

**TESIS DOCTORAL**  
**ELECTRÓNICA**

**Antonio J. Rueda Salmerón**

**Summary.** The ability of *ex-vivo* expanded peripheral blood stem cells (PBSC) to engraft non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice has not been evaluated to date. We investigated the maintenance of primitive SCID-repopulating cells (SRC) and long-term culture-initiating cells (LTCIC) in PBSC expanded with early-acting cytokines, thrombopoietin (TPO), stem cell factor (SCF) and FLT3-ligand (FL) with or without interleukin 3 (IL-3) and IL-6 in short-term (6d) stroma-free serum-free cultures. TPO+SCF+FL and TPO+SCF+FL+IL-3+IL-6 produced  $5.9 \pm 1.97$  and  $18.25 \pm 4.49$  (mean  $\pm$  SEM)-fold increase of CD34<sup>+</sup> cells respectively. We tracked cellular division with PKH26 and sorted post-mitotic CD34<sup>+</sup> PKH26<sup>low</sup> cells to assess their primitive functional properties. After culture with TPO+SCF+FL, LTCICs among post-mitotic cells increased  $12.08 \pm 3.4$  times, and  $4.3 \pm 1.6$  times when IL-3+IL-6 were added. CD34<sup>+</sup> PKH26<sup>low</sup> cells cultured with TPO+SCF+FL provided human multilineage (CD34, CD33 and CD19) engraftment in NOD/SCID mice, whereas no human cells were detected in mice injected with cells cultured with TPO+SCF+FL+IL-3+IL-6. Percentages of CD34<sup>+</sup> / CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup> / CD33<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup> / DR<sup>-</sup> and cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase were similar among cells cultured with both cytokine combinations, indicating that the deleterious impact of IL-3+IL-6 on the ability to engraft is not translated into phenotypic or cycling features. In conclusion, TPO+SCF+FL-expanded PBSC maintain multilineage engraftment ability in NOD/SCID mice, which is abrogated by the addition of IL-3+IL-6.

**Keywords:** cytokine-mediated expansion, PBSC, NOD/SCID mice, early-acting growth factors, serum-free culture.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi especial agradecimiento a la Dra. Concha Herrera Arroyo verdadera artífice en el planteamiento y desarrollo de esta tesis doctoral. Su constancia, rigor y estudio permanente de la biología del trasplante de médula ósea y de la hematopoyesis, la han convertido en una verdadera autoridad en este difícil campo de la ciencia. Sin su sabia dirección esta tesis no habría sido posible

Al Dr. Antonio Torres Gómez con cariño fraternal, que con su saber hacer como Jefe de Servicio de Hematología ha creado el substrato necesario para que se puedan realizar toda clase de investigaciones en el mundo de su especialidad, y ha hecho posible esta tesis en cuya dirección ha participado.

Al Dr. Joaquín Sánchez García por su total cooperación y su extraordinaria competencia en las técnicas de separación e identificación celular, cuyo concurso ha sido imprescindible para la realización de este trabajo.

A mi hermana Antonia Maria por su constante apoyo y ser la valedora de esta tesis.

A Dña. Mercedes García Ojeda que por su trabajo me facilitó y allanó todos los problemas técnicos, animándome a concluir este trabajo

A D. Antonio Quesada Ruiz por su inestimable colaboración en la informatización y ejecución grafica y literaria de este estudio.

## **DEDICATORIA**

A la memoria de Inmaculada mi querida esposa.....

y a mis hijos Miguel, Antonio e Inmaculada

# **I.- INTRODUCCIÓN.**

## **I.- INTRODUCCIÓN.**

Inicialmente la transfusión de componentes celulares deficitarios de la sangre periférica se limitó a células finales (hematíes maduros, plaquetas y granulocitos) con resultados clínicos espectaculares en el caso de los hematíes y de las plaquetas en el tratamiento de las anemias y diátesis hemorrágicas trombopénicas respectivamente. Más discutible ha sido el beneficio de las transfusiones de granulocitos, aunque su periodo de evaluación clínica, correspondió con imposibilidad tecnológica de obtener grandes cantidades por aféresis, al no estar disponibles métodos eficaces de movilización (factores de crecimiento hematopoyético). También la infusión de linfocitos T de larga vida es actualmente un modo terapéutico de inmunoterapia pasiva en el tratamiento de algunas enfermedades hematológicas en su recaída postrasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (ej. Leucemia mieloide crónica).

