

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina



Papel de las células mesenquimales expandidas *in vitro* para mejorar el injerto en el contexto del trasplante hematopoyético

M^a Soraya Carrancio Antón

2010



Universidad de Salamanca
Departamento de Medicina

**DA. MA CONSUELO DEL CAÑIZO FERNÁNDEZ-ROLDÁN, PROFESORA
TITULAR DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado **“Papel de las células mesenquimales expandidas "in vitro" para mejorar el injerto en el contexto del trasplante hematopoyético”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada M^a Soraya Carrancio Antón en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de Doctora de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en
Salamanca a 3 de noviembre de 2010

Fdo. Prof^a. Dr^a. D^a. María Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán



Universidad de Salamanca
Departamento de Medicina

**D. FERMÍN MARTÍN SÁNCHEZ-GUIJO, DOCTOR EN MEDICINA Y
CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado **“Papel de las células mesenquimales expandidas "in vitro" para mejorar el injerto en el contexto del trasplante hematopoyético”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada M^a Soraya Carrancio Antón en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de Doctora de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en
Salamanca a 3 de noviembre de 2010

Fdo. Dr. D. Fermín Martín Sánchez-Guijo



Universidad de Salamanca
Departamento de Medicina

**D^a. NATALIA LÓPEZ HOLGADO,
DOCTORA EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado **“Papel de las células mesenquimales expandidas "in vitro" para mejorar el injerto en el contexto del trasplante hematopoyético”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada M^a Soraya Carrancio Antón en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de Doctora de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la siguiente certificación en
Salamanca a 3 de noviembre de 2010

Fdo. Dr^a. D^a. Natalia López Holgado.

Agradecimientos

A mi familia

Abreviaturas

Ang1: Angiopoyetina 1

B: Linfocito B

BFU-E: Unidad formadora de brote eritroide

BSA: Albumina de suero bovino

CAFC: Células formadoras de áreas de cobblestone

CFU-E: Unidad formadora de colonias -Eritroide

CFU-F: Unidad formadora de colonias fibroblásticas

CFU-G: Unidad formadora de colonias granulocíticas

CFU-GM: Unidad formadora de colonias granulomonocíticas

CFU-GEMM: Unidad formadora de colônias granulocíticas, monocíticas, eritroides y megacariocíticas

CFU-M: Unidad formadora de colonias -Monocítica

CFU-Meg: Unidad formadora de colonias megacariocíticas

CMF: Citometría de flujo

CMN: Células mononucleadas

CPH: Célula progenitora hematopoyética

CSH: Célula stem hematopoyética

CSM: Célula stem mesenquimal

CXCL-12: Ligando 12 de quimiocina

CXCR-4: Receptor 4 de quimiocina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EICH: Enfermedad injerto contra huésped

G-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocíticas

GFP: Proteína verde fluorescente

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago

Abreviaturas

HLA: Antígeno leucocitario humano

IL-1: Interleucina 1

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-3: Interleucina 3

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-11: Interleucina 11

LPAM-1: Integrina alfa4beta7

LTCIC: Células iniciadoras de cultivos a largo plazo

MAdCAM-1: Molécula 1 de adhesión a célula mucosa

MO: Médula ósea

NK: Célula Natural Killer

NOD: No obesos diabéticos

NOD/SCID: Ratón de la cepa NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/NcrCrl

OPN: osteopontina

PBS: Tampón fosfato salino

PSGL-1: *P-selectin glycoprotein ligand-1*

PTI: Púrpura trombopenia idiopática

SCF: Factor de célula *stem*

SCID: inmunodeficiencia combinada severa

SCU: Sangre de cordón umbilical

SDF1: Factor derivado del estroma 1

SMD: Síndrome mielodisplásico

SP: Sangre periférica

T: Linfocito T

TGF β : Factor de crecimiento β transformate

TGF-1: Factor de crecimiento 1 transformate

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

TPO: Trombopoietina

VCAM-1: Molécula de adhesión a célula vascular

VLA-4: Integrina $\alpha 4\beta 1$ o antígeno muy tardío 4.

VLA-5: Integrina $\alpha 5\beta 1$ o antígeno muy tardío 5.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Hematopoyesis y micromedioambiente	3
1.1.1. Célula <i>stem</i> hematopoyética	3
1.1.2. Hematopoyesis	4
1.1.3. Micromedioambiente	6
1.1.4. Nicho hematopoyético	8
1.1.5. Célula <i>stem</i> mesenquimal	11
1.2. Trasplante hematopoyético	14
1.2.1. Clasificación	15
1.2.2. Estudio del trasplante mediante técnicas <i>in vitro</i>	17
1.2.3. Estudio del trasplante mediante modelos <i>in vivo</i>	19
1.2.4. Acondicionamiento	20
1.2.5. Daño en el estroma	22
1.2.6. Fallo de injerto	23
1.2.7. Métodos de optimización del injerto	23
2. Hipótesis	27
3. Objetivos	31
4. Material y Métodos	35
4.1. Materiales: células y animales	37
4.2. Métodos	38
4.2.1. Aislamiento y caracterización de las células	38
4.2.1.1. Aislamiento y caracterización de las CSM	38
4.2.1.1.1. Obtención de la MO	38

4.2.1.1.2.	<i>Separación de CMN</i>	38
4.2.1.1.3.	<i>Cultivo y expansión de CSM</i>	39
4.2.1.1.4.	<i>Caracterización inmunofenotípica de las CSM</i>	40
4.2.1.1.5.	<i>Diferenciación de CSM</i>	41
4.2.1.2.	<i>Línea celular 293T</i>	42
4.2.1.3.	<i>Aislamiento y caracterización de los progenitores hematopoyéticos (CD34⁺) de SP</i>	43
4.2.1.3.1.	<i>Obtención de leucoaféresis</i>	43
4.2.1.3.2.	<i>Separación celular</i>	43
4.2.1.4.	<i>Aislamiento y caracterización de los progenitores hematopoyéticos (CD34⁺) de SCU</i>	44
4.2.2.	<i>Estudios in vitro</i>	45
4.2.2.1.	<i>Cultivos a largo plazo en dos etapas</i>	45
4.2.2.2.	<i>Cultivos para analizar el efecto de las CSM sobre el estroma dañado</i>	48
4.2.2.3.	<i>Estudio del efecto de las CSM sobre progenitores hematopoyéticos</i>	50
4.2.3.	<i>Estudios in vivo</i>	53
4.2.3.1.	<i>Modelo de injerto hematopoyéticos con células CD34⁺ de SP</i>	53
4.2.3.2.	<i>Modelo de injerto hematopoyético con células CD34⁺ de SCU</i>	56
4.2.3.3.	<i>Análisis de la bioluminiscencia in vivo</i>	57
4.2.4.	<i>Análisis inmunohistoquímico</i>	58
4.2.5.	<i>Citometría de flujo</i>	59
4.2.5.1.	<i>Inmunofenotipaje</i>	59

4.2.5.2.	<i>Estudio de viabilidad</i>	62
4.2.5.3.	<i>Análisis de ciclo celular</i>	62
4.2.6.	Hibridación in situ fluorescente (FISH)	63
4.2.7.	<i>Western blot</i>	64
4.2.8.	Transducción celular	66
4.2.8.1.	<i>Producción de lentivirus</i>	66
4.2.9.	Análisis estadístico	69
5.	Resultados	71
5.1.	Expansión y caracterización de las CSM	73
5.1.1.	Expansión de las CSM	73
5.1.2.	Caracterización inmunofenotípica	73
5.1.3.	Diferenciación de las CSM	74
5.2.	Aislamiento de progenitores hematopoyéticos	75
5.3.	Estudios <i>in vitro</i>	76
5.3.1.	Cultivos a largo plazo en 2 etapas	76
5.3.1.1.	<i>Confluencia de la capa adherente</i>	77
5.3.1.2.	<i>Presencia de adipocitos y áreas de cobbletone</i>	78
5.3.1.3.	<i>Capacidad clonogénica</i>	80
5.3.1.3.1.	<i>Número de células producidas por el cultivo a largo plazo</i>	80
5.3.1.3.2.	<i>Número total de progenitores generados en el cultivo a largo plazo</i>	81
5.3.2.	Capacidad de injerto de las CSM <i>in vitro</i>	82
5.3.3.	Expresión de osteopontina y SDF1alfa	84

Índice

5.3.4.	Efecto de las condiciones del estroma sobre la población hematopoyética	87
5.4.	Modelo animal	92
5.4.1.	Control de la distribución de las células mesenquimales mediante BLI	92
5.4.2.	Quimerismo hematopoyético con CPH de SP	95
5.4.3.	Quimerismo hematopoyético con CPH de SCU	98
5.4.4.	Análisis del quimerismo a nivel del estroma mediante FISH	102
6.	Discusión	105
7.	Conclusiones	123
8.	Bibliografía	127

1. Introducción

1.1. Hematopoyesis y micromedioambiente

1.1.1. Célula *stem* hematopoyética

A principios del siglo XX se desarrolla entre la comunidad científica la idea de la existencia de una célula “madre” a partir de la cual se pueden diferenciar todos los tipos celulares sanguíneos. Pero no es hasta mediados de siglo cuando Till y McCulloch comprueban la existencia de la célula *stem* hematopoyética (CSH) y los criterios característicos que definen a este tipo celular: su capacidad de autorrenovación, que permite mantener el *pool* celular, y su potencial de diferenciación hacia diferentes tipos celulares maduros ^{1;2}. Así, la CSH se ha convertido en la célula *stem* adulta mejor caracterizada, habiendo sido el modelo del sistema hematopoyético el principalmente empleado en el estudio de la estructura, función y biología de este tipo celular durante décadas.

En el adulto, las CSH residen principalmente en la médula ósea (MO) y son responsables de la producción diaria de todas las células maduras de la sangre. Pero además, gracias al proceso de autorrenovación, al menos una de las células hijas de la célula *stem*, mantendrá esa capacidad *stem*, y esto se debe tanto a divisiones simétricas como asimétricas (Figura 1). Tras una división simétrica, las dos células hijas van a mantener esa capacidad *stem*. Teóricamente, este proceso expande el *pool* de CSH, siendo así un proceso muy importante en los casos de trasplante y de daño a nivel hematopoyético. En una división asimétrica, las dos células hijas toman distintas determinaciones, siendo solamente una de ellas la que mantiene la capacidad *stem* mientras la otra se compromete hacia un determinado linaje en un estado más diferenciado. La autorrenovación es crítica para el mantenimiento del *pool* de CSH y para el de la hematopoyesis a lo largo de la vida.

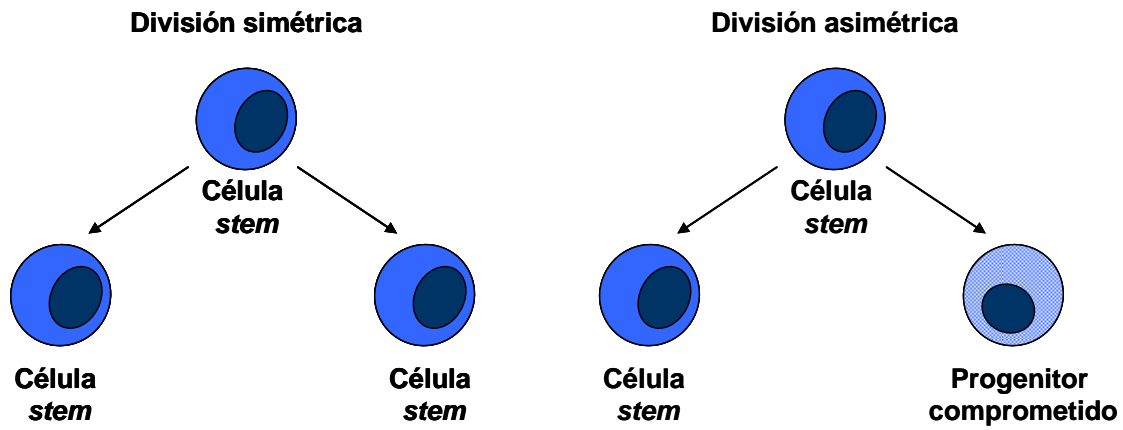


Figura 1: Capacidad de autorrenovación de las células *stem*. Tipos de divisiones mitóticas que les permiten mantener constante el *pool* celular.

1.1.2. Hematopoyesis

El sistema hematopoyético está organizado clásicamente de manera jerárquica, con un número bajo de CSH que dan lugar a una progenie que progresivamente va perdiendo la capacidad de autorrenovación y reduciendo su potencial de diferenciación formando finalmente células maduras funcionales (Figura 2). Desde que en 1876 Mosler realizara la primera biopsia medular hasta la actualidad, muchos han sido los estudios realizados con el fin de identificar, aislar y caracterizar los tipos celulares existentes en la MO³. Actualmente, atendiendo al grado de maduración que transcurre durante el proceso de hematopoyesis, podríamos dividirlo en tres compartimentos celulares: CSH, células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y células maduras. El primer escalón lo ocupa la CSH, aislada por primera vez en 1988 a partir de MO de ratón⁴. Hoy en día la CSH se caracteriza por la expresión de distintos marcadores de membrana entre los que destaca el CD34 y la ausencia de marcadores específicos de línea. Funcionalmente, proporciona un aporte constante de células hematopoyéticas tanto de línea linfóide como mieloide^{1;5;6}, además de ser capaz de mantener un *pool* constante de CSH. Siguiendo este proceso de diferenciación aparecen las CPH, que se encuentran en

distintos estadios de diferenciación hasta originar la célula madura. En estas células se van produciendo cambios que las comprometen más hacia un tipo celular maduro aunque todavía no adquieren sus características morfológicas. La transición a través de los distintos tipos celulares hasta llegar finalmente a una célula madura va acompañada de una pérdida de la capacidad de auto-renovación así como una ganancia de funcionalidad.

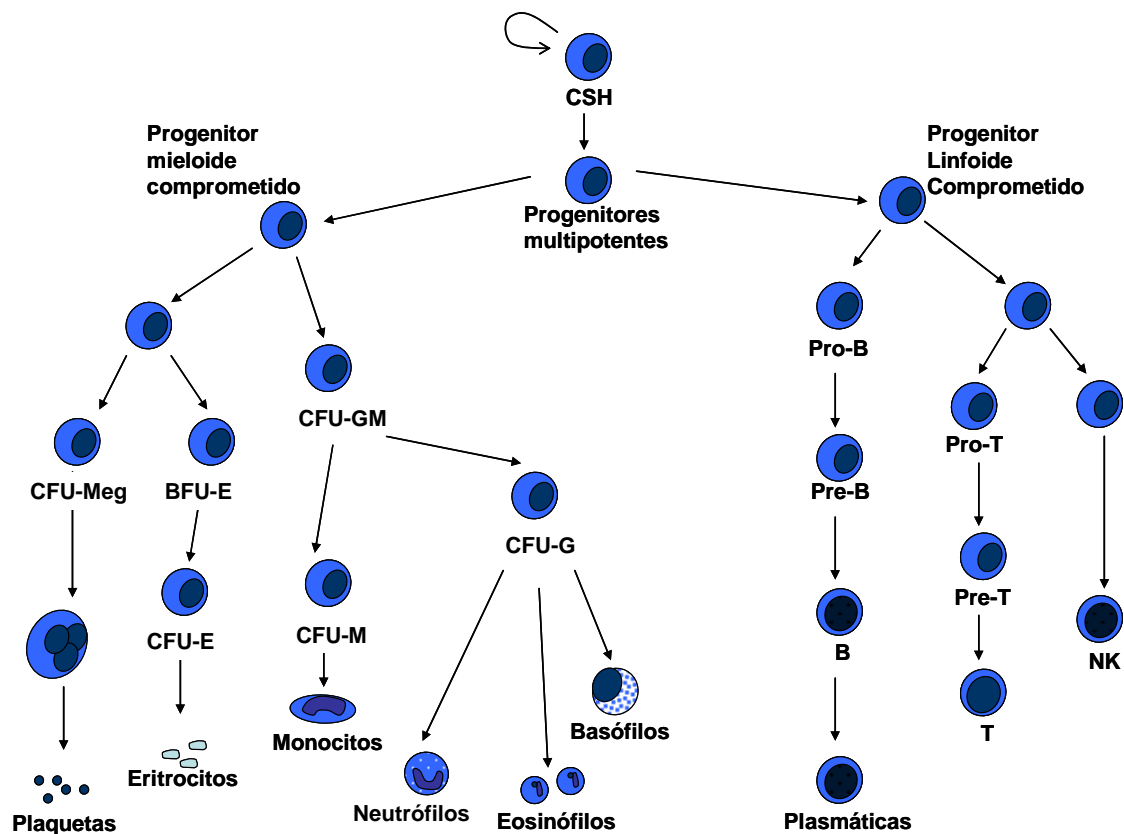


Figura 2: Organización jerarquizada del sistema hematopoyético.

CSH: Célula *stem* hematopoyética; CFU-Meg: Unidad formadora de colonias megacatiocíticas; BFU-E: Unidad formadora de *burst* eritroide; CFU-E: CFE-Eritroide; CFU-GM: CFU-Granulomonocítica; CFU-M: CFU-Monocítica; CFU-G: CFU-Granulocítica; B: Linfocito B; T: Linfocito T; NK: Célula *Natural Killer*

El funcionamiento normal de la hematopoyesis resulta de la interacción entre mecanismos intracelulares y la influencia del micromedioambiente, donde se desarrollan las células hematopoyéticas. La célula responde a programas genéticos que finalizan en la formación de la célula madura. Los grupos de genes, y

Introducción

principalmente de factores de transcripción que dirigen este proceso a nivel intracelular, se encuentran en gran parte controlados por una serie de factores de crecimiento y señales extracelulares. Esto indica la gran importancia que tiene el entorno o micromedioambiente en la regulación de la hematopoyesis, demostrado por la dificultad que existe para mantener y/o expandir las células hematopoyéticas aisladas en condiciones *in vitro*.

1.1.3. Micromedioambiente

En 1978, Schofield, propuso por primera vez la idea de que las células *stem* residían en un compartimento anatómico o nicho que se encargaba del mantenimiento de las propiedades de las células *stem*⁷. Se han diseñado diversos estudios con el fin de visualizar y analizar estos nichos, que han permitido comprobar que las señales que provienen de los mismos regulan los procesos de auto-renovación, supervivencia y mantenimiento de las células *stem*, que la relación entre éstas y las células de soporte puede polarizarlas respecto al nicho y promover así divisiones asimétricas y que además existe una conexión directa entre la fuente de señales de autorrenovación y mantenimiento, el nicho de la célula *stem*, y las propias células *stem*.

La decisión final entre autorrenovación diferenciación y quiescencia proliferación está altamente regulada por la integración de factores intrínsecos y extrínsecos que proporciona el micromediambiente en el que las células residen.

Aunque los nichos varían entre ellos, presentan una serie de componentes comunes, los cuales reflejan que el nicho representa una entidad compleja y dinámica en la que la integración de múltiples señales permite el control del número y función de las células *stem* (Figura 3). Así encontramos:

- La propia célula *stem*.
- Las células de soporte del estroma que interactúan directamente con la célula *stem* y con otras a través de receptores de membrana, uniones tipo *gap* y factores solubles. Entre estas células se encuentran las células *stem* mesenquimales (CSM), progenitoras de varios componentes del estroma.
- Proteínas de la matriz extracelular que aportan estructura, organización y señales mecánicas.
- Vasos sanguíneos que llevan las señales sistémicas y son el canal de llegada de células inflamatorias y otras células circulantes al nicho.
- Señales nerviosas que pueden comunicar otras señales reguladoras.

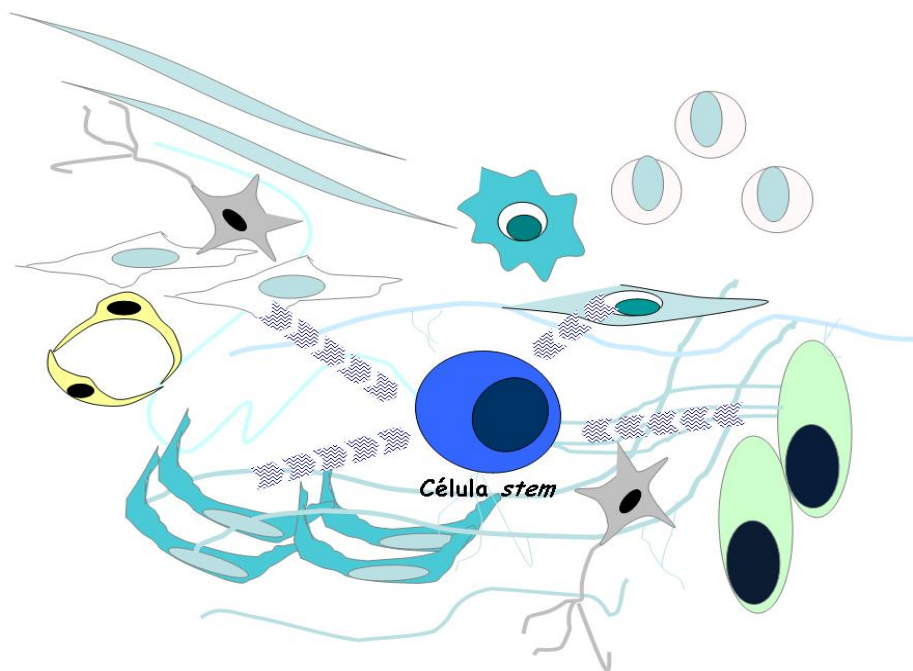


Figura 3: Componentes del nicho de las células *stem* cuya acción integrada influye en la regulación y funcionamiento de las mismas.

Sin embargo, para comprender cómo el micromedioambiente puede influir en las células *stem*, es necesario poder localizar a estas últimas. En el caso de la CSH, gracias a la existencia de marcadores específicos, se ha visto que una parte de las

Introducción

CSH residen junto a la superficie del endostio en el hueso trabecular, muy próximas tanto a los osteoblastos que forman el hueso como a las células endoteliales que limitan los vasos sanguíneos. Las CSH pueden abandonar este nicho, entrar en la circulación y volver al nicho. Su proximidad a células endoteliales puede facilitar esta movilización de la médula ósea a la circulación.

1.1.4. Nicho hematopoyético

Actualmente se define nicho hematopoyético como un micromedioambiente específico de la MO que anatómicamente contiene las CSH y las controla. Juega un papel importante en la regulación de la supervivencia y capacidad de autorrenovación de las CSH protegiéndolas del agotamiento previniendo su excesiva proliferación. Aunque distintos tipos celulares han sido propuestos como posibles componentes, su función integrada es aún desconocida, lo que limita la caracterización de estos nichos.

Desde este punto de vista anatómico, podemos diferenciar un nicho osteoblástico y otro vascular. En primer lugar se describió el nicho osteoblástico como la residencia oficial de las CSH quiescentes o más inmaduras. Este nicho sería el principal encargado del mantenimiento del *pool* de CSH. Más recientemente, se ha descrito la existencia en MO de otro compartimento, el nicho vascular, compuesto principalmente por los sinusoides de la MO alrededor de los cuales se localizarían las CSH. La función de este nicho genera más controversia puesto que mientras en alguna teoría sería solamente la vía de salida de las CSH al torrente sanguíneo, para otros autores puede ser otro nicho capaz de mantener las CSH.

Centrándonos en el estudio del nicho de la MO, pronto se ha propuesto la inclusión de los osteoblastos, especialmente los de la zona del endostio, debido a su

proximidad anatómica. Se ha demostrado que las células más inmaduras se encuentran próximas o asociadas a estos osteoblastos y que por ello deberían influir en las mismas. Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de los osteoblastos para mantener las CSH en cultivo⁸ y más recientemente, trabajos *in vivo* han permitido ver cómo el injerto de las CSH más inmaduras tras un trasplante se produce cerca del endostio e incluso cómo modificaciones en los osteoblastos son capaces de transformar las CSH sanas en patológicas⁹. Todo ello sugiere que estos osteoblastos próximos al endostio son el “soporte” primario de las CSH. No es de extrañar la importancia de los osteoblastos ya está ampliamente establecido que producen citocinas importantes para la expansión de progenitores mieloides como G-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-1 y TGF β . Además secretan proteínas en la matriz capaces de provocar una respuesta en la CSH. Un ejemplo es la osteopontina (OPN), que provoca inhibición de la división de la CSH manteniendo el *pool* de células inmaduras o las vías Ang1/Tie2 y TPO/Mp1 que mantienen las CSH en estado quiescente. También se ha demostrado su papel en el anidamiento y mantenimiento de las CSH en el nicho de la MO a través de la secreción de ligando CXCL12 o factor 1 derivado del estroma (CXCL12 o SDF1) que media el anclaje de las CSH por unión a su receptor CXCR4⁸. Además la interacción célula-célula entre CSH y osteoblastos mediante uniones N-Cadherina parece jugar un papel en la toma de decisiones de las CSH, aunque este aspecto no está del todo claro. Actualmente, algunos autores indican que dentro de la población de osteoblastos, serían los progenitores más inmaduros, más cercanos a la CSM, los que interaccionan con la CSH.

Otro componente importante del nicho de la MO actualmente en estudio es el nicho vascular. Aunque su importancia durante el desarrollo embrionario es clara por la estrecha relación entre tejido hematopoyético y endotelial, existen dudas en cuanto

Introducción

a su implicación en la hematopoyesis del adulto. Así hay evidencias de la relación e influencia del sistema vascular de la MO con las células diferenciadas o con progenitores comprometidos, especialmente en el caso de la línea mieloide, pero con CSH solamente se ha demostrado su localización cercana a los sinusoides de la MO desconociéndose su papel en la regulación y mantenimiento de la célula *stem*. Además, estudios recientes demuestran que las CSM CD146⁺ localizadas en la región perivascular son capaces de formar un micromedioambiente hematopoyético, pudiendo ser causantes de los efectos sobre la población hematopoyética que algunos atribuían a las células endoteliales.

Por otro lado, algunos autores han demostrado la influencia de otros tipos celulares procedentes de CSM. Así, en el nicho de la MO, podemos encontrar fibroblastos y adipocitos. Estas células derivan de la CSM, progenitora de la mayoría de los tipos celulares que componen este micromedioambiente medular, lo que nos permite describirla como la célula *stem* del estroma o nicho de la MO (Figura 4).

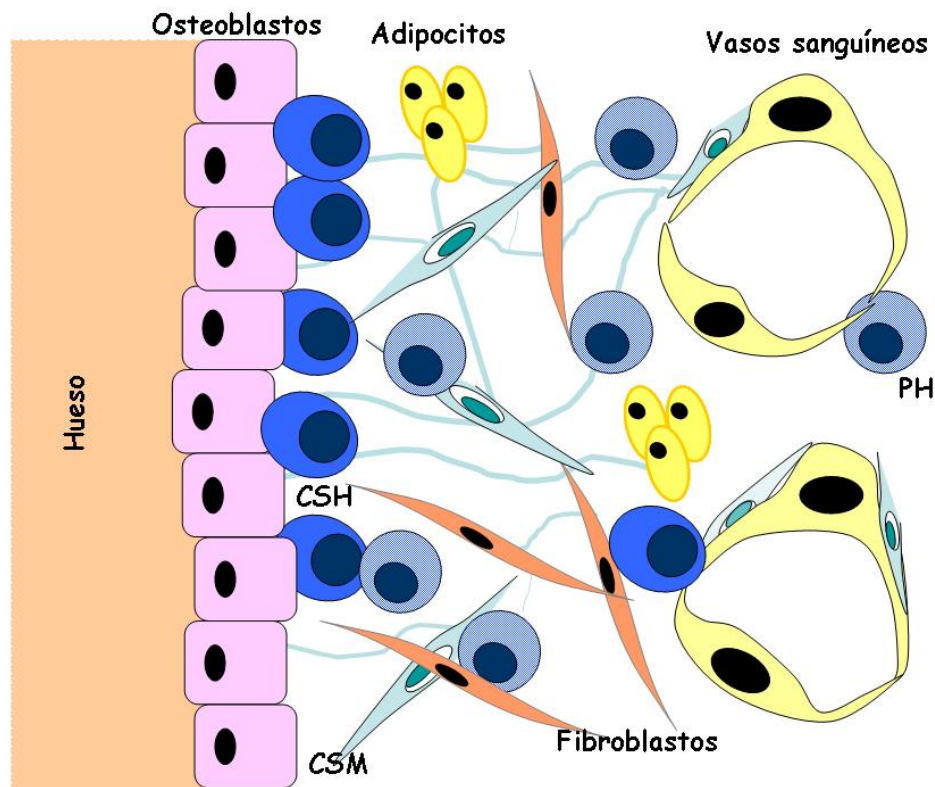


Figura 4: Componentes del estroma de la MO. Podemos diferenciar un nicho osteoblástico y otro vascular junto con otros componentes de origen mesenquimal.

CSH: Célula stem hematopoyética; CSM: Célula stem mesenquimal; PH: Progenitor hematopoyético.

1.1.5. Célula *stem* mesenquimal

Friedenstein y colaboradores fueron los primeros en identificarla por su capacidad de adherencia al plástico y de formar colonias de aspecto fibroblástico que denominaron CFU-F. Con un modelo experimental adecuado llegaron a inducir su diferenciación a hueso, cartílago y estroma, además de estimar su frecuencia en la fracción mononuclear de la MO como 1 de cada 10^4 - 10^5 células¹⁰⁻¹³.

