Biologend	3:200
ISM1	PE	M	B054B6	Biologend	1.5:50
IgG2b	PE	M	MPC-11	Biologend	1.5:50
GRP78	AF488	M/H	C38	Ebioscience	3:200
TLR4	PECy7	M	SA15-21	Biologend	3:200
TLR5	AF647	M	ACT5	Biologend	3:200
TLR9	FITC	M	S18025A	Biologend	2:200

**Tabla 2: Lista de anticuerpos.** Se muestran los anticuerpos, clonas y concentración utilizadas en la fenotipificación de las células de pulmón de ratones C57BL6J. M: *Mouse* (ratón), H: Humano.

Fecha	ID	Edad	Gene-ro	Servicio	Septi-ce-mia	Bacteria	Gram	ISM1 [pg/ml]
3/6/2018	DRB/01	6	M	Cirugía general	P(+)	<i>K. pneumoniae</i>	N(-)	401.48
4/6/2018	NMR/02	9	F	Urgencias	P(+)	<i>P. aeruginosa</i>	N(-)	290.37
4/6/2018	RPC/03	1	M	Cirugía	P(+)	<i>P. aeruginosa</i>	N(-)	360.74
11/6/2018	GGN/04	RN	F	Medicina interna	P(+)	<i>K. pneumoniae</i>	N(-)	590.37
14/06/2018	AUR/05	14	F	Oncología	P(+)	<i>S. maltophilia</i>	N(-)	642.22
14/06/2018	GN/06	RN	F	Medicina interna	P(+)	<i>K. pneumoniae</i>	N(-)	281.67
15/06/2018	AEP/07	17	F	Urgencias	P(+)	<i>P. aeruginosa</i>	N(-)	ND
4/7/2018	LCT/08	RN	M	UCI	P(+)	<i>S. maltophilia</i>	N(-)	1620
10/9/2018	AGG/09	RN	M	UCI	P(+)	<i>S. hominis</i>	P(+)	496.67
12/9/2018	VG/10	RN	F	UCI	P(+)	<i>B. megaterium</i>	P(+)	430
12/9/2018	AHR/11	2	F	Terapia intermedia	P(+)	<i>P. aeruginosa</i>	N(-)	421.67
13/09/2018	IMM/13	RN	F	Cirugía	P(+)	<i>S. epidermidis</i>	P(+)	655
13/09/2018	MHR/15	1	F	Urgencias	P(+)	<i>E. coli</i>	N(-)	521.67

13/09/ 2018	MEH/ 16	RN	M	UTI	P(+)	<i>S. epider- midis</i>	P(+)	1005
----------------	------------	----	---	-----	------	---------------------------------	------	------

**Tabla 3: Pacientes pediátricos hospitalizados con bacteremia.** Se muestran los datos de los pacientes pediátricos con sintomatología de sepsis y bacteremia positiva. RN: Recién nacido, M: Masculino, F: Femenino, UCI: Unidad de cuidados intensivos, UTI: Unidad de terapia intensiva, P(+): Positivo, N(-): Negativo, ND: No detectable, menor de 250 pg/ml.