Así como estos procedimientos de terapia celular perseguían un fin paliativo de un determinado déficit de células maduras de la sangre periférica (SP), pero sin solución definitiva del trastorno, el inicio de los procedimientos de trasplante de medula ósea, y más actualmente de progenitores hemopoyéticos también procedentes de la sangre periférica (previa movilización) y del cordón umbilical persigue una curación definitiva del déficit mediante la instauración de una nueva hematopoyesis propiciada por la infusión de progenitores multipotentes. De esta forma el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) constituye actualmente una terapia de eficacia probada para una variedad de enfermedades tanto malignas como hereditarias, e

igualmente proporciona un sólido soporte hematopoyético para pacientes sometidos a altas dosis de radio-quimioterapia.

Sin embargo, la aplicación del TPH, presenta una serie de limitaciones: 1) La adquisición de un número suficiente de stem cells (SC) requiere recolecciones extensas de médula ósea o bien procedimiento de aféresis tras movilización; 2) Incluso bajo estas circunstancias el número de células realmente útiles es limitado; 3) La cinética de regeneración de elementos maduros de la sangre tras la infusión, hace que no se obtengan beneficios terapéuticos directos durante un periodo mínimo de 2 a 3 semanas.

Durante los diez últimos años, se ha intentado superar estas limitaciones mediante intentos de incrementar tanto el número como la ratio proliferativa de los progenitores hemopoyéticos primitivos a través de cultivos “ex vivo” previos a la infusión. Estas técnicas que se engloban conceptualmente bajo el término de “expansión ex vivo” han sido desarrolladas hasta el punto de que actualmente los primeros ensayos clínicos ya están en fase de evaluación. Si estos ensayos clínicos llegan a mostrar resultados prometedores, la terapia celular en hematología entrará en una nueva era de oportunidades para el beneficio del paciente.

### **I.-1.Cultivos de Médula Ósea.**

Tres décadas atrás Bradley y Metcalf<sup>1</sup>, introdujeron un nuevo método de cultivo semisólido “colony forming assay”, que poseía nuevas y fascinantes características. 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. Estas importantes herramientas permitieron a los investigadores inferir características de la biología de la SC, que eran de otro modo

esencialmente irreconocibles. Sin embargo, desde estos primeros experimentos se pudo reconocer que el hecho de aspirar y explantar la medula ósea podía alterar dramáticamente su dinámica, de tal forma que la hematopoyesis “in vitro” observada en un ensayo de colonias era exclusivamente temporal, en la que solo se podía observar proliferación durante 2 a 4 semanas. Esta limitación demostró que, o bien las SC 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 era mantenida.

Los intentos de mimetizar de una forma más exacta la biología de la SC “in vivo” progresaron con el desarrollo de un sistema de cultivo líquido por T.M. Dexter<sup>2</sup> al final de los años 70. En estos cultivos “Dexter” la proliferación de células hematopoyéticas depende de la presencia de una capa (“layer”) adherente que representa una reconstitución bidimensional del componente estromal o mesenquimal-intersticial de la medula ósea “in vivo”, en el cuál las células existen en un esquema organizado tridimensional en íntimo contacto con las células hematopoyéticas en desarrollo.

Las adaptaciones de los cultivos Dexter a la medula ósea humana demostraron de una manera más clara la cinética de producción de progenitores que ya había sido observada en los ensayos de colonias, pero aun así mostraron similares limitaciones que sugerían que las SC realmente pluripotentes no sobrevivían ni proliferaban en estos cultivos. Mientras que los cultivos de medula ósea murina se mantenían durante más de un año, los cultivos Dexter humanos declinaban de forma progresiva, manteniéndose exclusivamente de 6 a 12 semanas<sup>3</sup>. Más recientemente, técnicas de dilución límite desarrolladas por Sutherland y cols.<sup>4</sup> han confirmado que el número de células



primitivas capaces de sostener la producción de progenitores comienza a declinar en una semana en los cultivos Dexter. De manera similar Lansdorp y cols.<sup>5</sup> usando análisis del fenotipo celular de células de medula ósea en cultivo líquido, han encontrado que las células primitivas CD34+ CD38-, son incapaces de autorrenovación, al menos cuando se cultivan aisladas de las células estromales.