En cultivo, se ha observado que las CSM obtenidas de MO son un tipo celular con capacidad de adherencia al plástico, apariencia fibroblástica y un nucleolo muy prominente^{14;15}. Cuando se cultivan a baja densidad, tienen la propiedad de formar colonias CFU-F. Estas células, presentan una vida limitada, con un tiempo de

Introducción

duplicación de 33 h y con un número de duplicaciones de aproximadamente 38. A medida que aumenta el número de pases en el cultivo, estos progenitores aparentemente pierden su capacidad multipotencial y comienzan a expresar características apoptóticas. Sin embargo, los estudios de ciclo celular en cultivos de CSM humanas revelan que mientras una pequeña fracción de CSM está proliferando (aproximadamente el 10%), la amplia mayoría están en fase G0/G1, dentro de la cual se incluye una minoría de células en estado quiescente¹⁶.

Por otro lado, se ha descrito que las CSM forman una población un tanto heterogénea, y tal vez uno de sus principales problemas sea la laguna de información existente en torno a su caracterización inmunofenotípica, lo que unido a su baja proporción en MO, impide aislarlas a partir de una muestra biológica¹⁷. Esto ha promovido el desarrollo de un perfil de antígenos de superficie para conseguir mejor aislamiento y caracterización, que combina una serie de marcadores positivos y negativos, ya que hasta el momento no se ha descrito un marcador específico para estas células.

La combinación de marcadores positivos para CSM varía entre los distintos grupos, que generalmente los seleccionan entre CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD166 y Stro1¹⁸⁻²⁰.

La ausencia de un marcador específico de CSM unida a la heterogeneidad que presentan estas células en cultivos ha hecho que se haga necesario emplear un criterio funcional para mejorar su caracterización como es la capacidad de diferenciación. Como indica la definición de célula *stem*, las CSM se consideran células capaces de diferenciarse, al menos, a células de tejidos de estirpe mesenquimal, es decir, procedentes de su misma capa embrionaria. Varios grupos

han sido capaces de diferenciar las CSM hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos tanto en cultivos *in vitro*^{16;18} como en modelos *in vivo*²¹.

Funcionalmente, las CSM contribuyen a la formación del nicho hematopoyético, el cual proporciona el microambiente adecuado para la auto-renovación, proliferación y diferenciación de las CSH y otros progenitores hematopoyéticos. A través de diferentes vías de señalización pueden ser movilizadas y diferenciarse a distintas estirpes del tejido conectivo. Estas señales son inducidas por daños en el tejido de tipo traumatológico, fracturas, inflamación, necrosis o tumores. Tanto la quimiotaxis como el microambiente local son factores que influyen en el destino y diferenciación final de las CSM. Estudios recientes sugieren que la capacidad de las CSM para secretar determinados factores solubles puede alterar la funcionalidad del microambiente y de este modo actuar en la reparación del daño. Entre estos factores secretados por las CSM se incluyen el factor de crecimiento de hepatocitos, TGF-1, interleucina-1 (IL-1), IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, stem cell factor (SCF) y SDF1, que actúan estimulando la proliferación y diferenciación de los progenitores endógenos que se encuentran en el tejido, disminuyendo la inflamación y la reacción inmune²².

También se ha considerado a las CSM como un tipo celular poco inmunogénico y con capacidad inmunomoduladora. Estas células pueden suprimir algunas funciones de linfocitos T, B y células NK y en algunos casos también afectar a la función de las células dendríticas²³. Además, producen una variedad de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y proteasas que juegan un papel importante en la inmunomodulación y migración²⁴.

1.2. Trasplante hematopoyético

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es un procedimiento terapéutico destinado a reconstituir el tejido hematopoyético del paciente, que generalmente presenta una insuficiencia medular o sufre una enfermedad neoplásica.

Ya a finales del S.XIX, Brown-Sequard planteó la posibilidad de reconstituir la producción de células sanguíneas en casos de anemia con la administración de bazo de animales, crudo o cocido. Pero no fue hasta los años 50 cuando se consiguió reconstituir la hematopoyesis en ratones sometidos a una dosis letal de irradiación, mediante la administración intravenosa de células hematopoyéticas de otro ratón, confirmando así la posibilidad real de un trasplante hematopoyético^{25;26}. Estos estudios en roedores fueron la base de una intensa actividad investigadora que derivó en la publicación en 1957, por el grupo de ED Thomas, del resultado de los primeros trasplantes de MO alogénicos en humanos, consiguiendo únicamente un injerto temporal en uno de los pacientes²⁷. En los años siguientes se fueron descubriendo las limitaciones de estas primeras experiencias y se empezaron a tener en cuenta factores como la histocompatibilidad, la necesidad de un acondicionamiento correcto, inmunosupresión, etc. Así, en 1977, Thomas y su grupo publicaron una serie de 100 pacientes con leucemia aguda, tratados con irradiación corporal total y ciclofosfamida, que recibieron un trasplante alogénico de un hermano HLA idéntico, llegando algunos de estos pacientes a recuperarse de su enfermedad. A partir de este momento comienza la expansión del trasplante hematopoyético, cuyas indicaciones se han ido ampliando y cuyos resultados van mejorando siempre gracias a los avances paralelos obtenidos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*²⁸.

1.2.1. Clasificación

Atendiendo a la fuente de la que se obtienen estas CPH podemos clasificar los tipos de trasplante en:

- MO. Es la fuente original de CPH y la única utilizada durante mucho tiempo, pero su empleo ha disminuido progresivamente al ser sustituida por otras fuentes.
- Sangre periférica (SP). En la sangre periférica en condiciones normales existe una mínima cantidad de CSH circulantes, que aumentan durante la fase de recuperación de una aplasia inducida por quimioterapia o tras la administración de diversos factores de crecimiento hematopoyético, siendo el más utilizado el G-CSF (Factor de crecimiento de colonias de granulocíticas). Tras la movilización de las CPH, se somete al paciente o donante a sesiones de aféresis para obtener la fracción de células mononucleadas (CMN) en la que se encuentran las células $CD34^+$, cuya cuantificación se emplea como referencia para el trasplante. La ventaja fundamental de esta fuente celular es que la recuperación hematológica es más rápida que con MO lo que disminuye las complicaciones y el tiempo de hospitalización^{29;30}.
- Sangre de cordón umbilical (SCU). Las CSH obtenidas a partir de SCU se utilizan en el contexto del trasplante desde el año 1988³¹. La SCU es rica en progenitores hematopoyéticos, pero su volumen es limitado, lo que hace que el número total de células *stem* sea pequeño y la recuperación inmunohematológica lenta. Inicialmente se empleó sólo en niños, por la menor dosis celular necesaria, pero actualmente se está utilizando con éxito en pacientes adultos que carecen de un donante adecuado de MO o SP³².

Introducción

Además de la fuente de CPH, en la clasificación de los TPH también es importante el donante del que se obtienen estas CPH. Atendiendo a su relación con el receptor los podemos clasificar en:

- Autotrasplante. Consiste en extraer y criopreservar CPH del propio paciente, que le serán reinfundidas tras haberle sometido a tratamiento de acondicionamiento. Tiene el riesgo de que con el injerto se pueden reinfundir células tumorales contaminantes.
- Trasplante singénico. Es el que se realiza entre hermanos gemelos univitelinos. Dada la total identidad antigénica no existirán problemas inmunológicos, ni rechazo ni enfermedad injerto contra huésped (EICH). Sin embargo, es un tipo de trasplante excepcional ya que es muy poco frecuente que un paciente tenga un hermano gemelo univitelino.
- Trasplante alogénico. Es el realizado entre dos individuos con diferencias genéticas, pero con la mayor identidad posible en los antígenos del sistema HLA. Existen varias posibilidades dentro del TPH alogénico:
 - Hermanos HLA idénticos: con total identidad en los antígenos HLA de clase I y clase II. Es la mejor situación, pero sólo un 25-30% de los pacientes tienen un hermano totalmente idéntico.
 - Hermanos u otros familiares no totalmente idénticos: con disparidad en 1 *locus* o 2 *loci*.
 - Donantes haploidénticos: comparten un haplotipo del HLA con el paciente, generalmente son el padre o la madre. Tienen un riesgo mucho mayor de EICH por lo que habitualmente se realizan con depleción de linfocitos T como profilaxis.

- Donantes no emparentados: obtenidos a partir de los diversos registros internacionales de donantes de MO. Idealmente tienen que ser idénticos en todos los *loci* del HLA pero aún así tienen mayor riesgo de complicaciones, fundamentalmente EICH.

1.2.2. Estudio del trasplante mediante técnicas *in vitro*

Las técnicas basadas en los cultivos celulares proporcionan información acerca de la capacidad clonogénica de las células a estudiar. Un primer escalón lo constituyen los cultivos de progenitores formadores de colonias en medio semisólido. Estas técnicas se desarrollaron antes que las basadas en la citometría de flujo (CMF), y por tanto constituyeron la base biológica de la cuantificación de progenitores en los primeros años de desarrollo del TPH de SP.

Bradley y Metcalf, introdujeron un nuevo método de cultivo semisólido: *colony forming assay* o unidades formados de colonias³³. Este ensayo era capaz de identificar de manera directa, células primitivas hematopoyéticas, en virtud de la capacidad de su progenie de generar colonias focales y también permitía visualmente estudiar su dinámica y cinética. Estos cultivos reflejan la presencia de progenitores comprometidos hacia una o más líneas hematopoyéticas. Es posible detectar la presencia de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), macrofágicas (CFU-M), granulocíticas (CFU-G), megacariocíticas (CFU-Meg), granulocíticas y monocíticas (CFU-GM) o granulocíticas, monocíticas, eritroides y megacariocíticas (CFU-GEMM). Asimismo, existen técnicas para detectar progenitores con mayor potencial, como las unidades formadoras de *burst* de colonias (BFU-E, BFU-Meg) o las células de alto potencial proliferativo (HPP-CFC, HPP-BFU-Meg). De todas ellas, las CFU-GM son las más utilizadas para estimar, en la clínica, el número de progenitores³⁴.

Introducción

Estas herramientas permitieron a los investigadores inferir características de la biología de la CSH, que eran, de otro modo, esencialmente irreconocibles. Sin embargo, desde estos primeros experimentos se pudo reconocer que el hecho de aspirar y plantar la MO podía alterar su dinámica, de tal forma que la hematopoyesis *in vitro* observada en un ensayo de colonias era exclusivamente temporal, solo se podía observar proliferación durante 2-4 semanas. Esta limitación demostró que, o bien las CSH más primitivas eran incapaces de sobrevivir y proliferar en este tipo de ensayo, o bien que la conexión celular entre las células más primitivas y los progenitores realmente proliferativos se perdía en el ensayo, de tal forma que la producción rápida inicial de precursores de colonias no se mantenía en el tiempo. Los intentos de mimetizar de una forma más exacta la biología de la CSH *in vivo* progresaron con el desarrollo de un sistema de cultivo líquido descrito por T.M. Dexter al final de los años 70³⁵. En estos cultivos *Dexter* o cultivos a largo plazo, la proliferación de células hematopoyéticas depende de la presencia de una capa adherente que representa una reconstitución bidimensional del estroma de la MO *in vivo*, en el cuál las células existen en un esquema organizado tridimensional en íntimo contacto con las células hematopoyéticas en desarrollo.

De este modo se vio que los progenitores más inmaduros, incluyendo CSH, eran capaces de dar origen a cultivos celulares a largo plazo en presencia de estroma medular o de medio condicionado con estroma. Algunas técnicas aprovechan esta propiedad para detectar *cobblestone area forming cells* (CAFC; “células formadoras de áreas de empedrado”) o *long term culture initiating cells* (LTCIC; “células iniciadoras de cultivos a largo plazo”).

La conclusión alternativa que puede obtenerse de las limitaciones de los cultivos líquidos de MO es que los esfuerzos técnicos realizados para cultivar células hematopoyéticas *ex vivo* han sido incapaces de reproducir aquellos elementos de la

biología de la CSH que ocurren *in vivo* y que sólo podrían ser emulados en circunstancias ideales. Sin embargo, son una herramienta útil de estudio de hematopoyesis a corto plazo.

1.2.3. Estudio del trasplante mediante modelos *in vivo*

Los estudios *in vitro* no son capaces de dar respuesta al problema clave del trasplante: la capacidad de las CSH de repoblar la hematopoyesis a largo plazo. La necesidad de la puesta a punto de modelos para el estudio de injerto y diferenciación de las células hematopoyéticas humanas primitivas *in vivo* ha llevado al desarrollo de varios modelos animales en ratones inmunodeficientes. Consisten en trasplantar un producto celular a animales inmutotolerantes y observar su capacidad de dar origen a una hematopoyesis multilineal completa. Para ello se utilizan ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) obtenidos por una mutación espontánea en la cepa de laboratorio Balb/c comúnmente empleada en distintos modelos de enfermedad. Posteriormente se desarrolló una nueva cepa, el ratón NOD/LtSz-scid (NOD/SCID) que se ha desarrollado mediante el cruce de ratones SCID con ratones diabéticos no obesos (NOD/Lt), lo que permite obtener un ratón más inmunodeprimido, con ausencia de células NK³⁶. Varios autores han estudiado este modelo animal llegando a determinar que el nivel de injerto de células humanas tras xenotrasplante de esplenocitos³⁷, CMN de SP³⁸, MO³⁹ o SCU⁴⁰ es entre cinco y diez veces superior al que puede conseguirse con los mismos trasplantes en el clásico ratón SCID.

Los avances en el conocimiento a nivel de sistema inmune han llevado a desarrollar muchas otras cepas de ratones inmunodeprimidos basándose en la supresión de diversos componentes mediadores del reconocimiento antigénico como por ejemplo el ratón nulo para la β 2microglobulina.

1.2.4. Acondicionamiento

El propio término “acondicionamiento” ya refleja el objetivo que se consideraba primordial en estos tratamientos: preparar la MO para que pudiera injertar el sistema hematopoyético del donante. Para ello, en los primeros trasplantes, se consideraba imprescindible erradicar la hematopoyesis del paciente mediante una quimioterapia completamente mieloablativa, además de profundamente inmunosupresora. Por añadidura, las indicaciones primordiales del trasplante eran las leucemias, con lo que el efecto mieloablativo resultaba terapéutico en sí mismo. Con estas premisas, las combinaciones de agentes alquilantes a dosis cercanas al máximo tolerable resultaron una de las alternativas preferidas por los clínicos. La combinación de busulfán y ciclofosfamida ha sido y sigue siendo uno de los regímenes más utilizados para el trasplante⁴¹.

En el caso del TPH autólogo, la capacidad terapéutica reside en el tratamiento con altas dosis de quimioterapia, asociada o no a radioterapia, durante el acondicionamiento. En este caso, el TPH en sí no es sino la estrategia que permite administrar un régimen intensivo sin comprometer el funcionamiento del sistema hematopoyético a medio y largo plazo. En esto se diferencia del trasplante alogénico, en que el efecto inmunoterápico conocido como injerto contra tumor desempeña un papel fundamental, lo que ha permitido en algunos casos reducir la intensidad del acondicionamiento.

Unos días después de la administración del régimen de acondicionamiento se produce un periodo de aplasia, reflejo de la intensa toxicidad de este tratamiento sobre los progenitores hematopoyéticos de la MO. Las complicaciones derivadas de esta aplasia son el origen de la mayor parte de la morbilidad y mortalidad que sufren los pacientes sometidos a un TPH autólogo a corto y medio plazo^{42;43}.

Aunque en un sentido biológico estricto las CPH injertan unas horas después de su infusión, en un sentido clínico se entiende convencionalmente como injerto hematopoyético el momento en el que tenemos constancia por el hemograma de que el paciente recupera un número mínimo de granulocitos, leucocitos y plaquetas independientemente del soporte. Este momento supone sin duda el final del periodo más crítico del trasplante, y señala una disminución radical del riesgo de mortalidad infecciosa y hemorrágica.

El tratamiento con quimio-radioterapia a alta dosis, unido al efecto de los tratamientos anteriores y al efecto de la propia neoplasia del paciente, compromete casi todos los mecanismos del sistema inmunitario^{44:45}. Sin embargo, de entre todos ellos, la profunda neutropenia es la que se asocia con un riesgo mayor a corto plazo. Las complicaciones infecciosas son responsables de la mayoría de los fallecimientos por causa tóxica en el postrasplante inmediato⁴³. Hasta la consecución del injerto hematopoyético el riesgo de una infección grave bacteriana o fúngica sigue siendo elevado. La disminución del tiempo de injerto es lo que se persigue con la administración de factores de crecimiento postrasplante⁴⁶. Sin embargo, su mecanismo de acción pasa por estimular la proliferación y diferenciación de los precursores granulocíticos, por lo que en ausencia de estos, su efecto es irrelevante⁴⁷.

El tiempo hasta el injerto hematopoyético es variable de unos pacientes a otros. En términos teóricos, múltiples factores influyen en el periodo que dura la aplasia: tipo de neoplasia, infiltración de la MO, situación de la enfermedad, volumen de tratamiento previo con citostáticos o con radioterapia, acondicionamiento que se utiliza, número de progenitores hematopoyéticos que se trasplantan, uso de factores de crecimiento postrasplante, etc. Todos ellos se valoran desde un punto de vista exclusivamente hematopoyético, olvidando que muchos de estos factores (como el tipo de neoplasia, la situación de la enfermedad o el

acondicionamiento) están implicados también en el desarrollo de daño a nivel del estroma medular. Hasta el momento actual este daño no se ha valorado y por tanto no se han tomado medidas para prevenirlo o tratarlo en el momento del trasplante. Estas medidas podrían ser útiles en la disminución del tiempo hasta el injerto y por tanto en la reducción de la morbi-mortalidad asociada al TPH.

1.2.5. Daño en el estroma

Como ya se ha descrito previamente, tras un TPH el estroma medular se encuentra dañado. Más concretamente, datos de nuestro grupo, indican una disminución en la función hematopoyética *in vitro* después del trasplante que puede llevar a una disminución o incluso un fallo en el injerto hematopoyético postrasplante⁴⁸.

Este daño a nivel del estroma puede deberse en parte a la enfermedad de base. Si atendemos a la CSM como progenitora del estroma medular, diversos autores han descrito anomalías tanto a nivel genómico como funcional. Datos publicados por nuestro grupo indican anomalías en las CSM cuando provienen de pacientes con SMD o PTI antes de iniciar el tratamiento^{49;50}.

Pero además de la enfermedad de base, que puede incluso no afectar a la MO, el acondicionamiento recibido antes del TPH provoca daños a nivel del estroma. Por un lado, diversos grupos, entre los que se encuentra el nuestro, han descrito estas anomalías a nivel de estroma por su dificultad e incluso incapacidad para dar lugar a cultivos a largo plazo y por tanto de soportar hematopoyesis *in vitro* a partir de muestras de MO de pacientes sometidos a TPH⁵¹. Por otro lado, se ha estudiado más a fondo este daño causado por la radio/quimioterapia recibida en el acondicionamiento tanto en la población mesenquimal como en estromas mediante

modelos generados *in vitro*. Concretamente, el grupo de Gibson, ha destacado la acción que agentes quimioterápicos como el etopósido, melphalan, o ciclofosfamida producen sobre la función del estroma reduciendo su viabilidad, capacidad de adhesión mediante reducción de moléculas como el VCAM-1 o disminución de la quimiotaxis con células hematopoyéticas por alteración de la expresión de SDF1^{52;53}.

1.2.6. Fallo de injerto

Aunque cada vez es menos frecuente, en algunos pacientes no se recupera la hematopoyesis tras el trasplante (fallo primario) o se pierde tras un periodo de recuperación inicial (fallo secundario). Es más frecuente en pacientes con anemia aplásica previamente hipertransfundidos y cuando se emplean productos celulares en los que se han eliminado los linfocitos T como profilaxis para la EICH. En algunos casos, se pueden tratar con factores de crecimiento hematopoyético (G-CSF o GM-CSF) sobre todo si es tras un trasplante autólogo pero los resultados son poco satisfactorios y puede requerir un segundo trasplante.

El fallo de injerto es una complicación del TPH causada normalmente por resistencia inmunológica a las células del donante o por tener un número inadecuado de progenitores. La incidencia es baja en trasplantes ablativos HLA compatibles pero es un evento significativo en casos de intensidad reducida, con incompatibilidad HLA, trasplantes de SCU o receptores que han sido aloinmunizados.

1.2.7. Métodos de optimización del injerto

Hasta el momento actual, la mayoría de los intentos de optimizar el TPH se han basado en: el uso de fármacos o factores de crecimiento con el fin de estimular la población hematopoyética, mejora de los sistemas de recolección para aumentar el

Introducción

número de progenitores e incluso intentar expandir las CPH *ex vivo* antes de su infusión y combinar células de varios donantes o de distintas fuentes celulares en el caso de la SCU. Todo ello con el fin de aumentar o mejorar las condiciones de la población hematopoyética pero sin atender al micromedioambiente de las mismas: el estroma medular que soporta y regula a las células hematopoyéticas y que, como hemos descrito anteriormente, se encuentra dañado en aquellos pacientes sometidos a trasplante.

A través del estroma, tanto de sus tipos celulares como por los componentes de la matriz, se regula el anclaje de la CSH a la MO (Tabla 1).

Tabla 1: Función de las distintas vías de unión de la CSH con el estroma.

Ligando MO	Receptor CSH	Función
SDF1	CXCR4	Movilización, quimiotaxis
E-,P-,L-Sel	PSGL-1	Anidamiento
VCAM-1/CD106, fibronectina	VLA4	Anidamiento, movilización
Fibronectina	VLA5	Anidamiento
MAdCAM-1	LPAM-1	Anidamiento
Laminina-8,10	$\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$	Anidamiento
HA	CD44	Anidamiento, movilización
N-Cadherina	N-Cadherina	Injerto
SCF	c-kit	Injerto, movilización
Ang-1	Tie-2	Injerto
Integrinas, CD44, fibronectina, colágeno, Ca^{2+}	OPN	Injerto
Ca^{2+}	CaR	Injerto

SDF1: Factor derivado del estroma 1; CXCR4: Receptor 4 de quimiocinas; Sel: Selectina; PSGL-1: Ligando de glicoproteína P-selectina; VCAM-1: Molécula de adhesión a célula endotelial; VLA4: Integrina $\alpha 4\beta 1$; VLA5: Integrina $\alpha 5\beta 1$ MAdCAM-1: Molécula de adhesión a célula mucosa; LPAM-1: integrina a $\alpha 4\beta 1$; HA: Ácido hialurónico; SCF: Factor de célula stem; Ang-1: Angiopoyetina 1; OPN: osteopontina; Ca^{2+} : Calcio; CaR: Receptor de calcio

En un TPH, en el que se encuentra dañado el estroma encargado del anclaje de la población hematopoyética, la restauración de este estroma puede producir una mejora del injerto. Por ello durante los últimos años se ha planteado la idea de que la infusión de CSM en el trasplante podría mejorar o acelerar el injerto hematopoyético. Con esta finalidad se han sentado las bases para estudios destinados a aclarar este efecto. Estos estudios han desembocado en la realización de algunos ensayos clínicos, inicialmente con el fin de demostrar la bioseguridad de este tipo celular y

Introducción

comprobar su eficacia en casos de recaída o fallo de injerto en pacientes sometidos a trasplante haploidéntico⁵⁴⁻⁵⁶.

2. Hipótesis

Tanto la enfermedad de base como el acondicionamiento recibido por los pacientes en el contexto del TPH puede dañar el estroma de la MO y sus consecuencias pueden ser una ausencia de injerto hematopoyético o un bajo injerto. Puesto que las CSM son las progenitoras de este estroma medular, la infusión de CSM sanas en el momento del trasplante puede restaurar el estroma y recuperar o aumentar la hematopoyesis, mejorando así el injerto. Este efecto puede ejercerse por acción de dichas células mesenquimales sobre los progenitores hematopoyéticos o sobre las propias células del estroma del receptor. De confirmarse esta hipótesis, las CSM mostrarían su utilidad en el trasplante hematopoyético con riesgo de disfunción del injerto.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Estudiar el papel de las células *stem* mesenquimales (CSM) para favorecer el injerto y mantenimiento de la hematopoyesis sobre estromas dañados en modelos *in vitro* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

1. Valorar mediante estudios *in vitro* e *in vivo* la capacidad de las CSM de acelerar el injerto hematopoyético.
2. Estudiar los mecanismos por los que las CSM favorecen la hematopoyesis *in vitro*: Posible acción de las CSM sobre las células progenitoras hematopoyéticas (CPH).
3. Analizar si las CSM son capaces de injertar en el estroma del receptor, cómo se movilizan tras su infusión y los mecanismos que influyen en dicho injerto.

4. Material y Métodos

4.1. Materiales: células y animales

Para llevar a cabo tanto los estudios *in vitro* como los estudios *in vivo*, se emplearon muestras procedentes de: MO de donantes sanos, concentrados celulares de procesos de leucoaféresis de donantes de TPH alogénico y SCU de recién nacidos humanos obtenidas del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona y desechadas por su bajo contenido celular.

Todos los sujetos firmaron el consentimiento informado y el procedimiento se realizó con la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca.

Los datos de las distintas fuentes celulares se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de los sujetos cuyas muestras se han analizado.

	MUESTRAS DE MO (n=35)	MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL (n=25)	MUESTRAS DE LEUCOAFÉRESIS (n=25)
EDAD*	44 (31-68)	-	39 (21-64)
SEXO (H/M)	19/16	12/13	11/14

H: hombre; **M:** mujer. *****: Resultados expresados en mediana (rango).

Para los diferentes estudios *in vivo* en modelo animal se emplearon 185 ratones hembra NOD.CB17-*Prkdc^{scid}*/NcrCrl (NOD/SCID) de 7 semanas. Estos ratones fueron seleccionados por ser una cepa caracterizada por la ausencia de linfocitos B y T, linfopenia, hipogammaglobulinemia y un micromedioambiente normal, haciendo de ellos un modelo óptimo para trasplante xenogénico.

4.2. Métodos

4.2.1. Aislamiento y caracterización de las células

4.2.1.1. Aislamiento y caracterización de las CSM

4.2.1.1.1. Obtención de la MO

La extracción de MO se realizó en todos los casos bajo anestesia general, mediante punción en la espina ilíaca postero-superior en sujetos sometidos a cirugía ortopédica o traumatológica. Se utilizaron tubos estériles (Venoject; Terumo®) a los que se añadió heparina libre de aditivos (Heparina 5000U/ml; Seromed Biochrom KG).

4.2.1.1.2. Separación de CMN

Reactivos necesarios:

- Medio Hanks (Hanks Salt Solution, Gibco®, Invitrogen™)
- Ficoll (Ficoll-Paque, densidad:1.077k, GE Healthcare BioSciences, Buckinghamshire, UK)
- Medio de expansión de CSM.

Método:

Tras comprobar la ausencia de coágulos o restos de fibrina en la muestra de MO, ésta se diluyó en medio Hanks y posteriormente se separó mediante gradiente de densidad por centrifugación con Ficoll durante 30 minutos a 500 xg. (Figura 5) siguiendo el método descrito previamente por Minguell⁵⁷. Las CMN recuperadas de la interfase se lavaron 2 veces con medio Hanks (10 minutos a 300xg). Finalmente el botón celular se resuspendió en 1ml del medio de expansión de CSM para proceder al recuento celular en cámara de Neubauer.

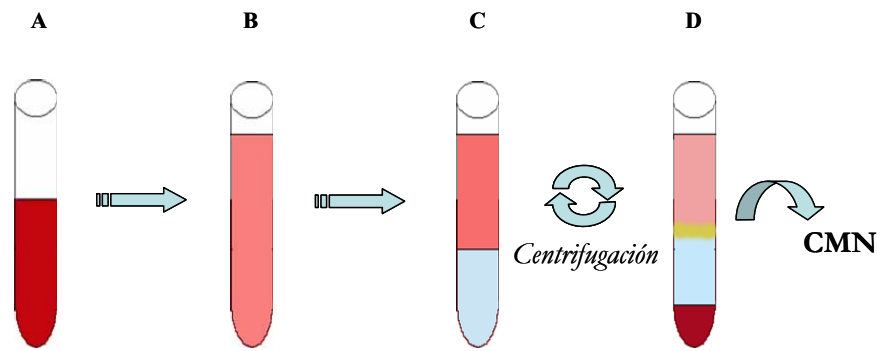


Figura 5: Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad.

A) Muestra MO. **B)** Dilución de la muestra con Hanks. **C)** Muestra diluida sobre Ficoll. **D)** Interfase en la que están presentes las CMN.

4.2.1.1.3. Cultivo y expansión de CSM

Reactivos necesarios:

- Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose (DMEM) (GIBCO®, Invitrogen™ Corporation, Paisely, UK).*
- Albúmina de suero bovino (SBF) (BioWhittaker, Lonza)
- Antibiótico Penicillin (10^5 U/ml)/Streptomycin (10^5 µg/ml) (GIBCO®, Invitrogen™ Corporation, Paisely, UK).
- PBS estéril (GIBCO®, Invitrogen™ Corporation, Paisely, UK).
- Trypsin-EDTA .05% 1X (GIBCO®, Invitrogen™ Corporation, Paisely, UK).

*Todos los lotes de suero y de DMEM fueron testados previamente para comprobar su adecuada funcionalidad.

Método:

Para la expansión de CSM se empleó el medio de cultivo previamente descrito consistente en DMEM suplementado con SBF al 10% y penicilina/estreptomicina 1%⁵⁸. Una vez mezclados los componentes, se filtraron con $0.22\mu\text{m}$, se alicuotaron y se mantuvieron a 4°C durante su utilización.

Material y Métodos

Las CMN obtenidas de MO se plantaron a una concentración de 10^6 células/cm² en frascos de cultivo de fondo plano (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) con medio de expansión y se incubaron en estufa a 37°C, 90% de humedad y 5% CO₂. A los 5 días se retiraron las células no adheridas y se renovó el medio de cultivo. Se mantuvo el cultivo hasta alcanzar el 80-90% de confluencia, cambiando el medio cada 3-4 días. Una vez que las células alcanzaron este punto, se procedió a despegarlas para realizar el primer pase mediante tripsinización. Para ello, se retiró todo el medio de cultivo del frasco, se lavó éste con PBS estéril, y se incubó con tripsina durante 5 minutos a 37°C en atmósfera saturada de humedad y en presencia de CO₂. Posteriormente, se neutralizó la tripsina con suero fetal. Estas células se plantaron de nuevo para su expansión a una concentración de 5000 células/cm² en frascos de cultivo de mayor superficie.

La selección de la población mesenquimal se realizó a través de sucesivos pases en cultivo y siempre fue caracterizada en pase 3, siguiendo los criterios mínimos establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular⁵⁹.

4.2.1.1.4. Caracterización inmunofenotípica de las CSM

Una vez obtenida la población mesenquimal en pase 3, se realizó su caracterización inmunofenotípica, según se describe en el apartado de citometría, empleando el siguiente panel de anticuerpos monoclonales en combinaciones de cuatro colores (FITC/PE/PerCPCy5.5/APC) e incluyendo además un tubo control de CSM sin marcar para corregir la elevada autofluorescencia de estas células:

Tubo 1: CONTROL

Tubo 2: CD90/CD166/ anti-HLA-DR /-

Tubo 3: CD34/CD73/CD45/CD105

Tubo 4: CD44/CD14/CD19/-

4.2.1.1.5. Diferenciación de CSM

Reactivos necesarios:

- Medio de diferenciación osteogénica (NH Osteodiff Medium, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).
- Medio de diferenciación adipogénica (NH Adipodiff Medium, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).
- Medio de diferenciación condrocítica (NH Chondrodiff Medium, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).
- Etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- PBS.
- NBT/BCIP solution (Nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche, Basel, Switzerland).
- Oil-Red-O solution (Certistain® Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Paraformaldehído (Panreac, Barcelona, España).
- Hematoxilina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Método:

Para la diferenciación a osteoblastos, se plantaron CSM de cada muestra en 2 placas sobre porta de 9.6 cm² (Nunc, Denmark) a una densidad de 5000 células/cm² y se mantuvieron con medio de expansión hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. En este momento se cambió el medio de expansión por medio de diferenciación osteogénica en una de las placas, mientras la otra se mantuvo con medio de expansión para utilizarse como control negativo. El recambio de medio se realizó cada 3-4 días. Tras 10 días de cultivo, se lavaron con PBS, se fijaron con etanol frío al 70% durante 10 minutos y se detectó la actividad fosfatasa alcalina mediante tinción con la solución NBT/BCIP siguiendo las indicaciones del fabricante.

Material y Métodos

En el proceso de diferenciación a adipocito, las CSM se plantaron en 2 placas sobre porta bajo las mismas condiciones de cultivo que en la diferenciación hacia osteoblastos y una vez alcanzada la confluencia, en uno de ellos, se cambió el medio de expansión por medio de diferenciación hacia adipocito y el otro se mantuvo con medio de expansión (control negativo). Tras 21 días de cultivo en medio de diferenciación se lavaron con PBS, se fijaron con etanol al 70% y se determinó la aparición de vacuolas lipídicas mediante tinción con rojo al aceite.

Para la diferenciación condrogénica, 5×10^5 CSM en pase 3 se centrifugaron en tubos cónicos de 15ml (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) y, sin resuspender el botón celular, se mantuvieron 21 días en cultivo con medio de diferenciación condrogénica o con medio de expansión. Pasado este tiempo, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% y se valoró la diferenciación hacia condrocito mediante marcaje de colágeno tipo II por técnicas de inmunofluorescencia.

4.2.1.2. Línea celular 293T

Reactivos necesarios:

- Medio de expansión de CSM

Método:

La línea celular 293 deriva de las células del epitelio renal humano (HEK: *human embryonary kidney*) transformado con el gen E1A de adenovirus. La línea 293T es un derivado de la 293 que además expresa el antígeno T largo del virus SV40, que permite la replicación episomal de los plásmidos que contengan un origen y región promotora temprana de SV40.

El cultivo de esta línea celular se realiza en las mismas condiciones de cultivo empleadas para las CSM, aunque debida a que las 293T proliferan muy rápido suelen tripsinizarse 2 veces por semana y se subcultivan a razón 1:20.

4.2.1.3. Aislamiento y caracterización de los progenitores hematopoyéticos (CD34⁺) de SP

4.2.1.3.1. Obtención de leucoaféresis

La movilización de las células progenitoras desde MO a SP se llevó a cabo tras la administración de G-CSF a dosis estándar de 5µg/kg/12h durante al menos 4 días. El proceso de aféresis comenzó en el día +5 y se realizó en un sistema de aféresis Cobe Spectra™ (Lakewood, Colorado, versión 7.7).

4.2.1.3.2. Separación celular

Reactivos necesarios:

- Suero fisiológico. Viaflo Cloruro sódico 0.9% (Baxter SL, Valencia, España)
- CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)

Método:

El concentrado celular procedente de leucoaféresis se lavó 2 veces con suero fisiológico, se filtró (Falcon 40µm CellStrainer, Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Bélgica) para deshacer posibles grumos y se llevó a cabo el recuento celular en cámara de Neubauer. Una vez calculado el número de células, se procedió a la selección inmunomagnética en el AutoMacs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) utilizando el kit de aislamiento de células progenitoras CD34⁺ según describe el fabricante (Figura 6). En la separación se empleó el programa *posseld* que mediante pase por 2 columnas inmunomagnéticas permite obtener una mayor pureza en la selección positiva. Al final del proceso se determinó el porcentaje de células

positivas mediante CMF de acuerdo a sus características de tamaño y granularidad (FSC/SSC) y patrón de expresión de CD34.

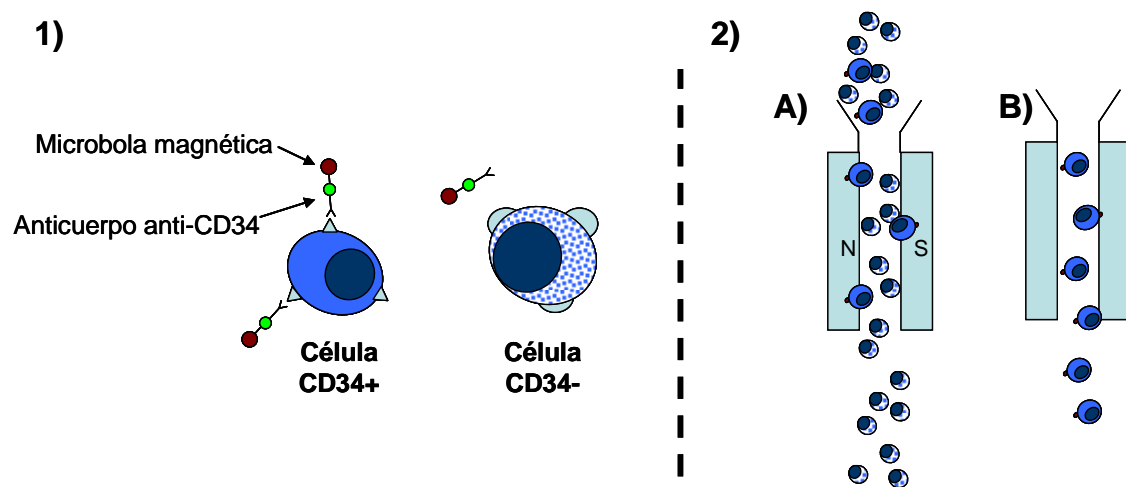


Figura 6: 1) Proceso de marcate celular según la expresión de CD34. 2) Separación de las poblaciones CD34⁺ y CD34⁻: A) Deplección celular de la fracción CD34⁻; B) Selección de las células CD34⁺ una vez retirado el campo magnético.

4.2.1.4. Aislamiento y caracterización de los progenitores hematopoyéticos (CD34⁺) de SCU

Reactivos necesarios:

- Suero fisiológico
- Ficoll
- CD34 MicroBead Kit

Método:

La obtención de CD34⁺ de SCU se realizó a partir de unidades completas de cordón umbilical procesadas en el Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona. Tras diluir las muestras en suero fisiológico (1:2), se obtuvo la fracción de CMN mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll, como se detalla en las muestras de MO. Las CMN obtenidas se lavaron 2 veces con suero fisiológico. Tras el

recuento celular se procedió a la selección inmunomagnética mediante el kit de aislamiento de CD34 en el AutoMacs tal como se describió en el punto anterior.

4.2.2. Estudios *in vitro*

4.2.2.1. Cultivos a largo plazo en dos etapas

Reactivos necesarios:

- Medio de Cultivo a Largo Plazo (MCLP).*
- Tripsina.
- Etopósido (Sigma-Aldrich,Steinheim ,Germany).**
- DMSO (Sigma-Aldrich,Steinheim ,Germany).
- Medio semisólido Methocult H4534 (Stem Cell Technologies, Grenoble, France).

* El MCLP se elaboró utilizando IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco[®], Invitrogen[™] Corporation, Paisely, UK) a una osmolaridad de 350 mOsm/l suplementado con 10% SBF, 10% suero de caballo (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 1% Hidrocortisona 10-5M (Sigma-Aldrich,Steinheim ,Germany) y 1% antibiótico. Una vez mezclado se filtró, alicuotó y congeló a -20°C hasta su utilización.

** El etopósido se reconstituyó en DMSO a una concentración de 20mg/ml, se alicuotó y se almacenó a -20°C hasta uso, momento en el que se diluyó en medio de cultivo a la concentración necesaria (50-100µM) según el grupo experimental. Las concentraciones de etopósido se seleccionaron por ser las que habitualmente se encuentran en MO de pacientes sometidos a tratamiento con etopósido^{53,60}.

Método:

Los cultivos se iniciaron a partir de una capa adherente de CSM confluyente en pase 3 en frascos de cultivo de 12.5 cm² (Falcon, Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Bélgica). Se mantuvieron durante 3 semanas en MCLP para inducir su diferenciación a estroma, obteniendo así un estroma de MO a partir de CSM (EMO). Posteriormente, se indujo daño a nivel de estroma mediante la adición de etopósido.

Material y Métodos

La mitad de los cultivos fueron tratados con etopósido 100 μ M mientras el resto, utilizado como control, se mantuvo con DMSO, por ser el excipiente empleado para reconstituir el etopósido. A las 48h los cultivos se lavaron con medio fresco y se dejaron reposar 6 días hasta su utilización siguiendo el modelo previamente descrito⁶⁰. Con el fin de determinar si las CSM o la fracción de células accesorias CD34⁻ eran capaces de aumentar la hematopoyesis *in vitro* se añadieron 2 x 10⁵ células CD34⁺ y/o 2 x 10⁵ células CD34⁻ y/o 2 x 10⁵ CSM distribuidas en 8 grupos experimentales, como se detalla a continuación (Tabla 3).

Tabla 3: Combinaciones de células en el segundo inóculo de los cultivos a largo plazo en 2 etapas.

	Concentración de etopósido (μ M)	Nº células añadidas x10 ⁵ / ml cultivo		
		CD34 ⁺	CD34 ⁻	CSM
EMO/ CD34⁺	0	5	0	0
EMO/ CD34⁺+CD34⁻	0	5	5	0
EMO/ CD34⁺+CSM	0	5	0	5
EMO/ CD34⁺+CSM+CD34⁻	0	5	5	5
Eto-EMO/ CD34⁺	100	5	0	0
Eto-EMO/ CD34⁺+CD34⁻	100	5	5	0
Eto-EMO/ CD34⁺+CSM	100	5	0	5
Eto-EMO/ CD34⁺+CSM+CD34⁻	100	5	5	5

EMO: estroma de MO formado a partir de CSM; Eto- EMO: EMO tratado con etopósido.

Se testaron las siguientes 4 condiciones de cultivo: 1) EMO con células CD34⁺; 2) EMO con células CD34⁺ y CD34⁻; 3) EMO con células CD34⁺ y CSM de un tercer donante (Tp-CSM); y 4) EMO con células CD34⁺, CD34⁻, y Tp-CSM. Estas cuatro condiciones se mantuvieron en paralelo en cultivos tratados con

etopósido y sus respectivos controles tratados únicamente con DMSO siguiendo el esquema mostrado en la Figura 7. Cada semana se evaluó la aparición de adipocitos y áreas de *cobblestone* así como la confluencia del estroma⁵¹.

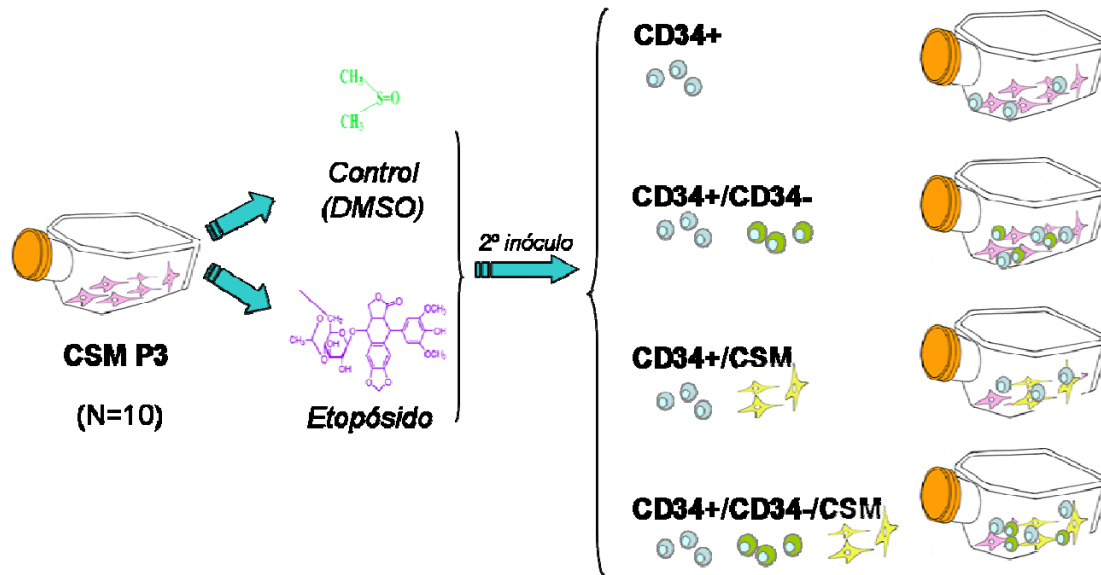


Figura 7: Esquema de los cultivos a largo plazo diseñados para estudiar el efecto de las células mesenquimales (CSM) y de la fracción de células CD34⁺ en la hematopoyesis *in vitro*.

Además, semanalmente se cambió la mitad del medio por MCLP fresco obteniendo así la mitad de las células no adherentes, que fueron contadas y plantadas en medio semisólido para cuantificación de progenitores CFU-GM. Al final del cultivo, tras 5 semanas, se recogió tanto la fracción no adherente como la adherente mediante tripsinización y se cuantificaron los progenitores.

Para cuantificar CFU-GM se plantaron 5×10^3 células en placas de 24 pocillos (Costar, Corning, NY, USA) con 0.5ml de medio semisólido Methocult. Las placas se mantuvieron durante 14 días a 37°C en incubador de CO₂ tras lo cual se contaron en un microscopio invertido siguiendo los criterios estándar de cuantificación⁴⁸. Los resultados obtenidos se expresaron como número de CFU-GM por cada 10^5 células sembradas y como número total de de CFU-GM presentes en cada cultivo.

4.2.2.2. Cultivos para analizar el efecto de las CSM sobre el estroma dañado

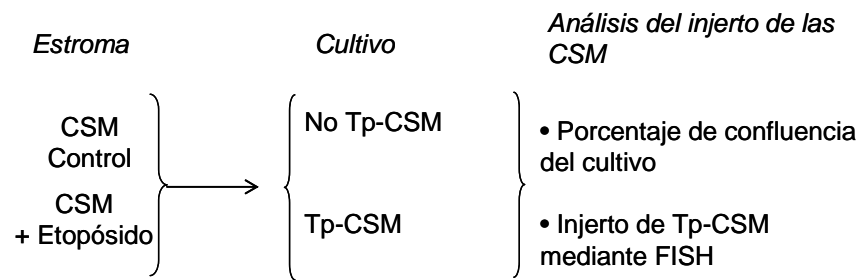
Reactivos necesarios:

- Medio de expansión de CSM.
- DMSO.
- Etopósido.

Método:

Con el fin de saber si las CSM injertaban en los estromas dañados o si su efecto se debía a mecanismos paracrinos, se establecieron cultivos de EMO que tras haber sido tratados con etopósido recibieron un segundo inóculo con CSM de un donante de distinto sexo. Estos experimentos se realizaron en paralelo con controles que únicamente fueron tratados con DMSO y con cultivos tratados con distintas concentraciones de etopósido (50 y 100 μ M). Así mismo, para analizar el efecto paracrino se mantuvieron cultivos de estromas igualmente tratados en los que se añadió únicamente el sobrenadante procedente de la expansión de CSM sanas (Figura 8).

A) Efecto directo de las CSM



B) Efecto paracrino de las CSM

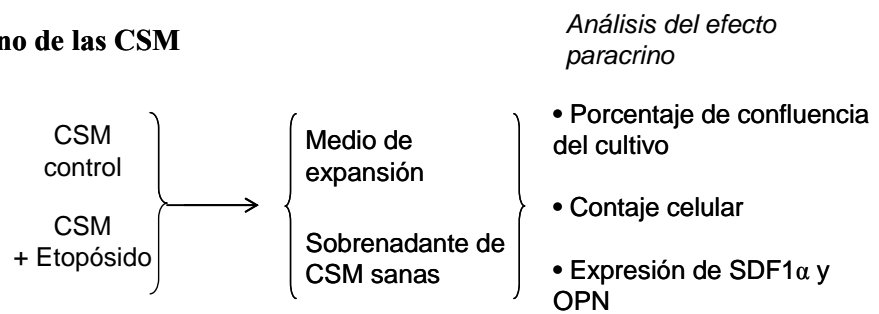


Figura 8: Esquema de las condiciones de cultivo estudiadas para analizar los mecanismos a través de los cuales las CSM son capaces de mejorar los estromas dañados.

Tp-CSM: CSM de un tercer donante; FISH: Hibridación in situ fluorescente; OPN: osteopontina

Con el fin de saber si las CSM procedían del estroma inicial o del segundo inóculo, los cultivos que habían recibido Tp-CSM se analizaron mediante FISH para cromosomas sexuales a los 5 días (corto plazo) y a las 2 semanas (largo plazo).

Para determinar si las CSM podían actuar por mecanismos paracrinos, en los cultivos mantenidos con sobrenadante de CSM sanas se analizó tanto la confluencia como el contaje de las células existentes mediante método semicuantitativo: se dividió la superficie del frasco de cultivo en 150 cuadrantes, se contó el número de células de 20 seleccionados al azar y se estimó el número de células totales. Mediante técnicas de inmunofluorescencia analizamos si el daño causado en el estroma afectaba a la expresión de moléculas como OPN y SDF1, importantes en la regulación del nicho hematopoyético⁸.

4.2.2.3. Estudio del efecto de las CSM sobre progenitores hematopoyéticos

Reactivos necesarios:

- MCLP.
- DMSO.
- Etopósido.

Método:

Para evaluar la influencia de las CSM (tanto sanas como tratadas con etopósido) sobre la población hematopoyética, se plantearon los siguientes estudios: se partió de CSM en tercer pase plantadas en el compartimento inferior de placas con membrana tipo *transwell* de 6 pocillos (Costar, Corning, NY, USA) tratadas o no con etopósido 100µM durante 48 horas. A las tres semanas postratamiento, se añadió un segundo inóculo de 2×10^5 células CD34⁺ bien directamente sobre las CSM del compartimento inferior de la placa (efecto por contacto directo) o sobre la membrana del compartimento superior (mecanismo paracrino). En paralelo, al mismo tiempo que se añadían las CSH, se añadieron o no Tp-CSM sobre la población mesenquimal que había sido previamente tratada con etopósido (Figura 9).

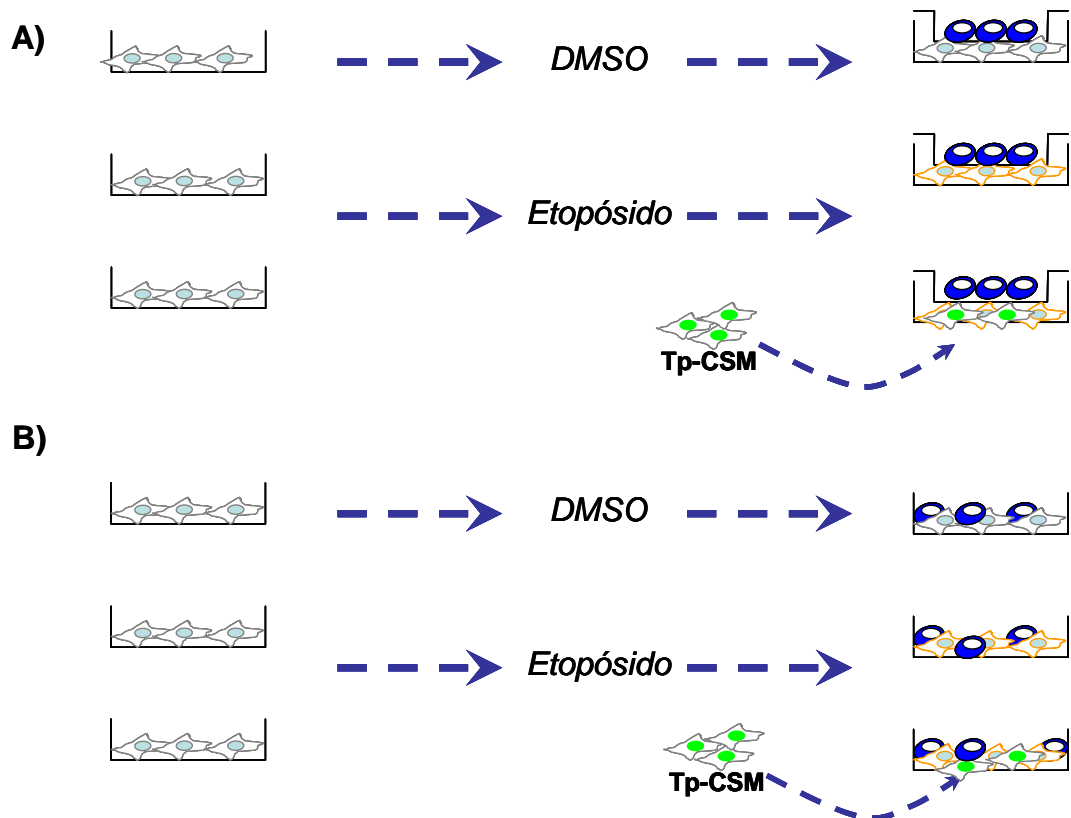


Figura 9: Esquema de los cultivos realizados en transwell (A) o en contacto directo (B) para estudiar el efecto de las CSM sanas o tratadas sobre la población hematopoyética y de la adición de Tp-CSM.

A los 3 y 5 días mediante CMF se analizó en las células hematopoyéticas: la viabilidad celular (AnexinaV y 7AAD), la proliferación (el ciclo celular), la diferenciación hematopoyética y la expresión de CXCR4 (CD184) y VLA4 (CD49d) empleando el siguiente panel de anticuerpos monoclonales en combinaciones de cuatro colores (FITC/PE/PerCPCy5.5/APC):

Diferenciación: CD164/CD162/ CD45 /CD19

Expresión: CD34/CD49d/CD45/CD184

Las muestras de células hematopoyéticas de los estudios en contacto directo, se obtuvieron tripsinizando la capa del cultivo y dejando las células obtenidas en el incubador de CO₂ a 37°C durante 2h para favorecer la adhesión de las CSM y poder así recoger la fracción hematopoyética en el sobrenadante. En los estudios del

Material y Métodos

mecanismo paracrino se obtuvo la población hematopoyética mediante lavados con PBS del compartimento superior de la placa.

Para el análisis se establecieron 4 poblaciones en función del aumento de la complejidad (SSC), y la expresión de CD45, CD162 y CD164. Así establecimos las siguientes poblaciones que numeramos del 1 al 4 en función de su diferenciación (Figura 10):

Población 1: $SSC^{\text{low}}/CD45^{\text{low}}/CD162^{\text{medium}}/CD164^{\text{low}}$

Población 2: $SSC^{\text{low/medium}}/CD45^{\text{low}}/CD162^{\text{high}}/CD164^{\text{low}}$

Población 3: $SSC^{\text{medium}}/CD45^{\text{high}}/CD162^{\text{high}}/CD164^{\text{medium}}$

Población 4: $SSC^{\text{medium}}/CD45^{\text{high}}/CD162^{\text{high}}/CD164^{\text{high}}$

Para un mejor análisis de las poblaciones, éstas se agruparon en células inmaduras (población 1) y células en diferenciación (poblaciones 2-4) tal como se observa en el ejemplo de la Figura 10.

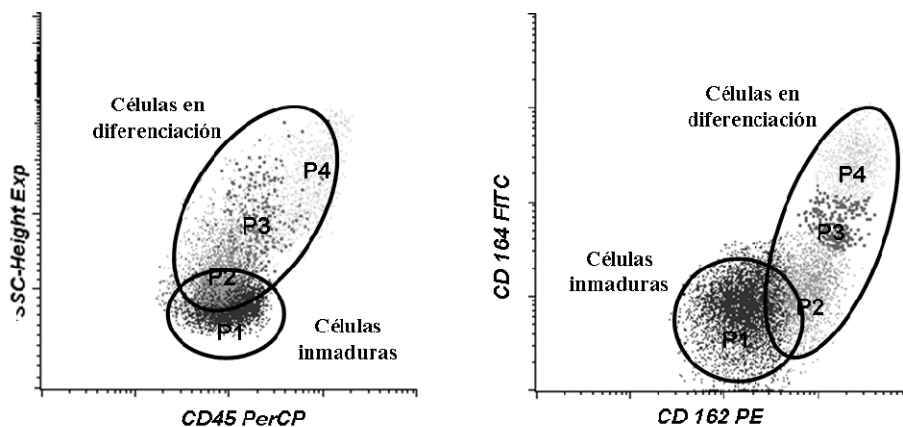


Figura 10: Poblaciones de células hematopoyéticas observadas mediante citometría de flujo. Agrupación de las mismas en células indiferenciadas (inferior) en células en diferenciación (superior).

P1 = población 1 ($SSC^{\text{low}}/CD45^{\text{low}}/CD162^{\text{medium}}/CD164^{\text{low}}$); P2 = población 2 ($SSC^{\text{low/medium}}/CD45^{\text{low}}/CD162^{\text{high}}/CD164^{\text{low}}$); P3 = población 3 ($SSC^{\text{medium}}/CD45^{\text{high}}/CD162^{\text{high}}/CD164^{\text{medium}}$); P4 = población 4 ($SSC^{\text{medium}}/CD45^{\text{high}}/CD162^{\text{high}}/CD164^{\text{high}}$)

4.2.3. Estudios *in vivo*

Se estudió la capacidad de repoblación de las células CD34⁺ humanas (tanto de SP como de SCU) utilizando el modelo de xenotrasplante celular en ratón NOD.CB17-*Prkdc^{scid}* (NOD/SCID) procedente, en nuestro caso, de los laboratorios Charles River. Como acondicionamiento, 6 horas antes de la infusión celular, se irradiaron los animales con 3Gy mediante utilización de una fuente de Cesio 137 (GammaCell 200, Nordion International, Ottawa, ON, Canada).

Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (respecto a la humedad, temperatura, alimentación, etc.) empleando racks ventilados en la zona limpia del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Las manipulaciones relacionadas con el trasplante se realizaron bajo anestesia recibiendo una dosis de 90mg/kg de ketamina (Imalgène 500, Merial, Lyon, France) y 10mg/kg de xilacina (Rompun 2%, KVP Pharma, Bayer Healthcare, Kiel, Alemania) por vía intraperitoneal.