De estos experimentos pueden extraerse dos conclusiones muy diferentes: en primer lugar se podía concluir que las células pluripotentes, tienen escaso o nulo potencial de amplificación. En este escenario la hematopoyesis “in vivo” sería mantenida por una sucesión de SC que simplemente se diferenciarían y se extinguirían. Sin embargo, esta conclusión necesitaría reconciliarse con las observaciones de Lemishka y cols.<sup>6</sup> y Abkowitz y cols.<sup>7</sup> que encontraron que la hematopoyesis en ratones y gatos derivaba de un conjunto de SC que se mantenía estable durante más de 6 meses hasta varios años. Es más, mientras que la hematopoyesis derivada de células progenitoras más maduras se agotaba, los conjuntos de SC que mantenían la hematopoyesis estable, no se extinguían. Estos datos parecen más consistentes con un modelo en el cual el número de auténticas SC de larga vida es extremadamente bajo y que estas células inicialmente se dividen muy lentamente. De este modo, la hematopoyesis multilineal, es sostenida de forma temporal, aunque por muchos meses, por la diferenciación terminal de células que han abandonado el conjunto de SC más primitivas. La conclusión alternativa que puede obtenerse de las limitaciones de los cultivos líquidos de medula ósea es que los esfuerzos técnicos realizados para cultivar células hematopoyéticas “ex vivo” han sido incapaces de reproducir aquellos elementos de la biología de la SC que ocurren “in vivo” y que solo podrían ser emulados en circunstancias ideales. Dos tipos de aproximaciones experimentales se han llevado a cabo para demostrar esta hipótesis: 1) cultivos líquidos de células primitivas purificadas

con altas dosis de citocinas recombinantes y 2) cultivos de medula ósea completa en sistemas de perfusión.

### **I.-1.2.Aproximaciones actuales a la expansión “ex vivo”.**

I.-1.2.1.Incubación de células CD34+ purificadas con combinaciones de altas dosis de citocinas.

La incubación de células seleccionadas CD34+ con diversas combinaciones de citocinas, ha sido la técnica más estudiada en expansión “ex vivo”. Haylock y cols.<sup>8</sup> demostraron en primer lugar que células CD34+ de sangre periférica movilizadas altamente purificadas mediante separación celular por citofluorometría separativa (“cell sorting”) podían ser inducidas a proliferar en cultivos en presencia de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-3, IL-6, factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas (GM-CSF) y Stem cell factor (SCF). Bajo estas condiciones el conjunto de colonias granulocítico-macrofágicas (CFU-GM) se expandía entre 20 y 60 veces en 14 días, e igualmente se generaban gran cantidad de precursores más maduros. Estos resultados han sido subsecuentemente reproducidos por varios grupos, incluyendo a Srour y cols.<sup>9</sup>, Coutinho y cols.<sup>10</sup> y Brugger y cols.<sup>11</sup>. Aunque existen ciertas diferencias entre los protocolos de expansión llevados a cabo por cada grupo, todos ellos coinciden en el uso de células CD34+ altamente purificadas, condiciones de cultivo y múltiples citocinas. Sin cada una de estas características, la proliferación se reduce de manera considerable.

Estos resultados sugieren que la presencia de células maduras CD34 - o de sus metabolitos secretados puede ejercer un fuerte efecto supresivo sobre la proliferación hematopoyética. Este efecto solo puede ser obviado mediante la eliminación de las

células CD34 - y el cultivo de CD34+ a baja densidad, al menos en cultivos estáticos en los cuáles todos los bioproductos celulares permanecen en el cultivo. La adición de altas dosis de citocinas permite la proliferación y diferenciación de la mayoría de progenitores tempranos presentes en la subpoblación CD34+, amplificando por tanto de manera potente el conjunto de progenitores y precursores.