4.2.3.1. Modelo de injerto hematopoyéticos con células CD34⁺ de SP

Para analizar el efecto de las CSM y la vía de administración sobre el injerto hematopoyético, se establecieron 4 grupos en los que se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células CD34⁺ $\pm 5 \times 10^5$ CSM bajo las siguientes condiciones (Figura 13):

- Células CD34⁺ vía intravenosa (IV).
- Células CD34⁺ vía IV y CSM vía intraósea (IO).
- Células CD34⁺ vía IO.
- Células CD34⁺ vía IO y CSM vía IO.

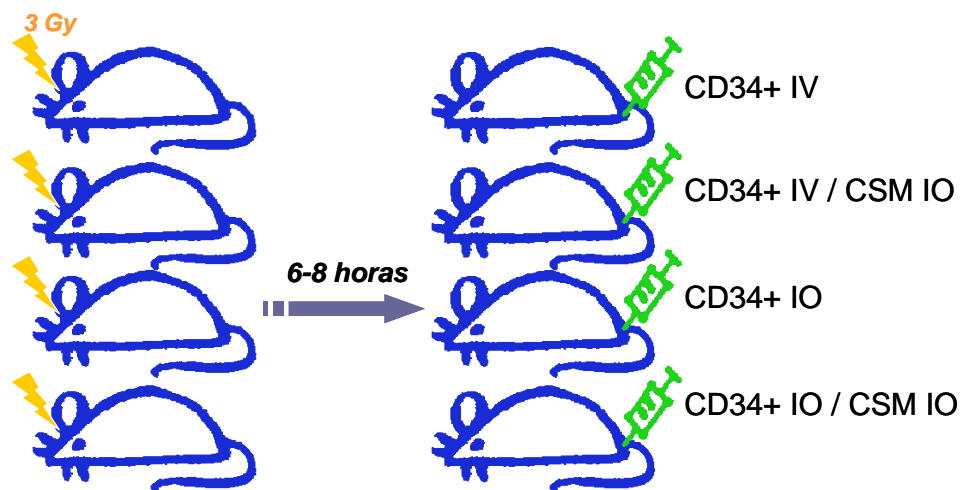


Figura 13: Grupos de estudio empleados en el modelo xenogénico de injerto hematopoyético con células procedentes de sangre periférica movilizada.

La infusión de las células por vía IV se realizó a través de las venas laterales de la cola del ratón tras dilatarlas con lámpara de calor.

La infusión de células por vía IO se realizó en todos los casos en el fémur derecho de los animales. Para ello, tras comprobar que los ratones estaban correctamente anestesiados, se lavó la zona de la rodilla con alcohol y se procedió a perforar la cabeza del fémur con aguja de 25G tal como se muestra en la Figura 14. Tras esto, se cambió a una aguja de menor grosor (27G) con la que se infundieron las células resuspendidas en un volumen final de 20µl de suero fisiológico. Finalmente se añadió un poco de Betadine en la herida. En los casos en los que no había infusión celular se realizó el mismo procedimiento inyectando únicamente suero fisiológico.



Figura 14: Punción intraósea en fémur derecho de ratón.

A las 3 y 6 semanas postrasplante se analizó el quimerismo hematopoyético en muestras de MO de ambos fémures y en SP mediante CMF empleando el siguiente panel de anticuerpos anti-humano:

CD45/CD13/ 7AAD /CD19
 CD45/CD14/7AAD/CD3

El análisis del injerto hematopoyético humano se calculó como el porcentaje de células positivas para CD45 respecto a la celularidad total. El análisis de subpoblaciones se llevó a cabo calculando la proporción de las mismas dentro de las CD45 humanas (Figura 15).

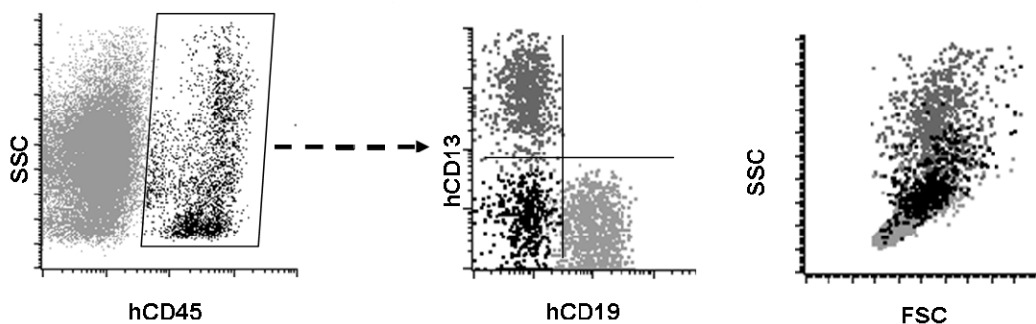


Figura 15: Análisis del injerto hematopoyético humano y de sus poblaciones.

hCD13: Anticuerpo anti-CD13 humano; hCD19: Anticuerpo anti-CD19 humano; hCD45: Anticuerpo anti-CD45 humano; SSC: Side Scatter; FSC: Forward Scatter.

A las 6 semanas se sacrificaron los animales, se extrajo la MO total de ambos fémures y se expandieron CSM hasta pase2, momento en el que se analizó la presencia de CSM humanas mediante FISH para cromosomas sexuales humanos.

4.2.3.2. Modelo de injerto hematopoyético con células CD34+ de SCU

En el modelo de trasplante con progenitores hematopoyéticos de SCU, con el fin de evitar la variabilidad entre sujetos, se infundió en cada caso un *pool* de células CD34⁺ procedentes de al menos 4 unidades de SCU distintas.

Siguiendo el procedimiento de infusión anteriormente descrito para células procedentes de SP movilizada, se establecieron 5 grupos de estudio en los que se infundieron 10^5 células CD34⁺ \pm 5×10^5 CSM bajo las siguientes condiciones: (1) células CD34⁺ vía IV; (2) células CD34⁺ vía IV y CSM vía IO; (3) células CD34⁺ vía IV y CSM vía IV; (4) células CD34⁺ vía IO; (5) células CD34⁺ vía IO y CSM vía IO. En 7 de los 25 lotes de ratones estudiados, se infundieron CSM transducidas con lentivirus.

A las 3 y 6 semanas postrasplante se analizó el quimerismo tanto a nivel hematopoyético como a nivel de estroma del mismo modo realizado en el trasplante con células de SP movilizada.

La localización de las CSM transducidas se analizó mediante bioluminiscencia. Además, se confirmó a las 3 y 6 semanas postrasplante, la localización de las células GFP positivas (CSM humanas) en la estructura del fémur mediante inmunofluorescencia. Para ello, los animales fueron sacrificados y tras obtener ambos fémures se fijaron con paraformaldehído al 4% y se decalcificaron 48h antes de ser embebidos en parafina.

4.2.3.3. Análisis de la bioluminiscencia *in vivo*

Reactivos necesarios:

- Luciferina (Promega, Madison, WI, USA).
- Isoflurano (Forane, Abbot Laboratories, Madrid).

Método:

A los días 0, 2, 5, 7, 14 y 21 postrasplante, se observó la localización de las CSM gracias a la actividad luciferasa que portan tras ser transducidas (Figura 16).

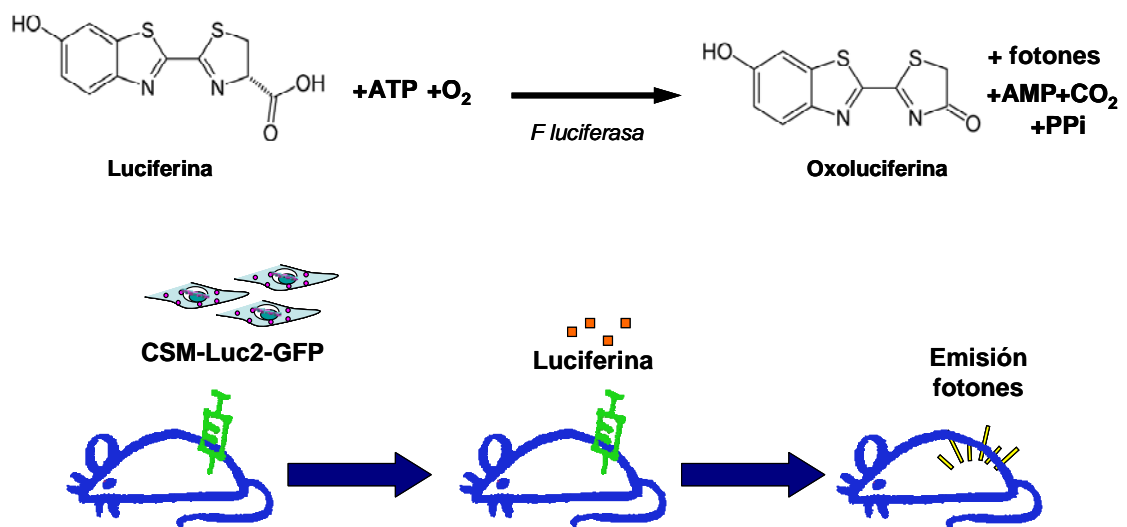


Figura 16: Base de la aplicación de la bioluminiscencia para seguimiento celular *in vivo*.

Para ello, se inyectó a los ratones una dosis de 15µg de luciferinag de ratón empleando una solución de luciferina reconstituida en PBS a una concentración de 15mg/ml. Los animales se anestesiaron con isoflurano y se colocaron en los soportes para adquisición de imágenes del sistema de bioluminiscencia Xenogen IVIS 50 (Xenogen Corporation, Caliper Life Science, Alameda, CA, USA). La adquisición se inició transcurridos 10 min desde la inyección del sustrato (luciferina), momento en el que la luciferasa alcanza su velocidad máxima y permite que la emisión de fotones sea constante. Las imágenes se adquirieron y analizaron empleando el programa Living Image 2.50.1 (Xenogen Corporation, Caliper Life Science, Alameda, CA, USA). Para el

análisis se determinaron las regiones de interés (ROI) basadas en el contorno de las mismas y calculando para cada una de ellas la emisión de fotones/segundo.

4.2.4. Análisis inmunohistoquímico

Reactivos necesarios:

- Paraformaldehído al 4%.
- Sero-albúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-SDF1 α . humano (Abcam, Cambridge, UK)
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-osteopontina humana (Abcam, Cambridge, UK)
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno tipo II humano (Chemicon International, Germany).
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-GFP (Abcam, Cambridge, UK)
- Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG (H+L) conjugado en Cy3 (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK).
- Anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG (H+L) conjugado en Cy2 (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK).
- DAPI.

Método:

Para detectar la expresión de OPN y SDF1 α en los cultivos, las células, crecidas sobre portas pretratados con fibronectina bajo las diferentes condiciones de cultivo, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 2 horas. En el caso de las muestras procedentes de los estudios *in vivo* o de diferenciación a condrocito, los tejidos y órganos estudiados se fijaron con paraformaldehído al 4%, se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron con un microtomo previo a su colocación sobre portas para poder realizar la inmunofluorescencia.

En todos los casos, los portas se lavaron con PBS y se incubaron en suero bloqueante durante 1h en agitación y a temperatura ambiente. El suero bloqueante o de preincubación se preparó disolviendo en PBS los siguientes compuestos: BSA al 1%, suero normal 5% y Triton X-100 al 0.02%. El anticuerpo primario se diluyó en PBS según las recomendaciones del fabricante y las secciones se incubaron en esta solución en agitación durante 48h a 4°C. Tras ser lavadas con PBS, se incubaron durante 1h 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado en Cy2 (verde) o Cy3 (rojo). Finalmente se marcaron los núcleos con DAPI, se montaron los portas y se observaron al microscopio de fluorescencia Leica DMI-6000-B con los filtros correspondientes al fluorocromo utilizado.

4.2.5. Citometría de flujo

4.2.5.1. Inmunofenotipaje

Reactivos necesarios:

- Anticuerpos monoclonales (ver Tabla 4)
- PBS FACSFloW (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA)

Método:

Para las muestras analizadas por CMF se centrifugaron las células y se resuspendieron en PBS en tubos de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) para proceder a su marcaje. Éste se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia directa con los anticuerpos monoclonales indicados, según las cantidades especificadas en la Tabla 4. Tras mezclar bien la muestra y los anticuerpos, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de anticuerpo lavando las células con PBS y centrifugando durante 5 minutos a 700xg. Finalmente se retiró el sobrenadante

Material y Métodos

y se resuspendieron las células en 0,2 ml de PBS, almacenándose a 4°C y al abrigo de la luz hasta el momento de su adquisición en el citómetro de flujo, que en ningún caso superó una hora desde el término del proceso de marcaje.

La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), equipado con un láser de argón sintonizado a una longitud de onda de 488 nm y que emite a una potencia constante de 15 mVatios. La calibración del instrumento se llevó a cabo utilizando los protocolos previamente establecidos por el Servicio de Citometría de nuestro hospital. El soporte informático empleado para la adquisición de muestras fue el programa CellQuest® (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) y para el análisis el programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Spain). Se adquirieron un total de 50.000 células totales para proceder a su caracterización inmunofenotípica.

Tabla 4: Anticuerpos monoclonales utilizados para estudio de CMF.

	FLUOROCROMO	CANTIDAD	PROCEDENCIA
CD3	APC	3µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD13	PE	10µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD14	PE	10µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD19	PerCP Cy5.5	10µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD19	APC	3µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD34	FITC	10µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD44	FITC	10µl	Immunostep, Salamanca, Spain
CD45	FITC	10µl	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany
CD45	PerCP Cy5.5	10µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD49d	PE	10µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA
CD73	PE	10µl	BD Pharmingen Biosciences, San Jose, CA, USA
CD90	FITC	2µl	BD Pharmingen Biosciences, San Jose, CA, USA
CD105	APC	3µl	R&D System, Mineapolis, MN, USA
CD162	PE	10µl	BD Pharmingen Biosciences, San Jose, CA, USA
CD164	FITC	10µl	BD Pharmingen Biosciences, San Jose, CA, USA
CD166	PE	10µl	BD Pharmingen Biosciences, San Jose, CA, USA
CD184	APC	3µl	BD Pharmingen Biosciences, San Jose, CA, USA
Anti- HLA-DR	PerCP	10µl	Becton-Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA

En todos los casos se añadieron los anticuerpos a concentración de saturación. **FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína; **PE:** Ficoeritrina; **PC5:** Ficoeritrina-cianina 5; **APC:** Aloficocianina; **PerCP Cy5.5:** proteína peridinin clorofilica cianina 5.5.

4.2.5.2. Estudio de viabilidad

Reactivos necesarios:

- PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).
- Anticuerpo monoclonal CD45 conjugado en FITC.

Método:

Para el análisis de viabilidad celular se empleó el kit comercial de apoptosis que combina Anexina V conjugada en PE para marcar las células en apoptosis y 7 amino-actinomicina (7-AAD) para marcar las células muertas. Las muestras se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos con CD45-FITC. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de anticuerpo lavando las células con PBS y centrifugando durante 5 minutos a 700xg. Finalmente se retiró el sobrenadante, se resuspendieron las células en 100µl de Binding buffer 1X y se marcaron con Anexina V (5µl) y 7-AAD (5µl) durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de su adquisición.

4.2.5.3. Análisis de ciclo celular

Reactivos necesarios:

- DNA reagent kit CycleTEST Plus (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA).
- Anticuerpos monoclonales CD34 y CD45 conjugados en FITC.

Método:

La proliferación de las células hematopoyéticas se analizó mediante estudios de ciclo celular utilizando para ello el kit comercial Cycle Test DNA Reagent kit. Tras lavar las células se procedió al marcaje con anticuerpos de membrana CD45 y CD34 ambos conjugados en FITC para amplificar la señal de la población a estudio.

Se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS centrifugando a 700xg durante 5 minutos con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo. A continuación, se incubaron durante 10' con 200µl de una solución que contiene un exceso de proteínas y ribonucleasa que permite eliminar el RNA nuclear para evitar la unión de éste con el yoduro de propidio. Tras esto, las células se incubaron a 4°C durante 10' con 200µl de solución de yoduro de propidio que se une de forma estequiométrica al ADN. La adquisición se realizó según lo descrito anteriormente, pero en este caso, para el análisis se emplearon los programas Paint-A-Gate-Pro (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) con el que se seleccionó la población en estudio y ModFit LT (Verity Software House, Inc, ME, USA) con el que se analizó el ciclo celular.

4.2.6. Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Reactivos necesarios:

- Etanol
- Solución de choque osmótico*.
- Pepsina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Kit de sondas X,Y (Vysis-Abbot Laboratories, Downers Grove, IL, USA).
- Formamida (Panreac, Barcelona, España)
- 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

* La solución para el choque osmótico se preparó mezclando 3,0g KCl (Panreac, Barcelona, España), 4,8g HEPES (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) y 0,2g EGTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) todo ello diluido en 1L de agua destilada ajustando el pH a 7,4.

Método:

Material y Métodos

Para realizar FISH en interfase de las CSM cultivadas, se retiró el sobrenadante del frasco de cultivo, se lavó con PBS, se añadieron 10ml de solución de choque osmótico y se incubó durante 1h en estufa a 37°C. Posteriormente se fijaron las células con metanol/acético (3/1), se centrifugaron durante 5 minutos a 300g y se depositaron en un porta pretratado mediante cito-centrifugación de 5 minutos a 300g.

Los portas con las células se desnaturalizaron en solución de pepsina durante 10 minutos a 37°C y se deshidrataron mediante incubaciones secuenciales a temperatura ambiente en etanol al 70/85/100%. Después se hibridaron con una mezcla de sondas para los cromosomas X (rojo) e Y (verde) en un ciclo de 6 min a 75°C y 20 horas a 37°C según protocolo del fabricante en el termociclador HYBrite (Vysis-Abbot Laboratories, Downers Grove, IL, USA)⁶¹. Tras la hibridación se lavaron con formamida al 50% en 20X SSC a 46°C durante 5 minutos y se incubaron con DAPI para detectar los núcleos celulares.

Las células fueron observadas con el microscopio de fluorescencia Leica DMI-6000-B con los filtros correspondientes a la sonda utilizada. Se contaron al menos 200 núcleos, expresando los resultados en porcentaje de células de cada sexo.

4.2.7. Western blot

Reactivos necesarios:

- Tampón de lisis*.
- Tampón de carga**.
- Solución de Acrilamida/Bis al 30% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
- BSA.
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-osteopontina humana.

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG unido a peroxidasa (GE Healthcare BioSciences, Buckinghamshire, UK).
- Solución de revelado ECL Western Blotting Detection (GE Healthcare BioSciences, Buckinghamshire, UK).

* El tampón de lisis consiste en una solución 140mM NaCl, 10mM EDTA, 10 % glicerol, 1 % nonident P-40, 20mM Tris (pH 8.0), 1mM pepstatina, 1µg/ml aprotinina, 1µg/ml leupeptina, 1mM PMSF, 1mM sodio ortovanadato.

** Para preparar el buffer de carga de electroforesis se mezclaron 4% SDS; 0,05% azul de bromofenol; 20% glicerina y 2% β -mercaptoetanol en Tris-HCl 100 mM pH 6,8

Método:

Para confirmar los resultados obtenidos mediante el análisis inmunohistoquímico se realizaron estudios mediante la técnica de *western blot* para análisis de la OPN. Tras realizar los experimentos, las células se trasladaron a un baño de hielo, impidiendo de este modo la activación de fosfatasas o proteasas. Se decantaron los sobrenadantes, se lavaron las células dos veces consecutivas con PBS y se lisaron en un volumen 800µl de tampón de lisis.

Las células se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C en una microcentrífuga refrigerada durante 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de microcentrífuga limpios. Se cuantificaron los extractos celulares para el análisis de *western blot*, midiendo la cantidad de proteína por el método de Bradford. Las muestras fueron neutralizadas con tampón de carga de electroforesis 4X y se calentaron mediante un baño seco a 100° durante 5 minutos. Tras ser hervidas, las muestras se cargaron (100µg) en geles de SDS-PAGE preparados según Laemmli. El porcentaje de poliacrilamida fue del 15% debido al peso molecular de la OPN. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas tipo Sturdier (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Material y Métodos

Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA, USA) en una solución de transferencia (25 mM Tris; 192 mM glicina) a corriente constante de 12V durante 14 horas. A continuación se bloquearon en agitación con solución de BSA y se incubaron con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se incubaron con sus correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP y se revelaron las membranas mediante la reacción de la peroxidasa potenciada mediante luminol y paraiodofenol sobre películas Fujifilm.

4.2.8. Transducción celular

4.2.8.1. Producción de lentivirus

Reactivos necesarios:

- Tampón 2X HeBS*.
- CaCl_2 0,5 M.
- Hexadimethrine bromide, polybrene (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
- Medio de expansión de CSM.

* El tampón 2x HeBS se preparó mezclando 200mM NaCl, 10mM KCl, 1.5m $\text{MNa}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12mM dextrosa y 50mM HEPES en agua milliQ.

Método:

Se partió de un cultivo de células 293T y muestras suficientes de DNA del vector que porta el transgen pLV-CMV-Luc2-bc-GFP, y de los vectores psPAX2 y VSV-G que permiten la formación del virus (Figura 11).

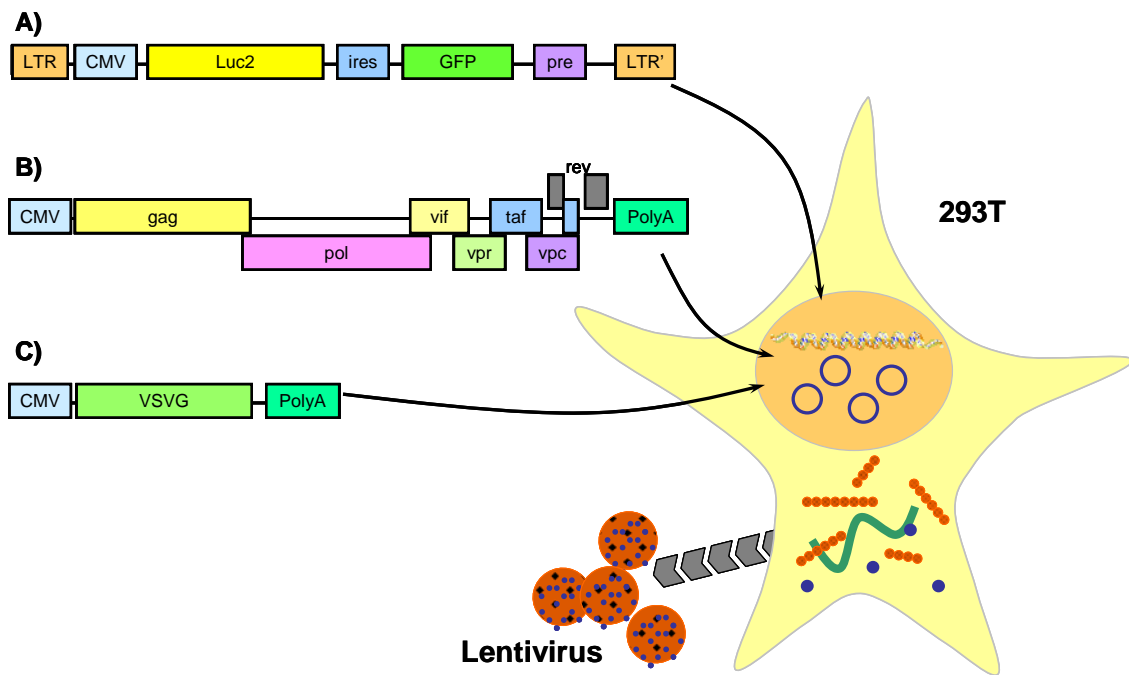


Figura 11: Esquema de producción de lentivirus en células 293T empleando el plásmido de interés (A), un vector para la síntesis y empaquetamiento del virus (B) y un vector para la envuelta del virus (C).

Las células 293T se mantuvieron en cultivo con el mismo medio empleado para la expansión de CSM. La transfección de las células 293T se realizó cuando las células se encontraban en un 50% de confluencia en placas Petri de cultivo de 15 cm de diámetro (Falcon, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) mediante gradiente de calcio añadiendo a cada placa 35µg de ADN total con CaCl₂ 0,5 M y buffer 2x HeBS. Tras 18h de incubación en estufa de CO₂ a 37°C se sustituyó este medio de transfección por medio fresco de expansión en el que las células liberan las partículas virales. A las 24 y 48h se recogió el sobrenadante, se pasó a través de un filtro de 0.45 µm de poro con jeringuilla de 50ml, se alicuotó y congeló a -80°C, dejando una pequeña parte para calcular el título del sobrenadante (unidades infectivas/ml).

Para calcular el título de los sobrenadantes virales obtenidos, se plantaron células 293T en placas de 6 pocillos con 10⁵ células 293T en cada pocillo. Al día siguiente, se cambió el medio de expansión por 2ml de diluciones decrecientes del

Material y Métodos

sobrenadante obtenido como se detalla en la Figura 12. Se mantuvieron en estufa de CO₂ durante 3 días, tiempo suficiente para la transducción y posterior expresión de las proteínas de los transgenes insertados, tras lo cual se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se adquirieron en el citómetro de flujo tal como se ha descrito en los apartados anteriores.

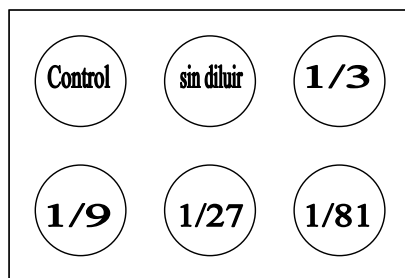


Figura 12: Modelo de placa de diluciones empleada para el cálculo del título de los sobrenadantes virales.

Los archivos se analizaron con el programa InFinicyt®, calculando el porcentaje de células 293T positivas en la primera fluorescencia (debido a la expresión de GFP) para cada concentración de sobrenadante viral. El cálculo del título se realizó haciendo la media del resultado obtenido en la siguiente operación aplicado solamente a las diluciones en las que el porcentaje de células positivas oscilaba entre 60 y 20%:

$$\frac{\text{Concentración celular} \times \text{Dilución} \times \% \text{Células positivas}}{\text{Volumen}} = \text{Unidades/ml}$$

4.2.8.2. Transducción de CSM

Reactivos necesarios:

- Sobrenadante viral.
- Hexadimethrine bromide, polybrene.

- Medio de expansión de CSM.

Método:

Partiendo de CSM en fase 2 al 40% de confluencia, se cambió el medio de expansión por medio de transducción consistente en una dilución 1:15 del sobrenadante de virus en medio de expansión para obtener una MOI (Multiplicity Of Infection) aproximada de 1 según el título obtenido para cada lote de virus. Para aumentar la eficiencia de transducción se añadió polybrene a una concentración final de 8µg/µl. Tras 24 horas a 37°C en incubador de CO₂ se cambió el medio de transducción por medio fresco de expansión y se mantuvo el cultivo en condiciones estándar de expansión de CSM. En paralelo se mantuvo un cultivo sin medio de transducción como control.

En todos los casos, transcurridas 72 horas desde la transducción, se tomó una muestra de CSM, tanto control como transducidas, para calcular la eficiencia de la transducción mediante CMF gracias a la expresión de GFP por parte de las células que habían sido infectadas.

4.2.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS 15.0 para Windows (Chicago, IL, USA). Se calcularon los valores de la mediana y el rango para cada una de las variables. La comparación para muestras independientes se realizó mediante el test de Mann-Whitney para datos no paramétricos. En los análisis de 3 ó más condiciones experimentales se aplicó la corrección de Bonferroni.

La significación estadística se fijó para valores de * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

5. Resultados

5.1. Expansión y caracterización de las CSM

5.1.1. Expansión de las CSM

Se separaron CMN de todas las muestras estudiadas mediante gradiente de densidad con ficoll y en todos los casos se consiguió la expansión de las CSM hasta pase 3. Desde el punto de vista morfológico, se comprobó que las CSM presentaban su aspecto fibroblástico habitual y proliferaban formando colonias que se expandían ocupando toda la superficie del frasco de cultivo (Figura 17).

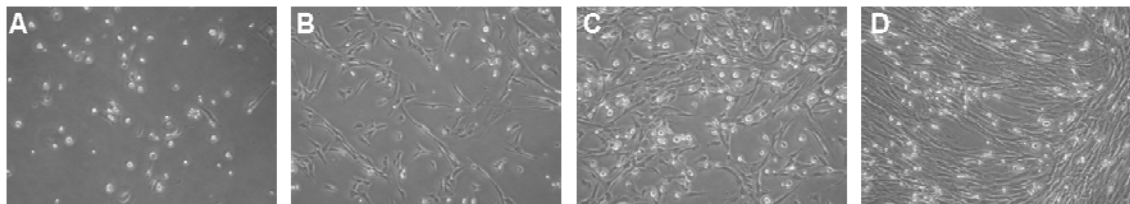


Figura 17: Imágenes secuenciales de la expansión de CSM. Desde el inicio del cultivo (A) se observan células adherentes de aspecto fibroblástico que van proliferando (B, C) hasta alcanzar confluencia (D).

5.1.2. Caracterización inmunofenotípica

Las CSM obtenidas presentaban un inmunofenotipo similar en todos los casos, con un perfil de expresión que coincidía con los criterios de definición de CSM establecidos por la ISCT⁵⁹. Así, y de acuerdo con el panel estudiado, las células expresaban CD73, CD90, CD105, CD166 y CD44 y carecían de los marcadores de línea hematopoyética CD14, CD19, CD34, CD45 y HLA-DR (Figura 18).

Resultados

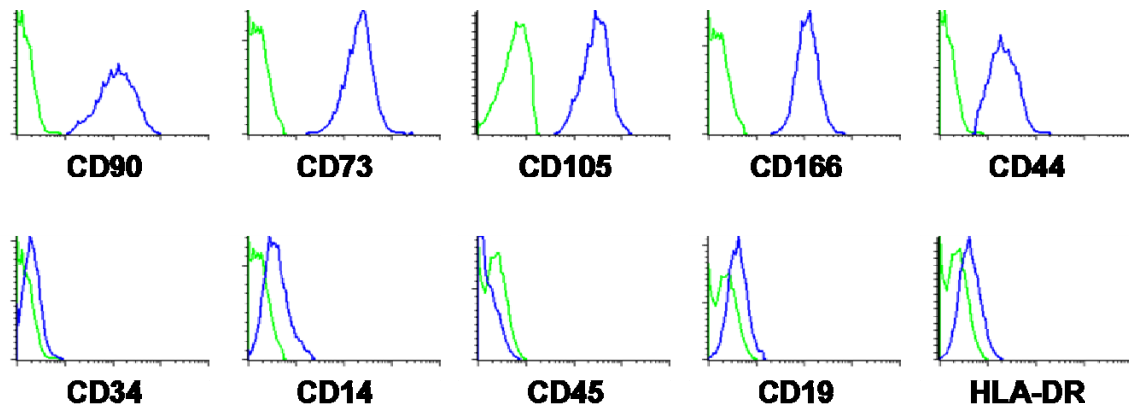


Figura 18: Expresión inmunofenotípica de las células mesenquimales. Los marcadores positivos se indican en la fila superior y los negativos en la inferior. La expresión de las CSM se indica en color azul, mientras que en verde se representa el histograma de las células basales sin marcar (control de autofluorescencia)

5.1.3. Diferenciación de las CSM

De forma análoga, siguiendo los criterios de la ISCT, para demostrar que en todos los casos estudiados se mantenía la multipotencialidad de las CSM, se indujo su diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos. En todas las células obtenidas, y bajo condiciones de cultivo específicas, se obtuvo diferenciación hacia los tres tipos celulares indicados (Figura 19).

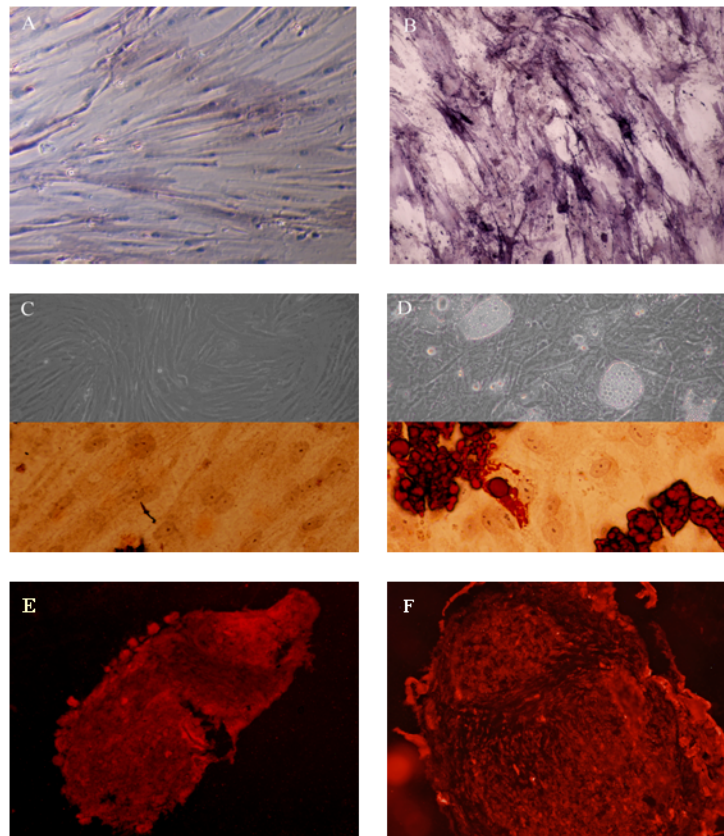


Figura 19: Diferenciación multilineal de las CSM. Expresión de fosfatasa alcalina (A, B), depósitos lipídicos con rojo al aceite (C, D) y expresión de colágeno (E, F) en CSM mantenidas en medio de expansión (A, C, E) o medio específico de diferenciación (B, D, F).

5.2. Aislamiento de progenitores hematopoyéticos

En todas las muestras obtenidas por leucoaféresis se aislaron mediante selección inmunomagnéticas las células $CD34^+$ con una pureza superior al 90%. (99-93%) En el caso de las muestras de SCU se aisló un número suficiente de células para realizar los experimentos programados en 27 de las 30 unidades procesadas. En dichos casos, la pureza fue siempre superior al 80% (94-80%) tras el análisis inmunofenotípico (Figura 20).

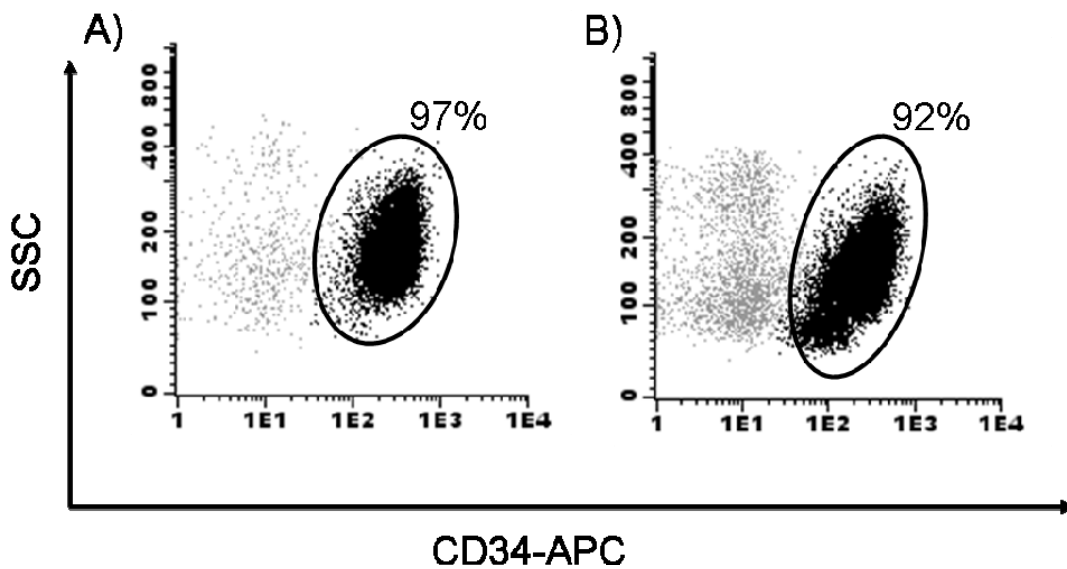


Figura 20: Caso representativo del porcentaje de células CD34⁺, observadas por citometría de flujo, obtenidas mediante selección inmunomagnética en muestras de leucoaféresis (A) y sangre de cordón umbilical (B).

5.3. Estudios *in vitro*

5.3.1. Cultivos a largo plazo en 2 etapas

Con el fin de analizar la capacidad de las CSM para soportar la hematopoyesis *in vitro*, se analizó semanalmente la confluencia de la capa adherente, la presencia de adipocitos y áreas de *cobblestone* en la misma, así como la capacidad clonogénica de las células producidas por el cultivo y se compararon los resultados de las distintas condiciones de cultivo. La adición de células CD34⁻ junto con las células CD34⁺ no produjo ninguna diferencia significativa, por lo que en el resto del trabajo, y para facilitar la comprensión del mismo, se muestran únicamente los resultados de los grupos en los que el segundo inóculo se realizó con células CD34⁺ o con CD34⁺ y CSM.

A partir de la tercera semana tras el segundo inóculo se apreciaban claras diferencias entre los cultivos control y aquellos que habían sido tratados previamente

con etopósido y que recibían únicamente progenitores hematopoyéticos. Por el contrario, los casos tratados con etopósido que habían recibido CSM junto con la fracción hematopoyética, recuperaban parámetros similares a los controles, tal como se aprecia en la Figura 21 y se detalla en los siguientes puntos.

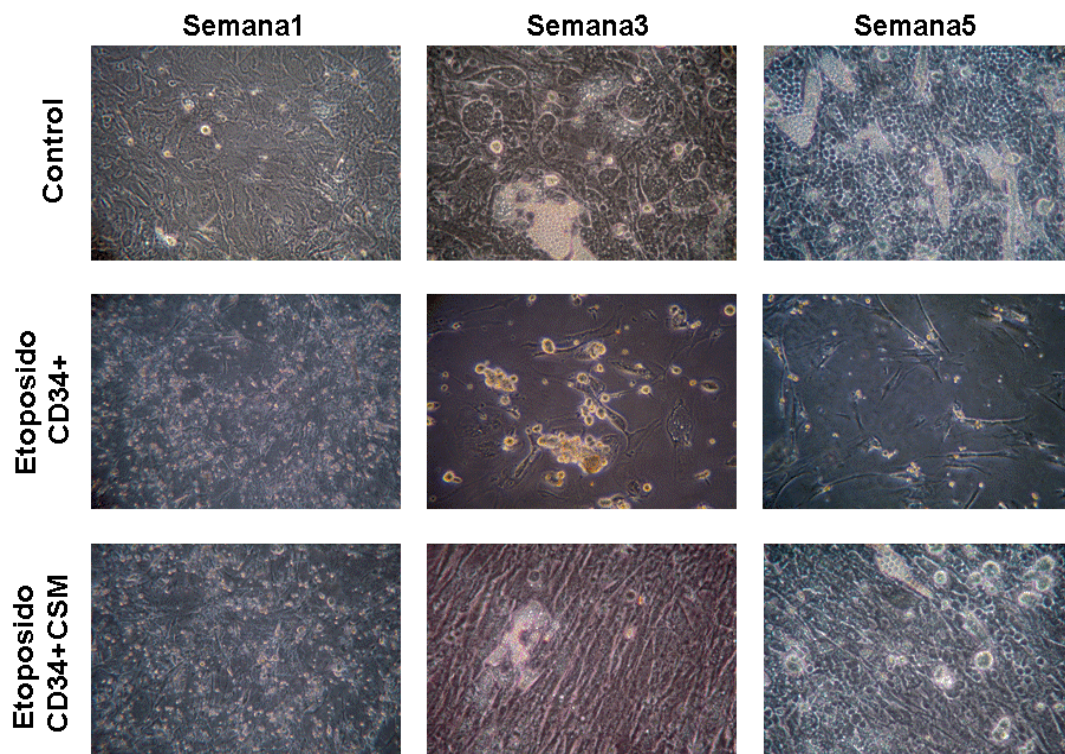


Figura 21: Evolución de los cultivos a largo plazo a las 1, 3 y 6 semanas desde el segundo inóculo en un caso representativo de los realizados

5.3.1.1. Confluencia de la capa adherente

La confluencia del estroma obtenido a partir de CSM en condiciones control fue siempre del 100% independientemente de los tipos celulares añadidos en el segundo inóculo. El mismo resultado se observaba transcurridas 2 semanas en los cultivos que tras ser tratados con etopósido recibían CSM en su segundo inóculo. Por el contrario, en los estromas tratados con etopósido y que posteriormente sólo recibían células CD34⁺ se observó una progresiva pérdida de la confluencia de la

Resultados

capa adherente, del 60 al 30% desde la primera a la quinta semana postratamiento con el fármaco (Figura 22).

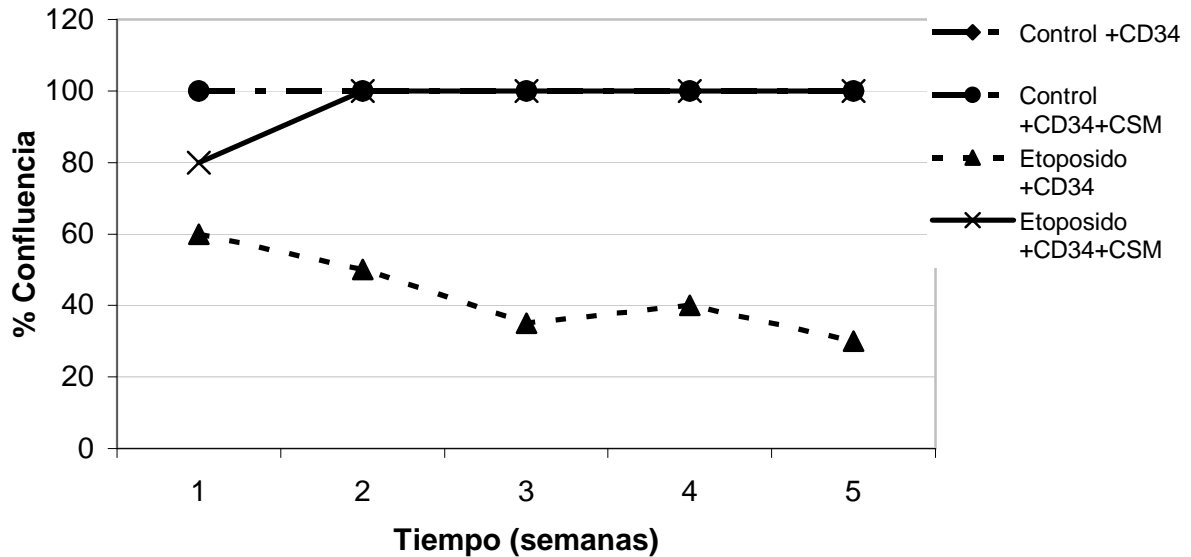


Figura 22: Evolución del porcentaje de confluencia de la capa adherente de estroma a lo largo del tiempo bajo las distintas condiciones de cultivo (Datos expresados en mediana).

Control: estromas tratados con DMSO; Eto: estromas tratados con etopósido

5.3.1.2. Presencia de adipocitos y áreas de cobbletone

En los cultivos mantenidos bajo las condiciones estándar se observaron adipocitos desde el inicio hasta la quinta semana del estudio, momento en el que representaban más de un 20% de la superficie. El tratamiento con etopósido provocaba la pérdida de los adipocitos del estroma. Cuando estos cultivos recibían CSM en el segundo inóculo, se observaba un incremento progresivo en el número de adipocitos similar a lo observado en los controles. Para cuantificar la aparición de adipocitos mediante contraste de fases (20X) se asignó un valor numérico de 0 en ausencia de adipocitos, 1 cuando aparecía algún adipocito aislado, 2 cuando había adipocitos en la mayoría de los campos observados y 3 cuando aparecían varios adipocitos por campo. Con estos valores corroboramos los resultados descritos cualitativamente (Figura 23).

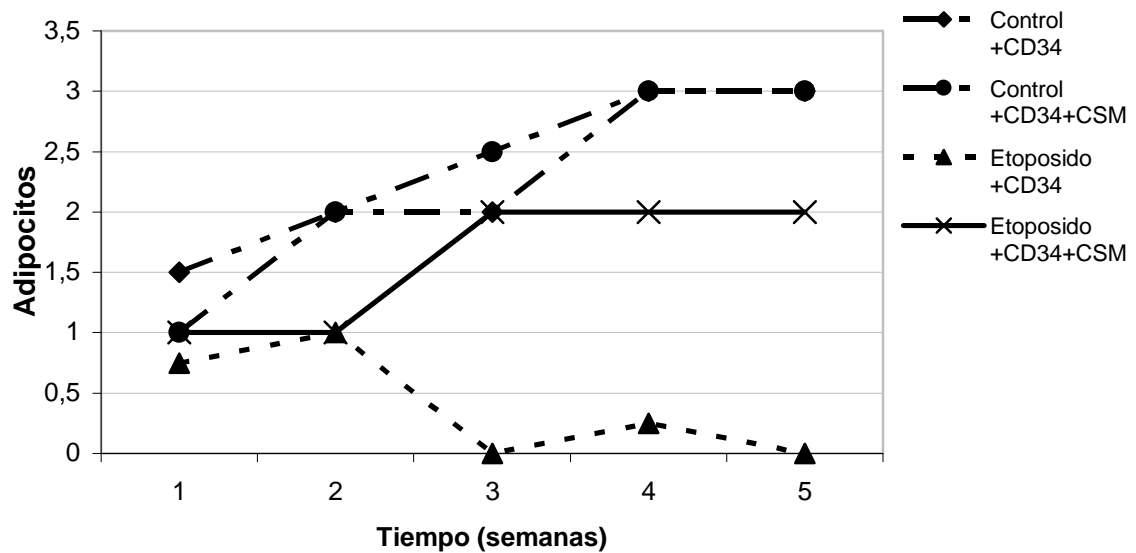


Figura 23: Progresión observada en la aparición de adipocitos según los valores determinados para su estudio. Datos expresados en mediana.

Para la valoración de las áreas de *cobblestone* se siguió el mismo criterio empleado en el caso de los adipocitos y que se acaba de describir (Figura 24). En los controles, a partir de la segunda semana tras el inóculo con células hematopoyéticas, aparecían áreas de *cobblestone*, signo de una hematopoyesis activa en el cultivo, cuya superficie aumentaba a medida que avanzaba el cultivo. En cambio, los cultivos tratados con etopósido que habían recibido exclusivamente células $CD34^+$, presentaban un número escaso o nulo de las mismas. En los casos en los que estos cultivos recibían CSM con la fracción hematopoyética, a partir de la tercera semana, se recuperaba su capacidad de soporte de la hematopoyesis *in vitro* reflejada en una aparición de áreas de *cobblestone* similar a la observada en los controles.

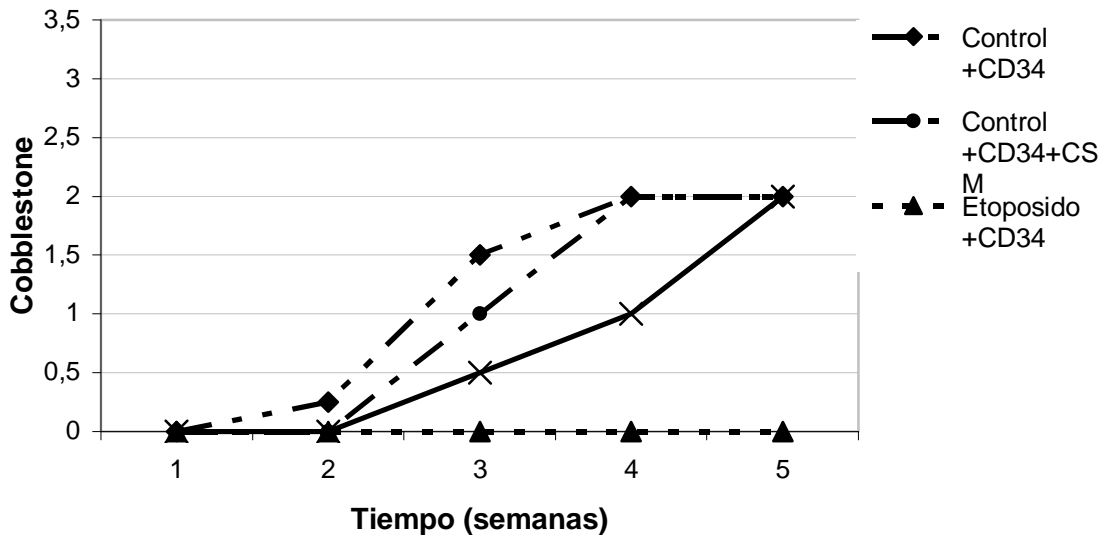


Figura 24: Aparición de las áreas de *cobblestone* bajo las diferentes condiciones de cultivo según el sistema de puntuación asignado. Datos expresados en mediana.

5.3.1.3. Capacidad clonogénica

5.3.1.3.1. Número de células producidas por el cultivo a largo plazo

Una vez realizado el segundo inóculo, también se analizó semanalmente el número de células suspendidas en el sobrenadante al realizar el cambio de medio. Como puede observarse en la Tabla 5, durante la primera semana, el número de células era estadísticamente mayor en el sobrenadante de los cultivos tratados con etopósido y que no habían recibido CSM. Esta tendencia se mantenía a medida que avanzaban las semanas, aunque las diferencias eran cada vez menores hasta que en la semana 5, cuando se tripsinizaba la capa, el número de células en este grupo era significativamente inferior al obtenido en el resto de los cultivos.

Tabla 5: Cultivos a largo plazo. Células recuperadas a lo largo de las cinco semanas de cultivo.

Semana	Control CD34 ⁺	Control CD34 ⁺ /CSM	Etopósido CD34 ⁺	Etopósido CD34 ⁺ /CSM
1	46 (4-120)	38 (5-134)	110 (16-212)*	79 (16-386)
2	45 (2-90)	41 (2-98)	133 (2-432)*	51 (2-124)
3	71 (8-234)	87 (16-288)	121 (18-610)	70 (16-326)
4	103 (24-564)	151 (22-688)	194 (16-456)	98 (28-340)
5	649 (140-3780)	998 (140-4020)	290 (45-1230)*	536 (135-4260)

Resultados expresados en mediana (rango). Datos de células recuperadas $\times 10^3$. * $p < 0.05$ respecto a los otros grupos.

5.3.1.3.2. Número total de progenitores generados en el cultivo a largo plazo

Con las células obtenidas en el recambio semanal del medio, se realizaron ensayos funcionales de producción de colonias CFU-GM. La producción de CFU-GM fue similar en todos los cultivos a excepción de los tratados con etopósido sin CSM (Tabla 6). En estos cultivos, pese a haber recuperado mayor número de células en el sobrenadante, el número de colonias/ 10^5 células producidas fue siempre inferior al resto, especialmente durante las 2 primeras semanas, dando como resultado un número total de colonias más bajo que los controles. En los casos tratados con etopósido e inoculados con CSM y la fracción hematopoyética, a partir de la segunda semana se obtienen valores similares a los controles.

Si atendemos a la capacidad de formar colonias al cabo de 5 semanas por el número total de células presentes en el cultivo, observamos una diferencia significativa entre los cultivos tratados con etopósido que reciben exclusivamente células CD34⁺ y el resto de los cultivos (Figura 25).

Tabla 6: Producción semanal de colonias/ 10^5 células totales presentes en el sobrenadante.

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
Control +CD34 ⁺	3,8 (0,6-12,1)	5,6 (2,2-16,9)	3,0 (0,3-16)	2,2 (0,4-7,4)	1,0 (0,3-5,7)
Control +CD34 ⁺ +CSM	3,8 (0,5-11,9)	5,5 (2,5-13)	4,9 (0,3-16,5)	2,7 (0,4-7,2)	0,9 (0,3-2,1)
Etoposido +CD34 ⁺	2,1* (0,2-3,2)	2,6* (0,4-9)	1,7 (0,02-11,5)	1,1 (0,1-6,8)	0,5 (0,05-1,2)
Etoposido +CD34 ⁺ +CSM	2,4 (0,2-7,9)	5,0 (0,8-10,3)	2,6 (0,3-15,8)	2,0 (0,3-8,5)	0,8 (0,2-1,7)

Resultados expresados en mediana (rango). Datos de nº de colonias CFU-GM $\times 10^3$. * $p < 0,05$ respecto a los otros grupos.

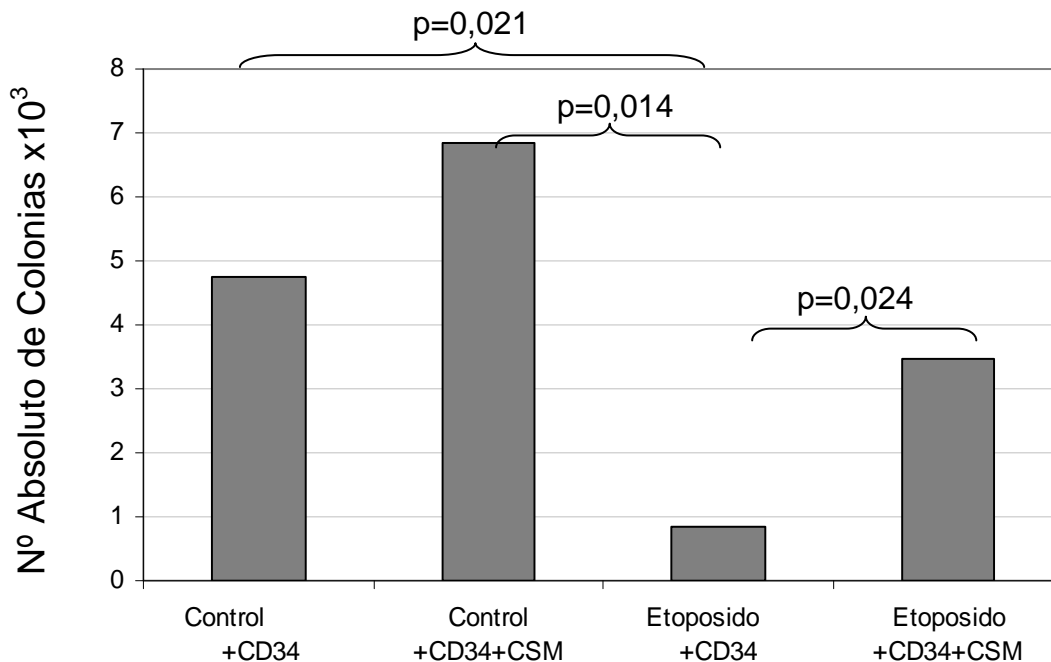


Figura 25: Capacidad clonogénica de las células producidas bajo cada una de las condiciones de cultivo. Producción en la quinta semana de colonias/células totales del cultivo.

5.3.2. Capacidad de injerto de las CSM *in vitro*

Para estudiar si el mecanismo a través del cual las CSM eran capaces de restaurar el estroma *in vitro* era paracrino o por efecto del contacto directo de las células, se comparó el medio condicionado producido durante la expansión de CSM

sanas con las CSM mismas. Cuando se realizaron los cultivos tratados con etopósido, tanto a 50 como a 100 μ M, se observaba una rápida recuperación de la confluencia de la capa si se añadían directamente las células, mientras que en los que se cultivaban únicamente con sobrenadante la recuperación de la confluencia era más discreta (Tabla 7).

Tabla 7: Mejora de la confluencia del estroma con etopósido 100 μ M.

	Día +5	Día +15
Control	100	100
Etopósido	17 (21-6)	9 (13-1)
Etopósido + Sobrenadante	20 (25-10)	26 (35-16)
Etopósido + CSM	80 (100-70)	100

Resultados expresados como mediana (rango) del porcentaje de superficie cubierta.

Con el fin de saber si la mejora producida en los estromas dañados por la adición de CSM sanas se debía a la secreción de factores o a la incorporación de las Tp-CSM a los mismos, analizamos mediante FISH de cromosomas sexuales la procedencia de las células, puesto que el estroma dañado y segundo inóculo procedían de donantes de distinto sexo. Los resultados muestran que las CSM sanas eran capaces de incorporarse al estroma dañado, y que esta propiedad estaba en relación con la dosis de etopósido administrada y por tanto con el grado de daño del estroma (Tabla 8).

Tabla 8: Capacidad de injerto de las CSM sanas en un estroma dañado.

		Día +5	Día +15
Control	50 μ M	0.1 (0-3)	0 (0-2)
Etopósido		69 (57-93)	67 (55-93)
Control	100 μ M	0.5 (0-2)	0 (0)
Etopósido		97 (85-99)	99 (90-100)

Datos expresados como mediana de porcentaje de células del donante.

Control: estromas tratados con DMSO; Etopósido: estromas tratados con etopósido.

5.3.3. Expresión de osteopontina y SDF1alfa

Para saber si el daño ejercido por el etopósido también influía en la expresión de moléculas del estroma importantes en el mantenimiento de la hematopoyesis, analizamos la expresión de osteopontina y SDF1 α mediante inmunofluorescencia, tanto a corto (48h) como a largo plazo (3 semanas) desde el tratamiento con etopósido.

A corto plazo se observó, tanto en cultivos control como en tratados, una expresión baja-moderada de SDF1 α en la mayoría de las células. En los cultivos tratados se observaban algunas células aisladas con expresión muy alta. A largo plazo, aumentaron las diferencias entre los estromas tratados y no tratados con el fármaco. Los cultivos control presentaban regiones o *clusters* de células con expresión moderada-alta, bien definidos, y rodeados por células negativas para SDF-1. Las células positivas que componían estos clusters presentaban una morfología poligonal, similar a la observada en la diferenciación a osteoblasto, mientras que las células circundantes mantenían la típica morfología fibroblástica de las CSM expandidas *in vitro*. En cambio, en los cultivos tratados con etopósido, donde se había perdido la confluencia de la capa estromal, las células positivas eran muy escasas, y además presentaban indistintamente morfología fibroblástica, poligonal o circular sin ningún tipo de disposición organizada. Cuando estos cultivos tratados con etopósido habían sido cultivados con sobrenadante de CSM sanas en algunos casos se observó la aparición de pequeños *clusters* de células positivas de morfología poligonal similares a los observados en los controles.