La mayoría de los progenitores amplificados en estos cultivos parece ocurrir por medio de diferenciación terminal de progenitores tempranos y de SC. En este tipo de cultivos no solo declina el número de células CD34+ en sí mismo, si no que también el número de células iniciadoras de cultivos a largo término (LTC-IC) raramente se incrementa y, de forma habitual, disminuye <sup>9-12</sup>. Así, este tipo de cultivo no muestra evidencia de auténtica expansión de SC, sino más bien una potente diferenciación de un compartimento celular de progenitores relativamente tempranos. Esta pérdida de SC parece ser probablemente el resultado de la eliminación de células estromales aparejada a los procedimientos de selección de células CD34+.

#### *I.-1.2.2. Cultivos en perfusión continua.*

El sistema alternativo de expansión “ex vivo” ha sido el cultivo en perfusión continua de progenitores hemopoyéticos no seleccionados. El sistema de perfusión, utilizado generalmente en conjunción con factores de crecimiento, se ha utilizado para estimular la función de elementos celulares estromales tanto para soportar la renovación de SC como para proporcionar factores de crecimiento hemopoyético (FCH). Los primeros estudio de Caldwell y cols. <sup>13, 14</sup> y Guba y cols. <sup>15</sup> demostraron que un rápido cambio de medio estimulaba la producción de GM-CSF e IL-6 a partir de fibroblastos estromales de médula ósea; posteriormente se han obtenido resultados similares para SCF. Schwartz y cols. <sup>16, 17</sup> demostraron subsecuentemente que esquemas similares de

intercambio rápido del medio en médula ósea completa proporcionaban una producción estable y prolongada de células progenitoras en cultivo, indicativo de autorrenovación de SC. Este efecto se conseguía mediante una combinación de estimulación de los elementos estromales y de eliminación de los productos metabólicos producidos por células mieloides maduras. Aprovechando las ventajas de la estimulación de células estromales y de la adición de citocinas, los sistemas de cultivo que incluyen intercambio rápido del medio se han combinado recientemente con la adición de citocinas exógenas. Soller y cols.<sup>18</sup> han demostrado que la incubación de células mononucleares de médula ósea en condiciones de perfusión continua en presencia de bajas dosis de SCF, IL-3, GM-CSF y eritropoyetina (EPO) lograban una expansión de 10 a 20 veces en el número total de células mononucleadas y CFU-GM, junto con una expansión de las LTC-IC entre 4 y 8 veces. Subsecuentes estudios de Soller y cols.<sup>19</sup>, han demostrado que el mantenimiento y la expansión de las LTC-IC en estos sistemas se debe tanto a la presencia de la capa estromal como a la de células accesorias no estromales CD34.

Sandstrom y cols.<sup>20</sup> obtuvieron resultados muy similares, demostrando que la perfusión influencia fuertemente la expansión de progenitores y el mantenimiento de LTC-IC, mientras que la selección de células CD34+ no tiene beneficios per se. Recientemente Zandstra y cols.<sup>21</sup> confirmaron el efecto de la perfusión y la adición de citocinas en la estimulación simultánea de la expansión de células progenitoras y LTC-IC, obteniendo incrementos notables en el número de LTC-IC en biorreactores. Estos resultados en su conjunto, proporcionan evidencia de que la expansión de los progenitores de manera concomitante con el mantenimiento o incluso expansión de LTC-IC puede ser posible a partir de médula ósea no manipulada en cultivos en una sola etapa.

A pesar de todos estos avances, hoy sigue sin conocerse si es posible la amplificación de la SC humana más primitiva. Sin embargo, estudios de Muench y cols.<sup>22</sup> con médula ósea murina demostraron que el cultivo ex vivo en presencia de SCF e IL-1 reducía el número de células trasplantadas requeridas para lograr radioprotección, mientras que producían hematopoyesis originada del donante sostenida durante más de un año, permitiendo subsecuentes trasplantes secundarios. Así estos únicos experimentos in vivo realizados con médula murina, sugieren que el cultivo ex vivo puede realmente soportar la supervivencia y expansión del conjunto de SC con capacidad de repoblación a largo plazo.

### **I.-2.Fuentes de Células Hematopoyéticas para Expansión: Médula Ósea, Sangre Periférica y Sangre de Cordón Umbilical (SCU).**

La médula ósea, la sangre periférica y la SCU, han sido empleadas como población de partida en modelos de expansión ex vivo, y si bien todas ellas tienen sus ventajas potenciales, también tienen ciertos problemas para su uso clínico. Las células mononucleadas de médula ósea han sido estudiadas de manera más exhaustiva por Soller y cols.<sup>18, 19</sup> en sistemas de cultivo en perfusión continua. La principal ventaja de la médula ósea es que contiene tanto las SC pluripotentes como todos los elementos celulares accesorios precisos para su mantenimiento, y de hecho, estos estudios han sido realizados con médula ósea no manipulada con la intención de no alterar su composición celular. Aunque células CD34+ de médula ósea altamente purificadas pueden también ser inducidas a proliferar en este tipo de cultivos, la expansión de progenitores y LTC-IC es comparablemente menor en ausencia de células accesorias.

La sangre periférica movilizada ha sido también estudiada por varios grupos obteniéndose altos niveles de expansión celular y de progenitores<sup>8-12</sup>. Los principales atractivos de este modelo son la fácil disponibilidad de progenitores en sangre periférica movilizada y el potencial de estos progenitores para una rápida reconstitución de la hematopoyesis. El principal problema de la sangre periférica movilizada es la durabilidad a largo plazo del injerto, dado que la permanencia de las SC auténticamente primitivas en estos cultivos no ha podido ser comprobada de forma definitiva.

Las células de SCU constituyen un modelo extremadamente interesante de aplicación de la expansión celular *ex vivo* a la hematología clínica. Hace más de una década, Broxmeyer y cols.<sup>24</sup> observaron que la frecuencia de progenitores circulantes en la sangre de cordón umbilical era muy superior a la de la sangre periférica adulta: entre 1 y 5 en 1000 células mononucleadas de SCU frente a entre 1 y 5 en 20.000 de sangre periférica adulta. Además, las colonias derivadas de esos progenitores eran de mayor tamaño incluyendo colonias macroscópicas<sup>25, 26</sup>. Estos estudios sugerían que la SCU contenía un conjunto de progenitores relacionados con el conjunto primitivo localizado en el hígado fetal.

Las observaciones de que las colonias obtenidas a partir de SCU eran generalmente de gran tamaño y multifocales, unido a las observaciones de Fleishman y Mintz<sup>27</sup> de que las SC fetales tenían una ventaja en la repoblación competitiva sobre las SC adultas sugirieron que las SC de SCU podrían tener una mayor capacidad proliferativa y quizás una mayor capacidad de autorrenovación. Esta hipótesis ha sido recientemente demostrada por Broxmeyer y Carow con el hallazgo de que las colonias mixtas (CFU-GEMM) a partir de sangre de cordón umbilical podían ser replantadas 4 o 5 veces manteniéndose la hematopoyesis multilineal a diferencia de las CFU-GEMM adultas que poseen escasa o ninguna capacidad de ser replantadas<sup>28, 29</sup>. Por otra parte,

Landsdorp y cols demostraron que las células CD34+ de SCU eran capaces de generar varios miles más de células maduras en cultivo sin reducir el número de CD34+, en contraste con la médula ósea adulta en la cual las células CD34+ declinan rápidamente en cultivo indicando una pérdida de células primitivas con capacidad de autorrenovación <sup>5, 30</sup>. Por último los estudios de Moore <sup>31</sup> indicaron que el cultivo de células CD34+ de SCU a baja densidad celular producía un incremento de más de 20 veces en el número de células primitivas, en contraste con cultivos similares de médula ósea adulta en la cuál el incremento raramente excedía de 3 veces. Estos resultados tomados en conjunto indican que los progenitores de SCU poseen una capacidad claramente incrementada de soportar tanto la producción de células más maduras como la autorrenovación de las más primitivas.