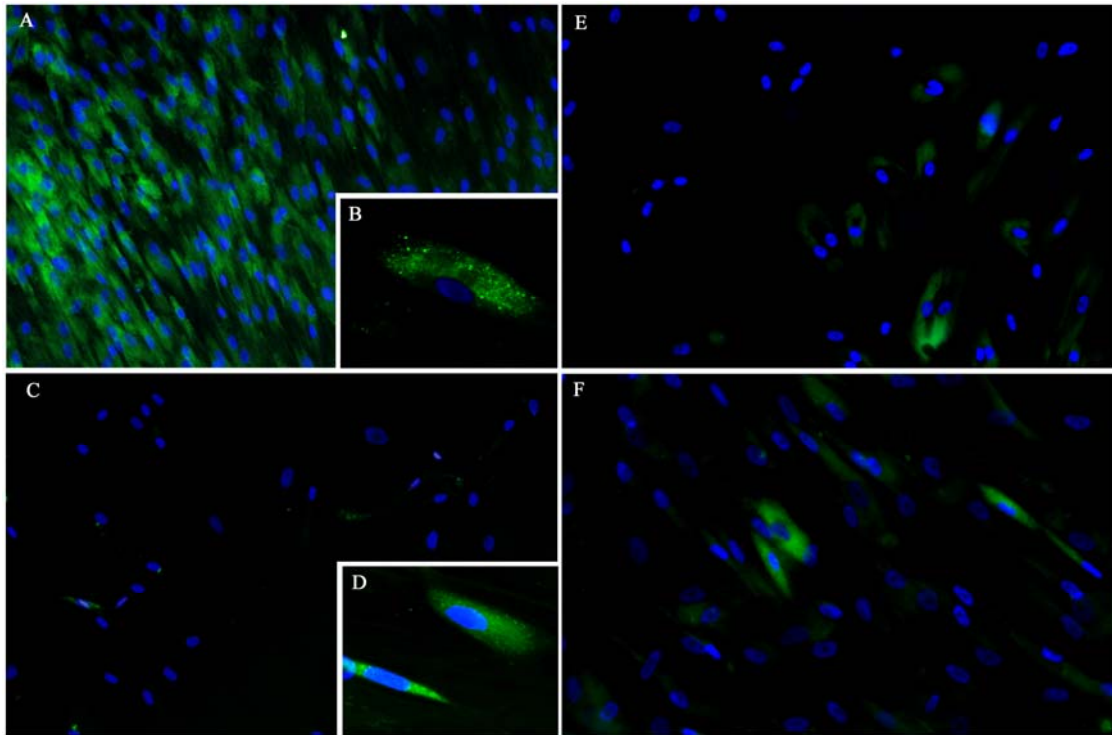


Figura 26: Expresión de SDF1 α a las 3 semanas. En los controles se observó la distribución de las células positivas en clusters rodeados de células negativas (A)(20X). Las células positivas presentaban morfología poligonal (B) (63X). Los cultivos tratados con etopósido presentaban menor número confluencia y bajo número de células positivas (C)(20X) siendo éstas de morfología fibroblástica (D) (63X). Cuando los cultivos tratados con etopósido se cultivan con sobrenadante de CSM sanas se recuperan pequeños agregados de células positivas (E)(20X), (F)(40X).

Cuando se analizó la expresión de osteopontina mediante inmunofluorescencia, apenas se observaron diferencias entre los distintos grupos estudiados, con muy bajo número de células positivas, en su mayoría de morfología circular, aunque en el caso de los estromas tratados también aparecían células con morfología irregular. A las 3 semanas, en los cultivos control había aumentado ligeramente el número de células positivas, presentando éstas morfología poligonal. Los cultivos tratados con etopósido presentaban mayor número de células con expresión muy alta pero con morfología muy variada: redondas, fibroblásticas y muchas de ellas con formas indefinidas con prolongaciones. En los cultivos tratados

Resultados

y cultivados con sobrenadante de CSM sanas, la presencia de células positivas era aún más evidente con predominio de morfología fibroblástica y redonda.

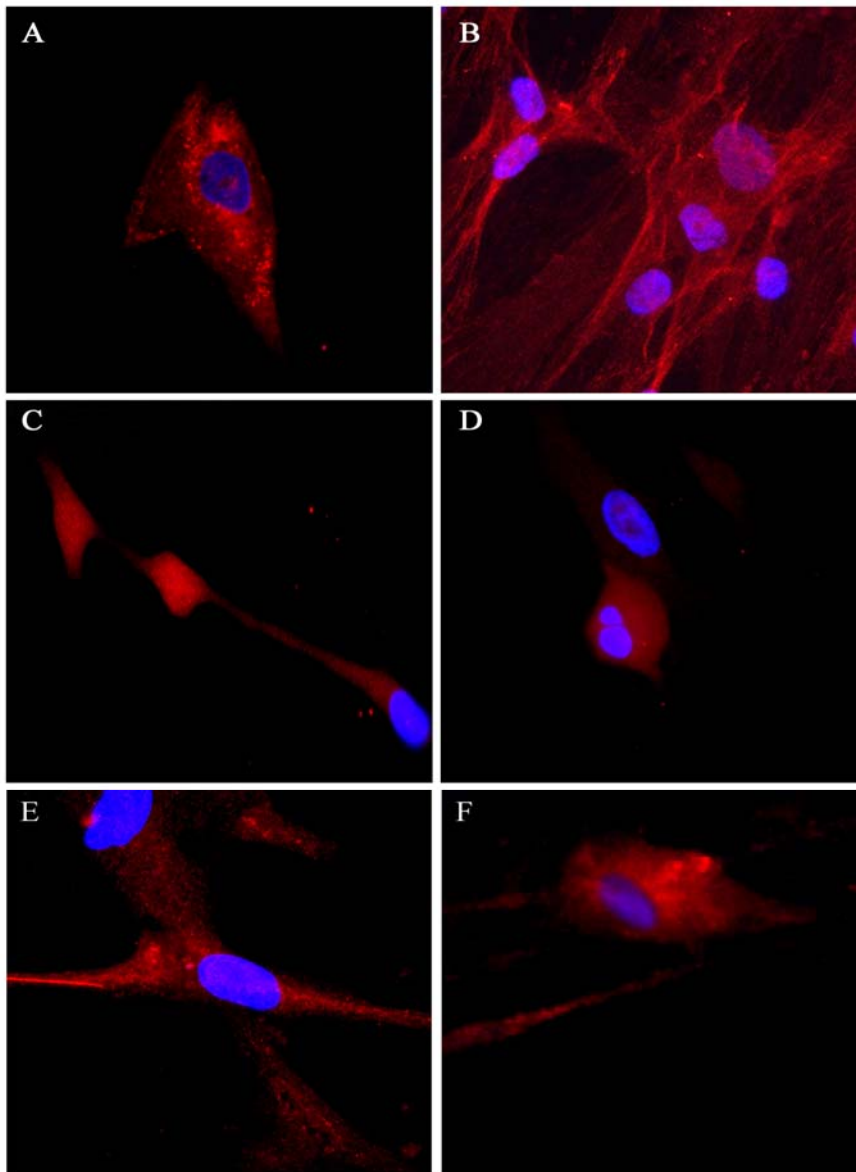


Figura 27: Morfología de las células que expresaban osteopontina. En los controles se observaron células poligonales (A) que en algunos casos estaban agrupadas (B). En los cultivos tratados con etopósido las células positivas tenían un aspecto morfológico anómalo, con prolongaciones (C) y redondas (D). Esta morfología diferencial se mantenía cuando las células tratadas con etopósido se cultivaban con sobrenadante de CSM sanas (E, F). Imágenes obtenidas a 63X.

Con el fin de comprobar estas diferencias se realizaron estudios de *western blot*. En el caso del SDF1 α no se detectó ninguna banda debido al pequeño tamaño

de la proteína (menor de 10kDa) y a la baja cantidad de muestra disponible. En cambio, en el caso de la osteopontina se pudo confirmar como al cabo de 3 semanas su expresión era claramente mayor en los cultivos tratados con etopósido, siendo aún algo mayor en aquellos cultivos que habían recibido sobrenadante de CSM sanas.

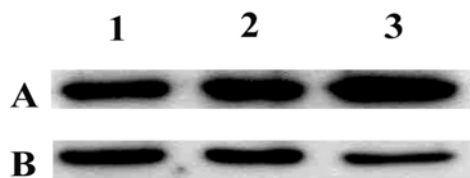


Figura 28: Expresión de osteopontina (A) a las 3 semanas por-tratamiento en condiciones control (1), en cultivos tratados con etopósido (2) y en cultivos tratados con etopósido mantenidos con sobrenadante de CSM sanas (3). Expresión de tubulina (B) en los mismos grupos empleada como control de carga.

5.3.4. Efecto de las condiciones del estroma sobre la población hematopoyética

Con el fin de saber cómo podía afectar un estroma dañado a los progenitores hematopoyéticos, analizamos la variación de su proliferación, diferenciación y expresión de CXCR4 y VLA4 cuando dichos progenitores se cultivaban con estromas normales y dañados, así como el efecto de las Tp-CSM sobre dicha expresión, tanto si el efecto de las mismas se ejercía por mecanismos paracrinos como por contacto directo.

En cuanto a la viabilidad de las células hematopoyéticas no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos tanto cuando los estudios se realizaban en contacto directo como al utilizar *transwell* (Tabla 9).

Resultados

Tabla 9: Viabilidad de las células hematopoyéticas bajo las diferentes condiciones de cultivos estudiadas a los 3 y 5 días desde su co-cultivo con el estroma, tanto por contacto directo como mediante cultivo en *transwell*.

		% 7AAD ⁻ /AnexinaV ⁻	
		Contacto directo	Transwell
3 días	Control CD34 ⁺	66.1 (30.4-77.0)	71.4 (66.6-84.8)
	Etoposido CD34 ⁺	67.1 (21.2-81.1)	66.6 (41.9-80.1)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	60.4 (37.0-77.5))	73.2 (64.1-82.1)
5 días	Control CD34 ⁺	48.9 (28.6-63.4)	66.5 (58.5-78.6)
	Etoposido CD34 ⁺	58.8 (35.0-61.1)	64.7 (31.7-67.5)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	53.1 (37.7-70.2)	58.5 (47.4-64.4)

Datos expresados como mediana (rango) del porcentaje de células negativas para anexina V y 7AAD mediante citometría de flujo.

Las células hematopoyéticas en contacto directo con el estroma sano muestran mayor tasa de proliferación (células en G2/M) aunque estas diferencias con los otros grupos no alcanzan la significación estadística. Esta mayor proliferación hematopoyética observada en los controles se mantuvo cuando los estudios se realizaron en *transwell*. Así a los 5 días las células hematopoyéticas proliferan más en *transwell* con un estroma sano que cuando se cultivan en presencia de un estroma tratado con etopósido y este estímulo proliferativo se mantiene al añadir CSM sanas al estroma dañado (Tabla 10).

Tabla 10: Porcentaje de células hematopoyéticas en división (G_2 /mitosis) bajo las diferentes condiciones de cultivos y tiempo testadas.

		% G_2/M	
		Contacto directo	Transwell
3 días	Control $CD34^+$	4.7 (3.2-10.9)	3.9 (2.0-8.0)
	Etoposido $CD34^+$	3.6 (1.0-14.3)	2.9 (0.6-5.4)
	Etoposido $CD34^+$ + CSM	3.5 (1.7-10.3)	3.6 (1.7-4.8)
5 días	Control $CD34^+$	6.3 (5.2-12.7)	4.2* (2.8-9.2)
	Etoposido $CD34^+$	4.1 (2.1-8.9)	2.5 (1.4-4.3)
	Etoposido $CD34^+$ + CSM	3.9 (2.7-9.4)	3.6 (2.2-4.2)

Resultados expresados como mediana (rango). * $p < 0.05$ comparado con el grupo de hematopoyéticas mantenidas en estromas tratados con etopósido que reciben solamente células $CD34^+$.

Cuando se analizó la inducción a la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos ejercida por los diferentes tipos de estroma se comparó la población inmadura frente al resto. Tanto cuando dicha diferenciación se analizó en CPH en contacto como en *transwell*, los estromas control inducían mejor la diferenciación de progenitores de forma significativa al compararlos con las células hematopoyéticas mantenidas en estromas tratados (Tabla 11). Además, cuando los estromas dañados recibían un inóculo de CSM sanas en el mismo momento que las células $CD34^+$ la capacidad de diferenciación mieloide se recuperaba.

Resultados

Tabla 11: Porcentaje de células hematopoyéticas en diferenciación bajo las diferentes condiciones y tiempos de cultivo testadas.

		% Células en diferenciación	
		Contacto directo	Transwell
3 días	Control CD34 ⁺	20.9 (18.4-27.2)	21.4 (17.4-31.2)
	Etoposido CD34 ⁺	13.4* (10.9-37.0)	11.3* (8.7-17.9)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	19.2 (13.1-28.6)	15.2 (12.7-25.3)
5 días	Control CD34 ⁺	34.6 (31.7-44.3)	24.3 (17.9-34.6)
	Etoposido CD34 ⁺	20.5* (16.6-43.1)	17.8* (12.9-24.2)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	28.0 (18.1-38.6)	21.3 (17.0-28.3)

Datos expresados como mediana (rango).

* Menor porcentaje de células en diferenciación ($p < 0.05$) comparado con los otros grupos.

Además de la diferenciación, se analizó el efecto ejercido por los diferentes estromas sobre moléculas implicadas en el anidamiento. Observamos que el porcentaje de células hematopoyéticas que expresaban altos niveles de VLA4 era mayor cuando las células estaban en contacto con los estromas control frente a los tratados con etopósido, alcanzando la significación estadística a los 5 días. Cuando a los estromas dañados se añadían CSM sanas, aumentaba la expresión de VLA4 acercándose a los valores de las condiciones control (Tabla 12). En los cultivos realizados en placas de *transwell* se observaron resultados similares, aunque en este caso los resultados no fueron estadísticamente significativos.

Tabla 12: Porcentaje de células con una alta expresión de VLA4 en los distintos grupos, condiciones y tiempos analizados.

		% VLA4 ⁺⁺	
		Contacto directo	Transwell
3 días	Control CD34 ⁺	24.2 (1.9-44.1)	13.1 (4.2-15.8)
	Etoposido CD34 ⁺	9.5 (2.4-31.4)	9.8 (5.2-19.7)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	15.9 (3.3-27.2)	7.9 (3.3-18.0)
5 días	Control CD34 ⁺	33.6 (23.9-42.0)	18.5 (13.6-29.7)
	Etoposido CD34 ⁺	16.3* (11.5-42.4)	15.4 (13.5-19.1)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	25.2 (16.8-41.5)	19.2 (12.9-21.9)

Datos expresados como mediana (rango).

* Menor porcentaje de células expresando VLA4 ($p < 0.05$) comparado con los otros grupos.

Finalmente, en relación con la expresión de CXCR4, a los 5 días, se encontró mayor porcentaje de células positivas para CXCR4 en las células hematopoyéticas de los cultivos control, especialmente cuando los estudios se realizaban en *transwell*. Su expresión no varió cuando se añadieron Tp-CSM (Tabla 13).

Tabla 13: Porcentaje de células hematopoyéticas que expresan CXCR4 en los distintos grupos, condiciones y tiempos analizados.

		% CXCR4 ⁺	
		Contacto directo	Transwell
3 días	Control CD34 ⁺	4.3 (0-24.1)	4.4 (2.9-24.7)
	Etoposido CD34 ⁺	5.2 (0.2-27.4)	4.4 (2.2-28.4)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	5.1 (0.6-26.6)	5.1 (1.7-24.1)
5 días	Control CD34 ⁺	7.5 (2.9-13.4)	10.2 (5.5-13.1)
	Etoposido CD34 ⁺	5.4 (2.3-10.2)	6.3* (5.5-7.8)
	Etoposido CD34 ⁺ + CSM	4.1 (1.7-10.3)	7.3 (5.2-10.5)

Datos expresados como mediana (rango).

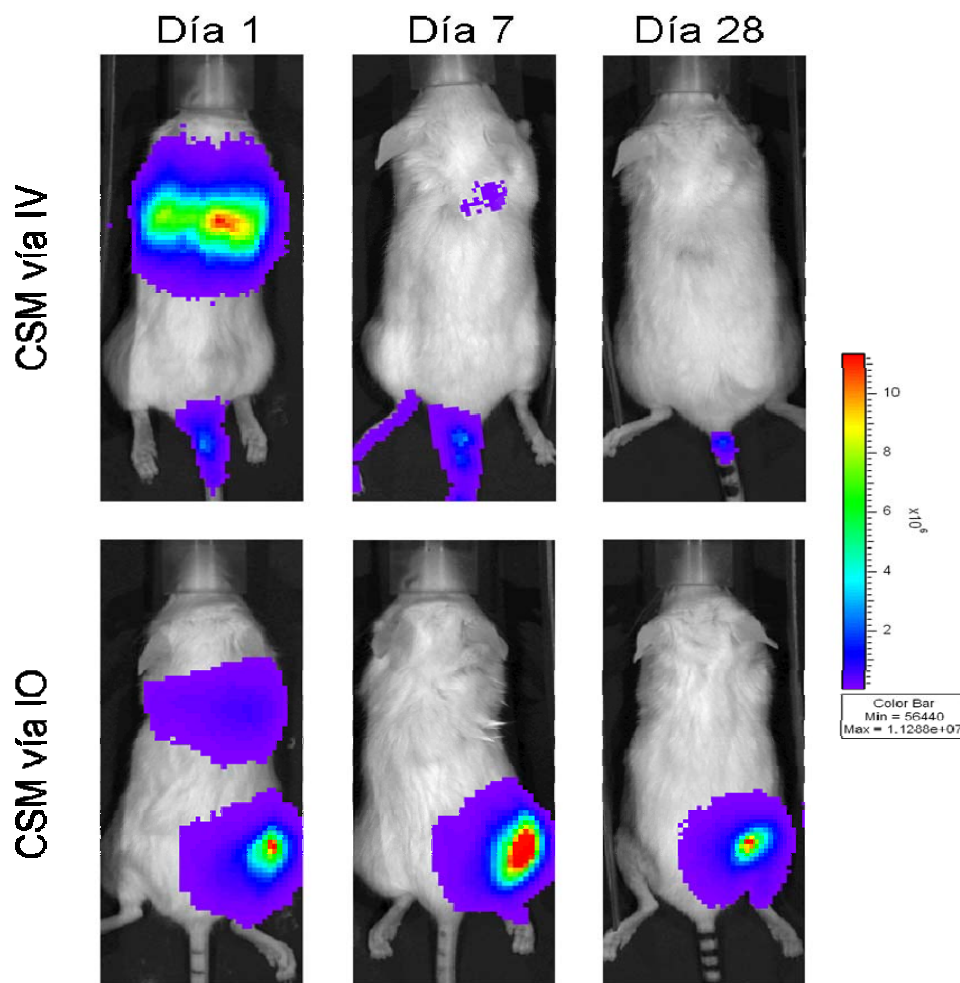
* Menor porcentaje de células expresando CXCR4 ($p < 0.05$) comparado con los otros grupos.

5.4. Modelo animal

5.4.1. Control de la distribución de las células mesenquimales mediante BLI

Gracias al uso de técnicas de bioluminiscencia se pudieron seguir las CSM humanas administradas a los ratones durante un periodo de hasta 6 semanas postrasplante. Se midió el flujo (fotones/segundo) por la presencia de señal en pulmón, cola y fémur derecho (Figura 30). Debido a la variabilidad que puede existir con los datos de flujo absoluto y con el fin de cuantificar la variación en función del tiempo se estableció un ratio entre flujo del día de medición/flujo día de inyección.

Figura 30: Imágenes representativas de la emisión de fotones tras infusión de CSM por vía intravenosa o intraósea a distintos tiempos.



Cuando las CSM se infundieron por vía IV, llegaban hasta los pulmones donde la señal iba descendiendo de forma progresiva hasta su desaparición en el día +10 post-inyección (Figura 31). Debido a que las CSM se infundían a través de la vena caudal, en algunos casos se mantenía su señal en la cola incluso hasta el final del estudio (Figura 32).

Cuando las CSM se inyectaron por vía IO su localización principal era en el fémur en el que se habían administrado. Allí su señal aumentaba durante los 5 primeros días para posteriormente comenzar a perderse progresivamente. Al cabo de 6 semanas se mantenía la señal en 12 de los 18 ratones sometidos al estudio (Figura

Resultados

33). En algunos casos, durante los 5 primeros días, se detectó señal de fotones en los pulmones de estos animales (Figura 31).

Figura 31: Evolución con el tiempo del ratio de la emisión de fotones en los pulmones por las CSM infundidas por vía intravenosa o intraósea.

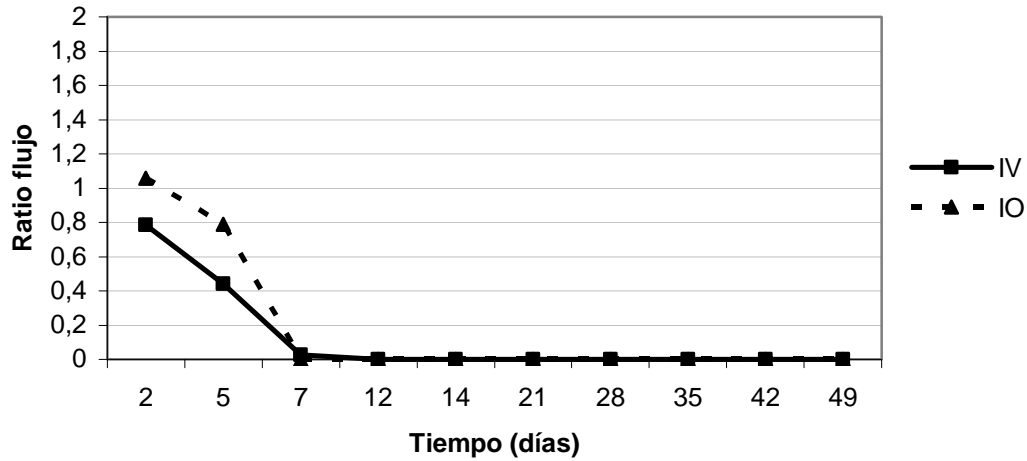


Figura 32: Evolución con el tiempo del ratio de la emisión de fotones en la cola por las CSM infundidas por vía intravenosa o intraósea.

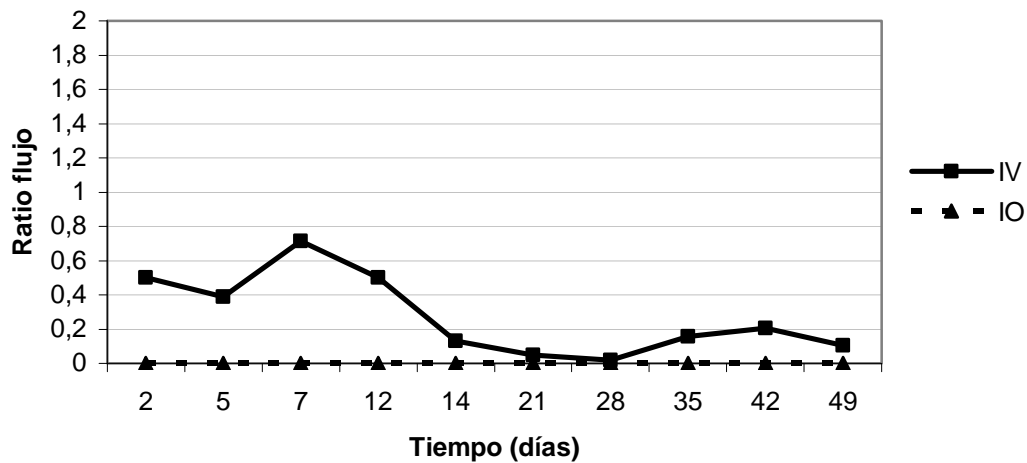
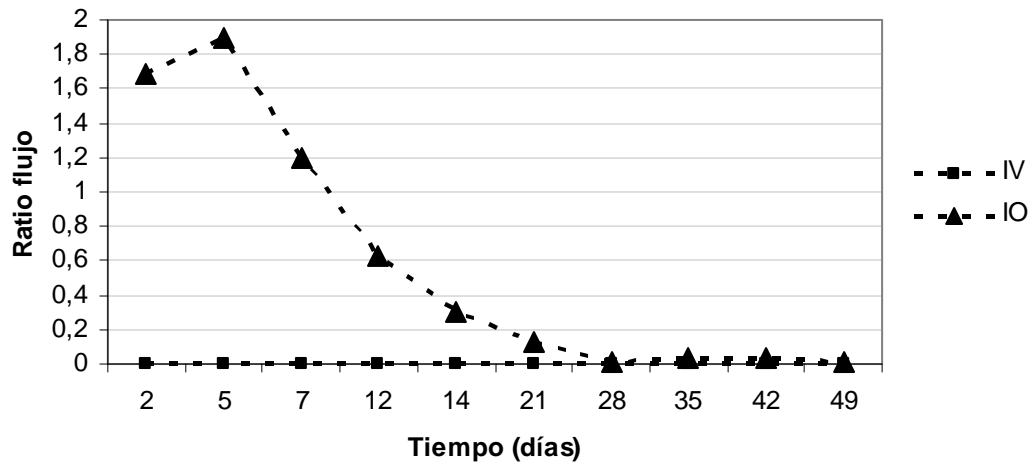


Figura 33: Evolución con el tiempo del ratio de la emisión de fotones en el fémur derecho por las CSM infundidas vía intravenosa o intraósea.



5.4.2. Quimerismo hematopoyético con CPH de SP

El injerto de las células hematopoyéticas humanas se estudió en ratones NOD/SCID. Las células CD34⁺ adultas se obtuvieron de muestras de leucoaféresis y en todos los casos estudiados se obtuvo un nivel detectable de injerto hematopoyético humano en el ratón. Con el fin de analizar el papel de las CSM, se realizaron en paralelo ensayos inyectando en el fémur derecho CSM humanas o suero fisiológico y se comparó el injerto hematopoyético humano en ambos fémures.

El injerto hematopoyético humano se analizó mediante CMF calculando el porcentaje de células CD45⁺ humanas. A las 3 semanas postrasplante dicho porcentaje era estadísticamente mayor en la MO de los fémures en los que se habían infundido CSM, independientemente de que las células CD34⁺ se infundiesen por vía IV o IO, como puede observarse en la Tabla 14. Incluso, en el grupo en el que las células hematopoyéticas se infundieron vía IV, el incremento del injerto humano se observaba en ambos fémures. A las 6 semanas, se mantenía esta tendencia, pero solamente se mantenía significación estadística en el grupo que recibió las células hematopoyéticas y las CSM por vía intraósea. A nivel de sangre periférica, se

Resultados

observó un aumento del injerto con el paso del tiempo pero no hubo diferencias significativas entre los distintos grupos a estudio.

Tabla 14: Porcentaje de células hematopoyéticas humanas (hCD45) presentes en las muestras de médula ósea y sangre periférica a las 3 y 6 semanas postrasplante.

		Porcentaje de células CD45 ⁺ humanas		
		Fémur infusión	Fémur contralateral	Sangre periférica
Semana 3	CD34IV	4,2 (0,8-8,3)	3,6 (0,6-8,8)	6,2 (2,4-10,1)
	CD34IV+CSM	10,4* (3,6-31,4)	8,4* (1,1-17,0)	6,4 (1,4-11,7)
	CD34IO	6,6 (2,6-30,2)	4,6 [†] (1,8-8,0)	7,7 (4,4-10,1)
	CD34IO+CSM	10,9* (3,3-38,0)	5,5 (3,4-30,1)	7,7 (3,8-11,2)
Semana 6	CD34IV	4,1 (0,1-35,6)	3,4 (0,1-36,2)	12,8 (10,1-21,3)
	CD34IV+CSM	6,8 (2,6-30,8)	9,4 (1,6-33,6)	14,5 (19,1-18,0)
	CD34IO	5,9 (2,5-61,7)	4,2 (2,0-14,7)	15,3 (1,7-16,7)
	CD34IO+CSM	10,7* (1,8-66,4)	6,0 (2,5-26,9)	11,8 (5,4-18,8)

Datos expresados como mediana (rango).

* Mayor porcentaje de células CD45 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV.

[†] Menor porcentaje de células CD45 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV+CSM.

El análisis de la subpoblación mieloide humana se consideró el porcentaje de células CD13⁺ dentro de las células hCD45⁺. A las 3 semanas postrasplante, la población mieloide humana representaba más del 30% de las células hematopoyéticas humanas en los fémures derechos de los grupos co-infundidos con CSM, aunque los valores del grupo que había sido trasplantado solo con CD34⁺ por vía IO era similar (24%). En los fémures contralaterales solamente el grupo trasplantado por vía IV que recibía CSM presentaba mayor proporción que el resto.

En este grupo, además, la proporción en SP era estadísticamente superior al resto. A las 6 semanas postrasplante disminuía el porcentaje mieloide en favor de las células B y no se observaban diferencias entre grupos (Tabla 15).

Tabla 15: Porcentaje de células mieloides humanas (hCD13) en la fracción hematopoyética a las 3 y 6 semanas postrasplante.

		% hCD13		
		Fémur infusión	Fémur contralateral	Sangre periférica
Semana 3	CD34IV	14,6 (1,1-68,2)	13,9 (0-39,5)	17,7 (4,9-69,3)
	CD34IV+CSM	31,4 (0-53,0)	31,5 (0-74,8)	25,7* (18,7-51,9)
	CD34IO	24,5 (0-77,7)	10,5 (0-32,7)	8,6 (6,7-17,7)
	CD34IO+CSM	37,2 (0-95,8)	15,4 (0-50,0)	14,7 (1,6-33,0)
Semana 6	CD34IV	7,1 (0-17,3)	6,8 (0-13,3)	2,9 (0-7,6)
	CD34IV+CSM	11,3 (0-31,6)	7,8 (0-27,7)	4,1 (0-8,8)
	CD34IO	15,2 (4,6-32,7)	10,29 (0-16,8)	1,8 (0-7,9)
	CD34IO+CSM	14,6 (0-39,8)	7,1 (0-31,8)	2,5 (0-5,7)

Datos expresados como mediana (rango).

* Mayor porcentaje de células CD13 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IO.

Finalmente, entre la población linfoide, no se detectaron linfocitos T (hCD3⁺) en ningún momento. Los linfocitos B (hCD19⁺) aparecieron, en un porcentaje valorable, en la semana 6. La proporción de linfocitos B en el fémur derecho fue siempre inferior en el grupo trasplantado con células CD34⁺ por vía IV que en el resto. En el contralateral fue superior en el grupo que tenía CSM y había recibido las CD34⁺ por vía IV. En sangre periférica no había diferencias significativas (Tabla 16).

Resultados

Tabla 16: Porcentaje de células B humanas (hCD19) presentes en la fracción hematopoyética humana a las 3 y 6 semanas postrasplante.

		% hCD19		
		Fémur infusión	Fémur contralateral	Sangre periférica
Semana 6	CD34IV	5,3 (0-76,2)	6,9 (0-70,1)	3,7 (0-79,9)
	CD34IV+CSM	24,6 (0-71,2)	25,8 (0-78,3)	4,5 (0-54,3)
	CD34IO	22,7 (0-75,9)	8,7 (0-71,3)	2,8 (0-35,4)
	CD34IO+CSM	26,2 (0-71,2)	15,4 (0-50,7)	2,7 (0-56,6)

Datos expresados como mediana (rango).

5.4.3. Quimerismo hematopoyético con CPH de SCU

El quimerismo humano en los casos en los que se emplearon progenitores de SCU se realizó del mismo modo que con los progenitores de leucoaféresis, pero también se incluyó un grupo trasplantado con células CD34⁺ y CSM por vía intravenosa. A las 3 semanas postrasplante, el porcentaje de células hematopoyéticas humanas, analizadas por su positividad para CD45, en el fémur derecho fue estadísticamente mayor en todos los grupos al compararlo con el trasplante clásico por vía intravenosa (grupo CD34IV). En los fémures contralaterales el mayor grado de quimerismo humano se detectó en el grupo que recibió los dos tipos celulares por vía endovenosa (CD34IV+CSMIV). A las 6 semanas se mantenía esta tendencia pero solamente el grupo que recibió ambos progenitores por vía intraósea (CD34IO+CSMIO) alcanzaba la significación estadística en el fémur de la infusión. En sangre periférica no se detectaron diferencias significativas (Tabla 17).

Tabla 17: Porcentaje de células hematopoyéticas humanas (hCD45) presentes en las muestras de médula ósea y sangre periférica a las 3 y 6 semanas postrasplante de SCU.

		% hCD45		
		Fémur infusión	Fémur contralateral	Sangre periférica
Semana 3	CD34IV	4,0 (0,9-10,3)	4,5 [†] (0,7-10,7)	9,9 (4,4-12,9)
	CD34IV+CSMIO	8,8* (2,6-32,6)	7,5 (2,6-18,2)	11,6 (5,6-17,9)
	CD34IV+CSMIV	12,4* (1,5-34,0)	19,0 (1,7-45,7)	11,2 (6,6-14,6)
	CD34IO	9,3* (2,3-20,6)	5,2 [†] (0,7-10,3)	8,4 (4,1-11,6)
	CD34IO+CSMIO	10,9* (2,1-40,0)	7,5 [†] (0,8-42,3)	9,1 (4,7-20,2)
Semana 6	CD34IV	11,9 (0,8-71,6)	11,3 (1,4-58,6)	17,3 (13,1-26,4)
	CD34IV+CSMIO	17,9 (1,6-66,6)	16,2 (1,3-61,6)	16,2 (7,7-30,9)
	CD34IV+CSMIV	26,2 (1,8-76,1)	19,1 (1,3-71,4)	21,9 (12,3-34,4)
	CD34IO	20,2 (1,8-78,0)	9,4 (2,3-65,4)	15,7 (9,4-32,3)
	CD34IO+CSMIO	39,5* (1,7-85,7)	8,1 (1,6-52,1)	16,2 (6,0-27,5)

Datos expresados como mediana (rango).

* Mayor porcentaje de células CD45 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV.

[†] Menor porcentaje de células CD45 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV+CSMIV.

Dentro de la fracción hematopoyética humana se analizó el porcentaje de células hCD13⁺. En el fémur derecho no se observaron diferencias significativas entre los grupos mientras que en el contralateral, a las 3 semanas postrasplante, el porcentaje de células humanas CD13⁺ fue mayor en el grupo que recibía células hematopoyéticas con CSM por vía intravenosa, alcanzando la significación estadística al analizarse en sangre periférica (Tabla 18).

Tabla 18: Porcentaje de células mieloides humanas (hCD13) en la fracción hematopoyética humana de las muestras de médula ósea y sangre periférica a las 3 y 6 semanas postrasplante de SCU.

		% hCD13		
		Fémur infusión	Fémur contralateral	Sangre periférica
Semana 3	CD34IV	29,9 (1,8-43,9)	15,9 (5,1-36,7)	9,0 [†] (0-39,7)
	CD34IV+CSMIO	27,1 (0-49,6)	19,9 (8,0-48,2)	8,7 [†] (3,9-20,0)
	CD34IV+CSMIV	26,1 (4,2-60,6)	25,3 (10,8-46,6)	18,8 (4,4-35,2)
	CD34IO	22,4 (1,1-49,9)	16,0 (2,0-33,0)	8,2 [†] (0,4-30,6)
	CD34IO+CSMIO	31,9 (5,8-58,4)	12,8 [†] (1,4-34,8)	6,7 [†] (1,8-14,5)
Semana 6	CD34IV	7,2 (0-20,8)	16,1 (0-25,7)	3,9 (0-29,9)
	CD34IV+CSMIO	9,3 (0-32,9)	10,6 (0-35,7)	5,4 (0-26,2)
	CD34IV+CSMIV	7,6 (0-25,0)	7,1 (0-18,8)	4,2 (0-10,0)
	CD34IO	9,0 (0-24,8)	7,1 (0-25,7)	3,5 (0-8,2)
	CD34IO+CSMIO	6,6 (0-28,8)	7,6 (0-25,5)	8,3 [◇] (0-20,6)

Datos expresados como mediana (rango).

* Mayor porcentaje de células CD13 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV.

◇ Mayor porcentaje de células CD13 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IO.

† Menor porcentaje de células CD13 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV+CSMIV.

En los casos de trasplante con células procedentes de SCU tampoco se detectó población de linfocitos T. Respecto a los linfocitos B, a las 3 semanas postrasplante el porcentaje de células hCD19+ en el fémur de la infusión fue significativamente mayor en el grupo 34IO+CSMIO comparado con el procedimiento estándar de 34IV. En el fémur contralateral, los grupos trasplantados por vía intravenosa que habían recibido CSM independientemente de la vía de

infusión (IO e IV) presentaron un mayor porcentaje de células B que el resto de grupos. A las 6 semanas postrasplante se igualaba el porcentaje de células hCD19⁺ entre los distintos grupos e incluso entre ambos fémures. En sangre periférica, a las 6 semanas postrasplante, el grupo 34IV+CSMIO presentaba un mayor porcentaje que los grupos 34IV, 34IO y 34IO+CSMIO.

Tabla 19: Porcentaje de células B humanas (hCD19) presentes en la fracción hematopoyética humana de las muestras de médula ósea y sangre periférica a las 3 y 6 semanas postrasplante de SCU.

		% hCD19		
		Fémur infusión	Fémur contralateral	Sangre periférica
Semana 3	CD34IV	0 (0-9,3)	1,3 [◇] (0-15,6)	0 (0-4,4)
	CD34IV+CSMIO	2,2 (0-16,3)	7,4* (0-16,6)	0,5 (0-10,9)
	CD34IV+CSMIV	6,5 (0-26,1)	9,3 (0,5-17,0)	2,3 (0-7,1)
	CD34IO	5,3 (0-29,4)	0 [†] (0-10,1)	0 (0-19,1)
	CD34IO+CSMIO	10,5* (0-30,2)	0,3 [◇] (0-11,8)	0,5 (0-3,9)
Semana 6	CD34IV	41,5 (0-77,1)	34,4 (0-75,1)	2,5 [†] (0-27,2)
	CD34IV+CSMIO	52,9 (0-84,1)	59,5 (0-81,6)	17,1 (0-51,5)
	CD34IV+CSMIV	58,4 (0-93,8)	63,0* (0-85,7)	10,4 (0-68,2)
	CD34IO	47,9 (0-85,1)	26,3 (0-91,8)	1,8 [†] (0-67,2)
	CD34IO+CSMIO	63,3 (0-88,2)	40,3 (0-82,8)	3,2 [†] (0,2-34,7)

Datos expresados como mediana (rango).

* Mayor porcentaje de células CD19 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV.

[◇] Menor porcentaje de células CD19 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV+CSMIV

[†] Menor porcentaje de células CD19 humanas ($p < 0.05$) comparado con el grupo de CD34IV+CSMIO.

5.4.4. Análisis del quimerismo a nivel del estroma mediante FISH

A las 6 semanas postrasplante, se obtuvieron las CMN de ambos fémures de los ratones trasplantados y se expandieron CSM. Estas células en pase 2 se analizaron tras ser hibridadas con sondas para cromosomas sexuales humanos para diferenciar las CSM humanas de la contaminación por células hematopoyéticas humanas debido a que provenían de donantes de distinto sexo (Figura 29).

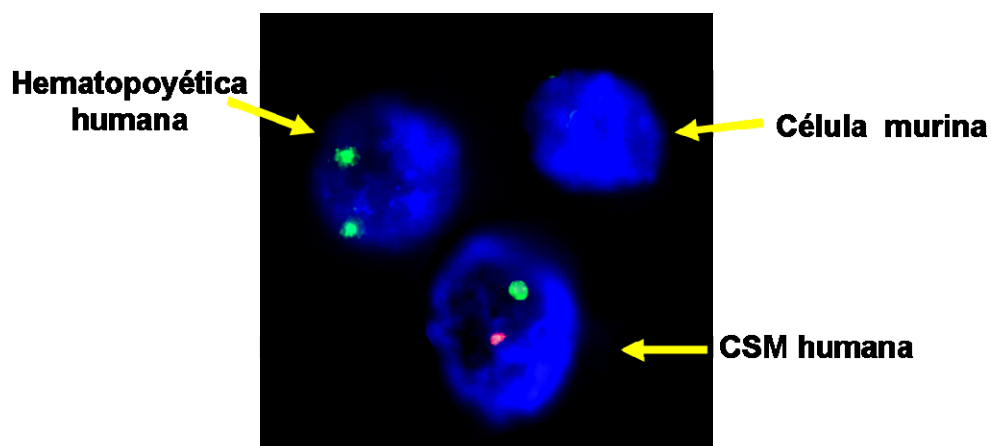


Figura 29: Identificación de CSM humanas, células hematopoyéticas humanas y células murinas.

Debido al bajo número de células detectadas los resultados se expresaron como número de CSM humanas/ preparación (aproximadamente 2000-3000 núcleos). Se pudieron detectar CSM humanas en los fémures en los que habían sido infundidos aunque no en los contralaterales ni en los que se habían infundido las CSM vía intravenosa (Tabla 20).

Tabla 20: CSM humanas en pase 2 detectadas mediante FISH.

	Fémur infusión	Fémur contralateral
CD34IV+CSMIO	22 (0-38)	-
CD34IO+CSMIO	28 (0-43)	-

Datos expresados como mediana (rango).

6. Discusión

Actualmente el TPH supone, en algunos casos, la única alternativa terapéutica para algunos pacientes con enfermedades primarias o tumorales del sistema hematopoyético. La base del trasplante radica en la sustitución de la hematopoyesis enferma por una hematopoyesis sana. El buen desarrollo de la hematopoyesis requiere una estrecha cooperación entre los progenitores hematopoyéticos y una gran variedad de tipos celulares que componen el micromedioambiente medular. Este estroma o micromedioambiente juega un papel fundamental en el anidamiento, injerto, auto-renovación y diferenciación de las células hematopoyéticas. En los últimos años se ha descrito que el daño producido en el estroma durante el acondicionamiento previo al TPH puede verse reflejado en la cinética del anidamiento, injerto y mantenimiento de la población hematopoyética

Las CSM son células progenitoras del estroma medular, por ello se considera que la adición de CSM sanas puede mejorar el injerto y la hematopoyesis tras un TPH^{62,63}. Basados en esta teoría se han desarrollado diversos estudios con el fin de analizar si la co-infusión de CSM junto con los progenitores hematopoyéticos podría mejorar el injerto hematopoyético tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

En relación a los estudios *in vitro*, existen muy pocos datos en la literatura dirigidos a clarificar el papel de las CSM en este proceso. Como se ha descrito previamente, el establecimiento de cultivos de estroma realizados *ex vivo* está directamente relacionado con el daño existente en el estroma, bien sea debido a la enfermedad de base o al acondicionamiento previo al trasplante⁶⁴. Además, este daño se traduce en una disminución en la capacidad para mantener hematopoyesis, entendida como la disminución en la capacidad para formar áreas de *cobblestone* (que representan las áreas de hematopoyesis activa) y por el número de progenitores generados por el cultivo (formación de colonias CFU-GM)⁶⁵.

Discusión

Uno de los objetivos principales de este estudio fue determinar si la adición de CSM sanas podría mejorar la hematopoyesis, puesto que una correcta hematopoyesis es fundamental para la posterior evolución de un TPH. Para realizar el daño en el estroma *in vitro* se empleó un modelo previamente descrito de tratamiento con etopósido, que demuestra el daño que dicho agente provoca en el estroma cuando se utiliza a dosis equivalentes a las empleadas a nivel clínico⁵³. Utilizando este modelo hemos podido comprobar que el etopósido provoca un daño en el estroma que va asociado a una disminución de las variables utilizadas para medir la función hematopoyética (formación de *áreas de cobblestone*, producción de progenitores y confluencia) del estroma *in vitro*. Esta observación se corresponde con los resultados obtenidos en estudios previos que demostraron cómo el estroma establecido en cultivo a partir de MO de pacientes que habían sido sometidos a trasplante presentaba menor capacidad de soportar hematopoyesis al compararlo con estromas sanos^{64,66}. Nuestro modelo difiere del anterior en que el daño se produce por el efecto directo de la quimioterapia *in vitro* obteniendo un estroma alterado que nos permite su comparación con otro normal procedente del mismo sujeto, evitando así la variabilidad interpersonal. Partiendo de este modelo pudimos comprobar cómo los parámetros que analizaban el funcionalismo hematopoyético mostraban una importante disminución de la capacidad del estroma para soportar la hematopoyesis. Posteriormente verificamos que dicha función se restauraba cuando sobre el estroma dañado se añadían CSM sanas junto a la fracción hematopoyética.

Pese a los numerosos estudios llevados a cabo durante los últimos años analizando el papel de las CSM en la hematopoyesis, los mecanismos a través de los cuales actúan estas células no están totalmente establecidos. Actualmente existe cierta controversia en torno a la capacidad para injertar en el estroma receptor tras un trasplante o si por el contrario su acción se debe principalmente a mecanismos

paracrinos, pues aunque la mayoría de los estudios en pacientes trasplantados muestran que las células estromales siguen siendo del receptor datos de nuestro grupo han confirmado que, en determinadas entidades, puede encontrarse cierto grado de quimerismo mixto a nivel de las células mesenquimales¹⁸. Algunos autores han planteado la posibilidad de que la capacidad de las CSM para injertar radica en la profundidad de daño sufrido por el estroma¹⁸. Con el fin de verificar esta hipótesis *in vitro*, partiendo del modelo de daño en el estroma descrito anteriormente, se emplearon distintas concentraciones de etopósido para provocar daño estromal y comparar el injerto de las CSM sanas en cada grupo, comprobando que a mayor daño, mayor proporción de CSM sanas se incorporaban al estroma, lo que apoya los datos publicados previamente por nuestro grupo a los que acabamos de hacer referencia, indicando que en hemopatías con daño intenso del estroma es posible que las CSM trasplantadas se incorporen al estroma del receptor. Estos hallazgos sugieren que en el modelo *in vitro* la incorporación de las CSM sanas a la capa adherente puede deberse a los espacios físicos vacíos producidos por la disminución de la confluencia, que además de tener preservada su capacidad de crecimiento adquieren una ventaja proliferativa sobre las células dañadas.

Puesto que en muchos estudios previos se ha sugerido que las CSM no son capaces de anidar en la MO del receptor pero pueden producir, sin embargo, un efecto beneficioso sobre la hematopoyesis, se ha postulado la hipótesis de que el efecto se ejerce mediante un mecanismo paracrino que actuaría en las células residentes. Con el fin de conocer si el contacto célula-célula era necesario en la mejora del estroma o si simplemente los factores secretados por las CSM eran los responsables de dicha mejora, se añadió al estroma dañado el sobrenadante producido por el cultivo de CSM sanas. Nuestros resultados mostraron una ligera mejoría en la confluencia de los estromas tras ser cultivados con sobrenadante de

Discusión

CSM sanas, sugiriendo que las CSM sanas pueden actuar mediante dos mecanismos, paracrino y por contacto celular, aunque este último parece ser más eficaz en nuestro modelo (Tabla 7). Sin embargo, no podemos descartar que el daño producido por las altas concentraciones de etopósido sea tan profundo que las células residuales residentes sean tan escasas o estén tan dañadas que el sobrenadante no sea suficiente para compensarlo.

Pero en el presente trabajo no hemos demostrado únicamente que las CSM tienen alterada su capacidad de proliferación sino que hemos visto que tras el tratamiento con etopósido se ve alterada la expresión de algunas moléculas relevantes en el mantenimiento del nicho como son SDF1 y OPN⁶⁷. SDF1 es una molécula directamente implicada en la atracción y anclaje de las CPH al estroma a través de su ligando CXCR4⁶⁸. De hecho, se considera que dicho eje, SDF1/CXCR4, es el más importante en el proceso. Puesto que como comentábamos previamente en nuestro modelo habíamos observado un mayor número de células en el sobrenadante (Tabla 5), lo que sugería menor proporción de células que se anclaban al estroma, quisimos comprobar si este importante mecanismo de anclaje podría estar detrás de este déficit.

Analizando la expresión de SDF1 α , se pudieron observar grandes diferencias entre los estromas tratados y los normales. Los *cluster* de células poligonales, positivas para el factor quimiotáctico, que se observan en los controles podrían interpretarse como nichos en los que se produciría el anidamiento de las células hematopoyéticas a través de su receptor CXCR4. Por el contrario, en los estromas tratados apenas aparecían células positivas para SDF1 α y en ningún caso se observó la formación de estas estructuras de agregados celulares, por lo que siguiendo el mismo razonamiento anterior, la ausencia de estos nichos SDF1 α + justificaría la menor o nula presencia de áreas de *cobblestone* que se observaba en estos cultivos.

Nuevos experimentos están en marcha con el fin de confirmar esta hipótesis. Cuando se añadió el sobrenadante de las CSM pudimos comprobar que, pese a que la recuperación no era total, se observaban una mayor proporción de células positivas, sugiriendo que células residentes dañadas incrementaban la secreción de la quimiocina por el efecto paracrino de las CSM sanas.

La OPN es una molécula fundamental que está implicada en el mantenimiento del nicho de las células hematopoyéticas más inmaduras: el nicho de la célula *stem*. Esta fue la razón por la que estudiamos también la expresión de la OPN en el contexto de nuestro modelo de daño en el estroma *in vitro*. Curiosamente, al contrario de lo que ocurría con la expresión de SDF1, la expresión de OPN era superior en las células de los estromas tratados con etopósido. Aunque el número de células positivas para OPN era escaso en todos los grupos estudiados, su número e intensidad de expresión era superior en los estromas dañados que en los controles. Estos hallazgos podrían interpretarse como un mecanismo compensatorio del mismo, con el fin de preservar la población hematopoyética más inmadura. Además, cuando los estromas dañados se cultivaban con sobrenadante de CSM sanas aumentaba la expresión de OPN, ayudando de esta manera a mejorar este mecanismo de rescate del estroma para mantener la población de progenitores hematopoyéticos más inmaduros y fundamentales para el mantenimiento de la hematopoyesis a largo plazo.

Puesto que la adición de CSM sanas mejoraba la confluencia de la capa adherente y algunas moléculas presentes en el estroma e implicadas en el mantenimiento de la hematopoyesis, otro objetivo del presente estudio fue analizar cómo este hecho podía afectar a la propia hematopoyesis. Para ello, analizamos la proliferación y diferenciación de los progenitores, y si estos efectos se debían a mecanismos paracrinos o al contacto célula-célula. Como ya habíamos comentado

Discusión

previamente, es bien conocido, y datos de nuestro grupo así lo avalan, el daño que se produce en el estroma se traduce en un soporte alterado de la hematopoyesis⁴⁸. Estos datos se confirman en el modelo *in vitro* de nuestro trabajo. En relación a la proliferación de las células hematopoyéticas, se observó la necesidad de un estroma sano para mantenerla, puesto que esta estaba claramente disminuída en los estromas dañados mientras que al añadir CSM de otro donante los valores de proliferación hematopoyética recuperaban su nivel normal. Este efecto era muy evidente cuando el análisis se realizaba permitiendo el contacto directo célula-célula. Cuando el ensayo *in vitro* analizaba el efecto de moléculas solubles que actúan mediante un efecto paracrino (a través de una membrana porosa o *transwell*) la proliferación de las células hematopoyéticas aumentaba, aunque sin alcanzar los valores obtenidos por contacto directo.

Analizamos también la capacidad del estroma para inducir la diferenciación de las células hematopoyéticas. Mediante la expresión de marcadores tempranos de diferenciación como son CD162 y CD164 se valoró el inicio de dicha diferenciación. La elección de estos marcadores se debió a que en los tiempos de cultivo analizados (2 y 5 días) la diferenciación final es muy escasa. Comprobamos que la capacidad de diferenciación de las células hematopoyéticas se produce de forma más satisfactoria en los estromas sanos y cuando las CPH estaban en contacto directo con el estroma. En los estromas dañados esta capacidad de diferenciación disminuye aunque se recuperaba casi completamente gracias al rescate del estroma con CSM sanas. Este dato concuerda con el bajo número de CFU-GM producido por las células de los estromas dañados. Debido a la importancia del balance entre proliferación y diferenciación para el mantenimiento de la hematopoyesis, nuestros datos indican la necesidad de un estroma sano para el buen funcionamiento de la misma y por lo tanto, para mantener una hematopoyesis adecuada pos-trasplante.

El mantenimiento del nicho hematopoyético depende en gran medida de una interacción entre las células hematopoyéticas y el estroma mediante moléculas reguladoras producidas por éste. En los últimos años se ha descrito que la interacción entre receptores de las células hematopoyéticas y sus ligandos en las células del estroma y la matriz extracelular pueden variar las decisiones de las primeras en lo que a proliferación, diferenciación o mantenimiento de la quiescencia se refiere. Integrinas de la familia beta 1, principalmente el VLA4, y receptores de quimiocinas, entre los que destaca el CXCR4, se han caracterizado y estudiado en los progenitores hematopoyéticos y células más inmaduras relacionándolos con su capacidad para mantener hematopoyesis a largo plazo tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Estas moléculas tan importantes implicadas en la interacción de las CPH y su estroma, se estudiaron en este trabajo para conocer si podrían afectarse por el daño sufrido por el estroma y por lo tanto contribuir a la hematopoyesis defectuosa.

La expresión de la integrina VLA4, posiblemente debido a su papel en el anclaje a la matriz extracelular, era superior cuando las células hematopoyéticas se encontraban en contacto directo con el estroma, mientras que en los estromas tratados, en los que se había visto que el establecimiento de áreas de *cobblestone* era inferior, la expresión de VLA4 se redujo de manera significativa, sugiriendo un déficit de anclaje de las CPH al estroma. La adición directa de CSM sanas permitía incrementar nuevamente la expresión de VLA4 en las células hematopoyéticas. Quisimos analizar si la inducción de la expresión de dicha molécula de adhesión podría deberse a la secreción de moléculas que actuaran por mecanismos paracrinos. Por ello se diseñaron estudios en *transwell* y comprobamos que era necesario el contacto directo de las células del estroma para inducir su expresión.

Como hemos comentado previamente, el eje SDF1/CXCR4 es fundamental en la regulación de la hematopoyesis. Como complemento al análisis de SDF1

Discusión

llevado a cabo sobre las CSM, analizamos su ligando CXCR4 en las células hematopoyéticas. Al igual que se observaba una baja expresión de SDF1 α en los estromas tratados, la expresión de CXCR4 en las CPH mantenidas en contacto con estos estromas era menor que en las condiciones control. Sin embargo, al contrario de lo que ocurría con VLA4, cuando analizamos a través de qué mecanismo podía incrementar su expresión al intentar mejorar la función hematopoyética con Tp-CSM, comprobamos que la expresión de CXCR4 era mayor en los estudios realizados en *transwell*, es decir, por efecto a distancia de las CSM, lo que sugiere la importancia del eje SDF1/CXCR4 como ruta de quimiotaxis. Y que es a través de mecanismos paracrinicos cuando su expresión se restaura en las células hematopoyéticas.

La alteración del eje SDF1/CXCR4 en estromas dañados puede ser en parte responsable del bajo injerto observado en los estromas dañados por la radioquimioterapia utilizadas previamente al TPH. El aumento de SDF1 tras la recuperación del estroma con CSM sanas puede promover el aumento de CXCR4 y por consiguiente la interacción entre las células del estroma y las hematopoyéticas, facilitando así la migración de los CPH hasta el estroma y favoreciéndose su anclaje gracias al incremento producido en moléculas de adhesión como VLA4.

Si bien los estudios *in vitro* ofrecen una amplia aproximación a diversos aspectos de la biología del trasplante, son los ensayos *in vivo* los que permiten obtener una información más aproximada de lo que sucede con el trasplante en clínica. Gracias a los modelos animales, más concretamente a los modelos murinos, podemos analizar la sustitución de la hematopoyesis de un ratón receptor irradiado con la de un ratón donante^{25;26} e incluso con los modelos de ratones inmunodeprimidos, la realización de trasplantes xenogénicos²⁷, permitiendo establecer un modelo intermedio entre la investigación y la clínica. Desde que en

1983 Bosma y cols. describiesen la mutación SCID⁶⁹ hasta la actualidad, muchos han sido los modelos humanizados desarrollados, que convierten a este tipo de estudios en un paso fundamental en la investigación traslacional en diversas enfermedades⁷⁰. El modelo de injerto en ratones NOD/SCID con células CD34⁺ humanas es el más empleado en el contexto de trasplante hematopoyético y la base de los estudios *in vivo* de este trabajo.

Puesto que uno de nuestros primeros objetivos era analizar el efecto de las CSM sobre el injerto hematopoyético, quisimos saber qué sucedía cuando se inyectaban por distintas vías (IV e IO), su biodistribución y su tiempo de permanencia en el cuerpo del animal que las recibía. Además, quisimos comprobar su presencia en el estroma de la MO del ratón mediante estudios de hibridación *in situ*.

Cuando las CSM se infundieron vía IV, observamos mediante bioluminiscencia, que la mayoría de las células infundidas quedaban retenidas en los pulmones, donde su señal se detectaba como mucho durante 10 días. En el epígrafe de resultados, hemos comentado, como veremos a continuación, el aumento del injerto hematopoyético en ambos fémures tras inyección IV, indicando que las células podrían actuar por mecanismos paracrinos (tabla...). Otros autores han descrito en diversas enfermedades y situaciones que posiblemente sea este mecanismo el que actúe sobre los progenitores hematopoyéticos, sobre células del estroma dañadas mejorando su función o mediante ambos mecanismos^{71;72}. Aunque en nuestro modelo *in vitro* el efecto paracrino de las CSM no era suficiente para reconstituir los estromas, podría deberse a que el modelo empleado es demasiado agresivo y en cambio, en el modelo *in vivo*, donde el daño por radiación es más leve, claramente los mecanismos paracrinos pueden suplir el injerto de las CSM en el

Discusión

estroma. De hecho, los estudios realizados de forma preliminar en el contexto clínico del trasplante hematopoyético, la infusión de ha realizado por vía IV.

En el caso de la infusión de CSM por vía IO, su detección en el sitio de la inyección era posible durante las 6 semanas de duración del estudio, tal y como se observaba en las imágenes de bioluminiscencia (Figura 30), demostrando que la falta habitual de CSM en el contexto de trasplante se debe, no a la destrucción de las células por parte del huésped sino a su “atrapamiento” en un medio no idóneo para su supervivencia como son los pulmones. Sin embargo, su efecto sobre el injerto hematopoyético se producía en ambos fémures, por lo que posiblemente, a este nivel funcionen por ambos mecanismos: contacto celular y secreción de factores con efecto paracrino.

Tras finalizar las 6 semanas, se sacrificaron los ratones y se expandieron las CSM de los fémures de los ratones en los que se habían inyectado CSM por vía IV, pero no se detectaron las CSM del donante mediante FISH, pese a que un era evidente un efecto sobre el injerto. Este hecho podría deberse a 2 factores: que las CSM de los ratones tuviesen en cultivo una ventaja proliferativa sobre las humanas durante la expansión o porque el efecto se hubiera producido a través de factores tróficos que hubiesen mejorado la función de las CSM residentes.

Cuando el análisis se llevó a cabo en los ratones que recibieron las CSM vía IO, solamente pudimos demostrar su presencia en los fémures donde se habían inyectado y no en los contralaterales. Sin embargo, el número de CSM de origen humano detectado con esta metodología fue inferior al que cabría esperar, puesto que al ser detectables mediante bioluminiscencia en un punto tan profundo como el interior del fémur, su proporción debería ser mayor. Esto reafirma nuestra hipótesis de que en el cultivo las CSM murinas adquieren una ventaja proliferativa o también

puede ser que la señal que detectamos en el fémur provenga de CSM que se han diferenciado a hueso y por eso permanecen en el mismo pero no se obtienen a partir de la MO. De hecho, en algunos ensayos clínicos en los que se han utilizado CSM posteriormente se han detectado en el hueso.

Utilizando este modelo humanizado, se emplearon para el presente trabajo dos vías de infusión, el modelo considerado estándar IV y el IO que actualmente se está utilizando en ensayos clínicos en casos de baja celularidad como el trasplante con SCU⁷³ o en enfermedades autoinmunes⁷⁴. Con cualquiera de las dos fuentes de progenitores hematopoyéticos que se han estudiado (SP movilizada o SCU) se ha demostrado que el injerto humano en la MO de los puntos de infusión (en el fémur derecho en el caso del trasplante IO) era superior que cuando se realiza el trasplante vía IV, sin observarse diferencias en el quimerismo del fémur contralateral o de SP. En la mayoría de los ensayos clínicos descritos hasta el momento, el trasplante IO no ha demostrado claramente que acorta el tiempo de injerto hematopoyético, aunque la tasa de fallo de injerto plaquetario es menor que el trasplante estándar, y la incidencia de EICHa es menor⁷³.

Con relación a sus poblaciones analizadas, células mieloides o linfoides, comprobamos que ambas poblaciones estaban presentes en mayor o menor proporción cuando la inyección se realizaba por vía IO, lo que sugiere que los mecanismos de migración/anidamiento de los progenitores hematopoyéticos adultos no son óptimos en este modelo xenogénico. A nivel de diferenciación hematopoyética, cuando se emplean progenitores de SP movilizada, se muestra una mayor proporción de células humanas CD13⁺ en los fémures de infusión IO que en el resto, tanto a las 3 como a las 6 semanas, al igual que mayor porcentaje de CD19⁺ a las 6 semanas⁷³.

Discusión

Además de la vía de infusión de los progenitores para el trasplante, en este trabajo analizamos el efecto de las CSM para mejorar el injerto. Diversos estudios indican que las CSM infundidas vía IV quedan retenidas en los pulmones y lo mismo hemos demostrado en este trabajo. Puesto que su injerto aumenta cuando la infusión se realiza de manera local, en el caso del trasplante de progenitores hematopoyéticos lo más eficiente sería administrar las células vía intraósea^{75;76}. Sin embargo, nuestros resultados muestran dos hechos: por un lado que la inyección de mesenquimales mejora siempre la hematopoyesis independientemente de la vía de administración. Estos datos corroboran su efecto paracrino, mejorando la hematopoyesis y reafirmando lo datos anteriormente expuestos en nuestros estudios *in vitro*. Puesto que en nuestro modelo de trasplante xenogénico el daño en el estroma no debe ser muy grave, la mejoría del injerto podría deberse al incremento mediante efecto paracrino de la expresión de moléculas de adhesión/migración que como hemos visto previamente se induce en los CPH en presencia de CSM. Con relación a las subpoblaciones analizadas el injerto mieloide es más precoz. Sin embargo, posteriormente predomina el injerto linfoide, sobre todo en presencia de CSM. Hay que tener en cuenta que las CSM están también implicadas en el control de la diferenciación linfoide B, lo que también se aprecia en otros ensayos *in vivo*. En el caso del modelo empleado en este trabajo se infundieron directamente en el fémur derecho de los animales. Cuando se empleaban progenitores procedentes de SP movilizada, las CSM mejoraban el injerto hematopoyético tanto en el trasplante IO como en el IV. Además, en el caso del trasplante IV, este mayor injerto se observaba tanto en el fémur en el que se habían infundido las CSM como en el contralateral. A las 6 semanas pos-trasplante, los grupos que recibían CSM seguían manteniendo estas diferencias, aunque las diferencias eran más discretas. Además, funcionalmente, estas células de origen humano eran capaces de diferenciarse. El

injerto mieloide temprano era estadísticamente mayor en los grupos en los que se habían infundido CSM, destacando que en el caso del trasplante hematopoyético IV estas diferencias se observaban también en la MO del fémur contralateral y en SP. A las 6 semanas postrasplante se reducía el porcentaje de células CD13⁺, quizá a favor de la diferenciación linfoide, ya que es a estos tiempos cuando emerge la población CD19⁺, siendo mayor su porcentaje en los grupos co-trasplantados con CSM. Con estos datos podemos decir que las CSM favorecen no solo el injerto de los progenitores hematopoyéticos mieloides sino también los linfoides y apoyan los datos preliminares de ensayos clínicos, en los que las CSM mejoran o aceleran el injerto^{56;77}. El grupo de Lazarus y cols., pioneros en los ensayos clínicos para mejorar el injerto en TPH con CSM, describen como en su ensayo en fase I-II el uso de CSM autólogas en TPH autólogos en pacientes con cáncer de mama sometidas a altas dosis de quimioterapia se observa una reducción en el tiempo de injerto de neutrófilos (8 días) y de recuento de plaquetas (8,5 días)⁵⁴. Aunque este mismo grupo fue incapaz de demostrar esta diferencia cuando realizó en un estudio randomizado en pacientes con enfermedades hematológicas empleando CSM alogénicas procedentes del mismo donante del TPH⁵⁵, probablemente debido a que el tiempo del injerto era corto y difícil de mejorar.

Puesto que en el TPH alogénico llevado a cabo con CPSP el fallo de injerto o el injerto pobre son excepcionales, realizamos un ensayo similar utilizando SCU, en el cual estos problemas son más frecuentes. Comprobamos que la co-infusión de CSM aumentaba el injerto hematopoyético. Pero además, debido a la reciente afirmación por diversos grupos de que las CSM actúan principalmente por mecanismos paracrinos⁷¹ y puesto que según algunos autores no es necesario el injerto de un alto número de CSM para ver su efecto⁷², incluimos otro grupo experimental en el que se realizaba el trasplante por vía IV con infusión de CSM por

Discusión

la misma vía. Así, en todos los casos la infusión de CSM provocaba un aumento en el injerto hematopoyético tanto a corto como a medio plazo, pero si a corto plazo las CSM IV en trasplante IV eran la mejor opción, a medio plazo la infusión IO de ambos tipos celulares mostraba un mayor porcentaje de células humanas, confirmando que la presencia de CSM humanas en el micromedioambiente hematopoyético mejora la hematopoyesis humana en el modelo xenogénico a corto plazo. Sin embargo, incluso la infusión IV de estas células podría mejorar el injerto precoz probablemente a través de mecanismos paracrinos también cuando se utiliza SCU. En cuanto al estudio de poblaciones hematopoyéticas, el injerto mieloide temprano era ligeramente mayor en los grupos cotrasplantados con CSM. En el caso del trasplante IV estas diferencias se hacían especialmente evidentes en los fémures contralaterales. Quizá, en el grupo que no recibía CSM el daño causado por la infusión del suero fisiológico en el fémur derecho podía favorecer una mayor migración de las células hematopoyéticas humanas en el momento del trasplante, pero esta hipótesis necesita confirmación. Este hecho es difícil de explicar porque no existen experimentos en la literatura que lo avalen.

Con relación al injerto de la población linfóide, en los grupos que recibieron SCU, aparecía más precozmente que cuando se usaban progenitores de SP movilizada y su proporción se mantenía más alta que la mieloide a lo largo de todo el periodo de estudio.

El análisis general de todos los grupos estudiados muestra que el TPH IO mejora el injerto respecto al trasplante IV, pero si en el momento del trasplante se infunden CSM, además de aumentar el injerto de cada grupo, desaparecen las diferencias de injerto asociadas a la vía de infusión. En cuanto a las CSM, cuando se emplea la vía IO su efecto es apreciable no sólo en el fémur de la infusión sino también en el contralateral, hecho que se hace más notorio en el caso del trasplante

hematopoyético por vía IV, probablemente al mejorar la migración de las CPH hacia un micromedioambiente adecuado.

7. Conclusiones

A la vista de lo anteriormente expuesto llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Con relación a la capacidad de las CSM para mejorar la función hematopoyética:

1.a- La adición de CSM sanas en modelos *in vitro* puede restaurar e incorporarse al estroma receptor cuando el daño es muy importante mejorando la función hematopoyética.

1.b- La co-infusión de CSM junto con la fracción hematopoyética puede incrementar y acelerar el injerto hematopoyético.

2. Con relación a los efectos producidos por la adición de CSM sanas en la función hematopoyética *in vitro*:

2.a- A nivel de estroma, la expresión de moléculas clave en el mantenimiento del nicho como SDF1 y OPN se encuentran afectadas por el etopósido. En presencia de Tp-CSM se incrementa su expresión

2.b- A nivel de los progenitores hematopoyéticos, induce la recuperación del equilibrio entre proliferación/diferenciación previamente dañado por la exposición del estroma al etopósido y el incremento en la expresión de CXCR-4 y VLA4 que favorecen su anclaje al estroma

3. Con relación a la vía de infusión de CSM en el trasplante:

3.a- La inyección IO de CSM en el modelo animal permite su injerto y permanencia en el sitio de inyección durante largos periodos de tiempo.

4. Con relación a la vía de infusión de los progenitores hematopoyéticos:

Conclusiones

4.a- La inyección IO de ambas poblaciones celulares, mesenquimales y hematopoyéticas, favorece la hematopoyesis en el sitio de inyección mientras que la inyección intravenosa de ambas favorece la hematopoyesis en ambos fémures

8. Bibliografia

1. J. E. Till and E. A. McCulloch, "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells," Radiat. Res., 1961, 14: 213-222.
2. I. L. Weissman, "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution," Cell, 2000, 100: 157-168.
3. A. Lopez Borrasca, Enciclopedia Iberoamericana de Hematología 1992).
4. G. J. Spangrude, S. Heimfeld, and I. L. Weissman, "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells," Science, 1988, 241: 58-62.
5. D. S. Krause, M. J. Fackler, C. I. Civin, and W. S. May, "CD34: structure, biology, and clinical utility," Blood, 1996, 87: 1-13.
6. A. W. Wognum, A. C. Eaves, and T. E. Thomas, "Identification and isolation of hematopoietic stem cells," Arch. Med. Res., 2003, 34: 461-475.
7. R. Schofield, "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell," Blood Cells, 1978, 4(1-2): 7-25.
8. S. Mishima, A. Nagai, S. Abdullah, C. Matsuda, T. Taketani, S. Kumakura, H. Shibata, H. Ishikura, S. U. Kim, and J. Masuda, "Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent," Eur J Haematol., 2010, Jun;84(6): 538-46.
9. M. H. Raaijmakers, S. Mukherjee, S. Guo, S. Zhang, T. Kobayashi, J. A. Schoonmaker, B. L. Ebert, F. Al-Shahrour, R. P. Hasserjian, E. O. Scadden, Z. Aung, M. Matza, M. Merkschlager, C. Lin, J. M. Rommens, and D. T. Scadden, "Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia," Nature, 2010, 464: 852-857.
10. A. J. Friedenstein, I. I. Piatetzky-Shapiro, and K. V. Petrakova, "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells," J. Embryol. Exp. Morphol., 1966, 16: 381-390.
11. A. J. Friedenstein, K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova, "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues," Transplantation, 1968, 6: 230-247.
12. A. J. Friedenstein, "Marrow stromal fibroblasts," Calcif. Tissue Int., 1995, 56 Suppl 1: S17.
13. S. A. Kuznetsov, A. J. Friedenstein, and P. G. Robey, "Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro," Br. J. Haematol., 1997, 97: 561-570.
14. H. Castro-Malaspina, R. E. Gay, G. Resnick, N. Kapoor, P. Meyers, D. Chiarieri, S. McKenzie, H. E. Broxmeyer, and M. A. Moore,

- "Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny," Blood, 1980, 56: 289-301.
15. A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina, "Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs," Exp. Hematol., 1976, 4: 267-274.
 16. P. A. Conget and J. J. Minguell, "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells," J. Cell Physiol, 1999, 181: 67-73.
 17. P. J. Simmons and B. Torok-Storb, "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1," Blood, 1991, 78: 55-62.
 18. E. M. Villaron, J. Almeida, N. Lopez-Holgado, M. Alcoceba, L. I. Sanchez-Abarca, F. M. Sanchez-Guijo, M. Alberca, J. A. Perez-Simon, J. F. San Miguel, and M. C. Del Canizo, "Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation," Haematologica, 2004, 89: 1421-1427.
 19. L. Jackson, D. R. Jones, P. Scotting, and V. Sottile, "Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications," J. Postgrad. Med., 2007, 53: 121-127.
 20. M. F. Pittenger, J. D. Mosca, and K. R. McIntosh, "Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma," Curr. Top. Microbiol. Immunol., 2000, 251: 3-11.
 21. H. Aslan, Y. Zilberman, L. Kandel, M. Liebergall, R. J. Oskouian, D. Gazit, and Z. Gazit, "Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells," Stem Cells, 2006, 24: 1728-1737.
 22. M. Baddoo, K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G. C. Koppen, and D. G. Phinney, "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection," J. Cell Biochem., 2003, 89: 1235-1249.
 23. Blanc K. Le and O. Ringden, "Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation," Biol. Blood Marrow Transplant., 2005, 11: 321-334.
 24. A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells," Eur. J. Immunol., 2006, 36: 2566-2573.
 25. L. O. JACOBSON, E. L. SIMMONS, E. K. MARKS, and J. H. ELDREDGE, "Recovery from radiation injury," Science, 1951, 113: 510-511.
 26. E. LORENZ, D. UPHOFF, T. R. REID, and E. SHELTON, "Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections," J Natl. Cancer Inst., 1951, 12: 197-201.

27. E. D. THOMAS, H. L. LOCHTE, Jr., W. C. LU, and J. W. FERREBEE, "Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy," *N. Engl. J Med.*, 1957, 257: 491-496.
28. E. D. THOMAS, C. D. Buckner, M. Banaji, R. A. Clift, A. Fefer, N. Flournoy, B. W. Goodell, R. O. Hickman, K. G. Lerner, P. E. Neiman, G. E. Sale, J. E. Sanders, J. Singer, M. Stevens, R. Storb, and P. L. Weiden, "One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation," *Blood*, 1977, 49: 511-533.
29. W. I. Bensinger, P. J. Martin, B. Storer, R. Clift, S. J. Forman, R. Negrin, A. Kashyap, M. E. Flowers, K. Lilleby, T. R. Chauncey, R. Storb, and F. R. Appelbaum, "Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers," *N. Engl. J Med.*, 2001, 344: 175-181.
30. N. Schmitz, A. Bacigalupo, D. Hasenclever, A. Nagler, E. Gluckman, P. Clark, P. Bourquelot, H. Greinix, N. Frickhofen, O. Ringden, A. Zander, J. F. Apperley, C. Gorin, K. Borkett, G. Schwab, M. Goebel, N. H. Russell, and A. Gratwohl, "Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukaemia: first results of a randomised multicentre trial of the European Group for Blood and Marrow Transplantation," *Bone Marrow Transplant.*, 1998, 21: 995-1003.
31. E. Gluckman, H. A. Broxmeyer, A. D. Auerbach, H. S. Friedman, G. W. Douglas, A. Devergie, H. Esperou, D. Thierry, G. Socie, P. Lehn, and ., "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling," *N. Engl. J Med.*, 1989, 321: 1174-1178.
32. K. K. Ballen, "New trends in umbilical cord blood transplantation," *Blood*, 2005, 105: 3786-3792.
33. T. R. Bradley and D. Metcalf, "The growth of mouse bone marrow cells in vitro," *Aust. J Exp Biol Med. Sci.*, 1966, 44: 287-299.
34. C. M. Verfaillie, R. Ploemacher, Persio J. Di, R. Sutherland, S. Serke, H. Johnsen, S. Noga, and R. Negrin, "Assays to determine hematopoietic stem cell content in blood or marrow grafts," *Cytotherapy.*, 1999, 1: 41-49.
35. T. M. Dexter, T. D. Allen, and L. G. Lajtha, "Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro," *J Cell Physiol*, 1977, 91: 335-344.
36. L. D. Shultz, P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. V. Rajan, D. L. Greiner, and ., "Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice," *J Immunol.*, 1995, 154: 180-191.
37. D. L. Greiner, L. D. Shultz, J. Yates, M. C. Appel, G. Perdrizet, R. M. Hesselton, I. Schweitzer, W. G. Beamer, K. L. Shultz, S. C. Pelsue, J. H. Leif, and T. V. Rajan, "Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-

- scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice," Am. J Pathol., 1995, 146: 888-902.
38. R. M. Hesselton, D. L. Greiner, J. P. Mordes, T. V. Rajan, J. L. Sullivan, and L. D. Shultz, "High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice," J Infect. Dis., 1995, 172: 974-982.
39. J. Cashman, K. Bockhold, D. E. Hogge, A. C. Eaves, and C. J. Eaves, "Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood," Br. J Haematol., 1997, 98: 1026-1036.
40. P. A. Lowry, L. D. Shultz, D. L. Greiner, R. M. Hesselton, E. L. Kittler, C. Y. Tiarks, S. S. Rao, J. Reilly, J. H. Leif, H. Ramshaw, F. M. Stewart, and P. J. Quesenberry, "Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients," Biol Blood Marrow Transplant., 1996, 2: 15-23.
41. G. W. Santos, P. J. Tutschka, R. Brookmeyer, R. Saral, W. E. Beschoner, W. B. Bias, H. G. Braine, W. H. Burns, G. J. Eifenbein, H. Kaizer, and ., "Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide," N. Engl. J Med., 1983, 309: 1347-1353.
42. K. Antman, L. Ayash, A. Elias, C. Wheeler, M. Hunt, J. P. Eder, B. A. Teicher, J. Critchlow, J. Bibbo, L. E. Schnipper, and ., "A phase II study of high-dose cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin with autologous marrow support in women with measurable advanced breast cancer responding to standard-dose therapy," J Clin Oncol., 1992, 10: 102-110.
43. N. Ketterer, A. Sonet, C. Dumontet, I. Moullet, C. Thieblemont, D. Espinouse, F. Bouafia, B. Coiffier, and G. Salles, "Toxicities after peripheral blood progenitor cell transplantation for lymphoid malignancies: analysis of 300 cases in a single institution," Bone Marrow Transplant., 1999, 23: 1309-1315.
44. M. M. Roberts, L. B. To, D. Gillis, J. Mundy, C. Rawling, K. Ng, and C. A. Juttner, "Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation," Bone Marrow Transplant., 1993, 12: 469-475.
45. N. Chakraborty, S. Bilgrami, L. Maness, C. Guo, A. Perez-Diez, B. Mukherji, and P. Tutschka, "Myeloablative chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for metastatic breast cancer: immunologic consequences affecting clinical outcome," Bone Marrow Transplant., 1999, 24: 837-843.
46. H. Ozer, J. O. Armitage, C. L. Bennett, J. Crawford, G. D. Demetri, P. A. Pizzo, C. A. Schiffer, T. J. Smith, G. Somlo, J. C. Wade, J. L. Wade, III, R. J. Winn, A. J. Wozniak, and M. R. Somerfield, "2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors:

- evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel," J Clin Oncol., 2000, 18: 3558-3585.
47. B. Bolwell, M. Goormastic, S. Andresen, A. Koo, K. Wise, B. Overmoyer, B. Pohlman, and M. Kalaycio, "Variables associated with the platelet count 6 weeks after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation," Bone Marrow Transplant., 1998, 22: 547-551.
 48. F. M. Sanchez-Guijo, L. I. Sanchez-Abarca, E. Villaron, N. Lopez-Holgado, M. Alberca, L. Vazquez, J. A. Perez-Simon, J. Lopez-Fidalgo, A. Orfao, M. D. Caballero, M. C. del Canizo, and J. F. San Miguel, "Posttransplant hematopoiesis in patients undergoing sibling allogeneic stem cell transplantation reflects that of their respective donors although with a lower functional capability," Exp. Hematol., 2005, 33(8): 935-942.
 49. O. Lopez-Villar, J. L. Garcia, F. M. Sanchez-Guijo, C. Robledo, E. M. Villaron, P. Hernandez-Campo, N. Lopez-Holgado, M. ez-Campelo, M. V. Barbado, J. A. Perez-Simon, J. M. Hernandez-Rivas, J. F. San-Miguel, and M. C. del Canizo, "Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome," Leukemia, 2009, 23: 664-672.
 50. J. A. Perez-Simon, S. Tabera, M. E. Sarasquete, M. ez-Campelo, J. Canchado, L. I. Sanchez-Abarca, B. Blanco, I. Alberca, C. Herrero-Sanchez, C. Canizo, and J. F. San Miguel, "Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura," Cytotherapy., 2009, 11: 698-705.
 51. N. Lopez-Holgado, C. Pata, E. Villaron, F. Sanchez-Guijo, M. Alberca, A. Martin, M. Corral, I. Sanchez-Abarca, J. A. Perez-Simon, J. F. San Miguel, and M. C. del Canizo, "Long-term bone marrow culture data are the most powerful predictor of peripheral blood progenitor cell mobilization in healthy donors," Haematologica, 2005, 90(3): 353-359.
 52. S. W. Adams, L. Wang, J. Fortney, and L. F. Gibson, "Etoposide differentially affects bone marrow and dermal derived endothelial cells," J Cell Mol Med., 2004, 8: 338-348.
 53. S. D. Clutter, J. E. Fortney, and L. F. Gibson, "Chemotherapy disrupts activity of translational regulatory proteins in bone marrow stromal cells," Exp Hematol., 2006, 34: 1522-1531.
 54. O. N. Koc, S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, and H. M. Lazarus, "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy," J. Clin. Oncol., 2000, 18: 307-316.
 55. H. M. Lazarus, O. N. Koc, S. M. Devine, P. Curtin, R. T. Maziarz, H. K. Holland, E. J. Shpall, P. McCarthy, K. Atkinson, B. W. Cooper, S. L. Gerson, M. J. Laughlin, F. R. Loberiza, Jr., A. B. Moseley, and A. Bacigalupo, "Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal

- stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients," Biol. Blood Marrow Transplant., 2005, 11: 389-398.
56. Blanc K. Le, H. Samuelsson, B. Gustafsson, M. Remberger, B. Sundberg, J. Arvidson, P. Ljungman, H. Lonnie, S. Nava, and O. Ringden, "Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells," Leukemia, 2007, 21: 1733-1738.
57. J. J. Minguell, A. Erices, and P. Conget, "Mesenchymal stem cells," Exp. Biol. Med. (Maywood.), 2001, 226: 507-520.
58. S. Carrancio, N. Lopez-Holgado, F. M. Sanchez-Guijo, E. Villaron, V. Barbado, S. Tabera, M. ez-Campelo, J. Blanco, J. F. San Miguel, and M. C. Del Canizo, "Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification," Exp. Hematol., 2008, 36(8): 1014-1021.
59. M. Dominici, Blanc K. Le, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, Dj Prockop, and E. Horwitz, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," Cytotherapy., 2006, 8: 315-317.
60. L. F. Gibson, J. Fortney, K. S. Landreth, D. Piktel, S. G. Ericson, and J. P. Lynch, "Disruption of bone marrow stromal cell function by etoposide," Biol. Blood Marrow Transplant., 1997, 3: 122-132.
61. J. M. Hernandez, M. B. Gonzalez, I. Granada, N. Gutierrez, C. Chillon, F. Ramos, J. M. Ribera, M. Gonzalez, E. Feliu, and Miguel J. San, "Detection of inv(16) and t(16;16) by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia M4Eo," Haematologica, 2000, 85: 481-485.
62. F. Baron, C. Lechanteur, E. Willems, F. Bruck, E. Baudoux, L. Seidel, J. F. Vanbellinghen, K. Hafraoui, M. Lejeune, A. Gothot, G. Fillet, and Y. Beguin, "Co-transplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following non-myeloablative conditioning," Biol. Blood Marrow Transplant., 2010, 16(6): 838-847.
63. S. D. Hiwase, P. G. Dyson, L. B. To, and I. D. Lewis, "Cotransplantation of placental mesenchymal stromal cells enhances single and double cord blood engraftment in nonobese diabetic/severe combined immune deficient mice," Stem Cells, 2009, 27(9): 2293-2300.
64. A. Spyridonidis, T. Kuttler, R. Wasch, E. Samek, M. Waterhouse, D. Behringer, H. Bertz, and J. Finke, "Reduced intensity conditioning compared to standard conditioning preserves the in vitro growth capacity of bone marrow stroma, which remains of host origin," Stem Cells Dev., 2005, 14: 213-222.
65. V. Morad, M. Pevsner-Fischer, S. Barnees, A. Samokovlisky, L. Rouso-Noori, R. Rosenfeld, and D. Zipori, "The myelopoietic supportive capacity of mesenchymal stromal cells is uncoupled from multipotency and is influenced

- by lineage determination and interference with glycosylation," Stem Cells, 2008, 26(9): 2275-2286.
66. F. Corazza, C. Hermans, A. Ferster, P. Fondu, A. Demulder, and E. Sariban, "Bone marrow stroma damage induced by chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children," Pediatr. Res., 2004, 55: 152-158.
 67. J. Grassinger, D. N. Haylock, M. J. Storan, G. O. Haines, B. Williams, G. A. Whitty, A. R. Vinson, C. L. Be, S. Li, E. S. Sorensen, P. P. Tam, D. T. Denhardt, D. Sheppard, P. F. Choong, and S. K. Nilsson, "Thrombin-cleaved osteopontin regulates hemopoietic stem and progenitor cell functions through interactions with alpha9beta1 and alpha4beta1 integrins," Blood, 2009, 114(1): 49-59.
 68. M. P. Rettig, P. Ramirez, B. Nervi, and J. F. DiPersio, "CXCR4 and mobilization of hematopoietic precursors," Methods Enzymol., 2009, 460: 57-90.
 69. G. C. Bosma, R. P. Custer, and M. J. Bosma, "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse," Nature, 1983, 301: 527-530.
 70. Duyne R. Van, C. Pedati, I. Guendel, L. Carpio, K. Kehn-Hall, M. Saifuddin, and F. Kashanchi, "The utilization of humanized mouse models for the study of human retroviral infections," Retrovirology., 2009, 6: 76.
 71. A. M. Katsha, S. Ohkouchi, H. Xin, M. Kanehira, R. Sun, T. Nukiwa, and Y. Saijo, "Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model," Mol Ther., 2010.
 72. A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," Nat. Rev. Immunol., 2008, 8: 726-736.
 73. P. A. Ramirez, J. E. Wagner, and C. G. Brunstein, "Going straight to the point: intra-BM injection of hematopoietic progenitors," Bone Marrow Transplant., 2010, 45: 1127-1133.
 74. S. Ikehara, "A novel method of bone marrow transplantation (BMT) for intractable autoimmune diseases," J Autoimmun., 2008, 30: 108-115.
 75. C. Paul, A. F. Samdani, R. R. Betz, I. Fischer, and B. Neuhuber, "Grafting of human bone marrow stromal cells into spinal cord injury: a comparison of delivery methods," Spine (Phila Pa 1976.), 2009, 34: 328-334.
 76. T. Freyman, G. Polin, H. Osman, J. Crary, M. Lu, L. Cheng, M. Palasis, and R. L. Wilensky, "A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction," Eur. Heart J., 2006, 27: 1114-1122.
 77. L. M. Ball, M. E. Bernardo, H. Roelofs, A. Lankester, A. Cometa, R. M. Egeler, F. Locatelli, and W. E. Fibbe, "Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation," Blood, 2007, 110: 2764-2767.

Bibliografia