Basados en estos estudios preclínicos la SCU fue utilizada por primera vez como fuente de células trasplantables en 1990 por Gluckman y cols.<sup>32</sup> en un niño con anemia de Fanconi. De forma global los resultados del SCU hasta la fecha sugieren que : 1) Las SC de SCU pueden injertar tras su infusión, si bien la cinética del prendimiento es algo más lenta que en el caso de médula o sangre periférica movilizada; 2) La enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) del receptor no solo no es más severa si no que parece ser más leve que con el empleo de células de donante de médula ósea <sup>33, 35</sup>. Aunque algunos niños con pesos de hasta 70 Kg han recibido un trasplante de SCU con éxito, un cierto número de receptores con pesos superiores a 40 Kgs no han alcanzado prendimiento tras infusión de SCU a partir de recolecciones de cordón standard. Por este motivo, el éxito en lograr la expansión “ex vivo” de la SCU podría tener un tremendo impacto en la aplicabilidad de este tipo de trasplantes en diversas situaciones clínicas que impliquen el tratamiento de niños mayores o adultos. Los estudios actualmente en curso de varios laboratorios, sugieren que tanto los progenitores como

las LTC-IC de SCU pueden ser realmente expandidos aparentemente más que la medula ósea o la sangre periférica movilizada <sup>36-39</sup>.

### **I.-3. Factores de Crecimiento Hematopoyético en los Cultivos de Expansión “Ex Vivo”.**

Los cultivos de expansión “ex vivo” se han llevado a cabo con múltiples combinaciones de citocinas, no existiendo hasta la actualidad un consenso general sobre cual es la combinación óptima para uso clínico. En general, aquellas citocinas que bien de forma directa o sinérgica estimulan la proliferación y diferenciación de progenitores en células precursoras reconocibles son también efectivas en la estimulación de la expansión del compartimento celular de progenitores en cultivo líquido. De este modo, Haylock y cols. <sup>8</sup> encontraron que la combinación de IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF y SCF era superior a cualquiera de las combinaciones en las que faltaba alguna de estas seis citocinas. Estos hallazgos han sido reproducidos por muchos grupos, con la notable excepción de Brugger y cols. <sup>11</sup> que observaron que la inclusión de G-CSF y/o GM-CSF en los cultivos producía un elevado número de células totales, pero un número bajo de células progenitoras clonogénicas. En el caso de cultivos de perfusión con medula ósea completa, la presencia de IL-6 e IL-1 parece estar proporcionada directamente por células estromales y accesorias, de tal manera que la adición de estas citocinas exógenas no aporta beneficios adicionales <sup>15, 40</sup>. Las cantidades de SCF y FIT3-ligando exógenas añadidas incrementan de forma substancial el rendimiento de progenitores recuperados de cultivos de perfusión de médula total, dado que ambas citocinas son escasamente producidas por células accesorias. Por el contrario, la inclusión de proteína-1 $\alpha$ -inhibidora de los macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ), factor de necrosis



tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y factor de transformación de crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), resultan en la mayoría de cultivos de expansión en un descenso en el rendimiento de células precursoras <sup>41</sup>.

La supervivencia y proliferación de las células anteprogenitoras más primitivas puede ser también influida por el tipo de citocinas que suplementan los cultivos de expansión, lo cual es particularmente cierto en el caso de los cultivos de células CD34+ purificadas. Henschler y cols.<sup>12</sup> han comparado directamente varias combinaciones de citocinas usando un ensayo de células formadoras de áreas “cobblestone” o de pavimento (CAFC), que ellos mismos validaron y encontraron en estrecha correlación con el clásico ensayo LTC-IC. Estos autores encontraron que la inclusión de SCF solamente, IL-3, o ambos conducía a un descenso sustancial en las CAFC a partir de los 12 días de cultivo; combinaciones de SCF e IL-3 más G-CSF, IL-1 o IL-6 contrarrestan gran parte de esta pérdida; y el cultivo simultáneo en SCF, IL-3, IL-1, IL-6 y EPO conduce al mantenimiento de las LTC-IC durante este periodo de tiempo <sup>12</sup>. En los cultivos basados en métodos de perfusión en los que los elementos estromales producen SCF e IL-6 endógenas, e indudablemente otras muchas citocinas, las necesidades de adición de múltiples citocinas endógenas para el mantenimiento de LTC-IC no son tan marcadas.

### **I-3.1.Experiencias clínicas preliminares con células hematopoyéticas expandidas “ex vivo”.**

El empleo en clínica de las células hematopoyéticas cultivadas ex vivo ha sido estudiado desde hace varios años. Tras prometedoras experiencias preliminares en ratones <sup>42</sup>, Dexter y cols.<sup>43</sup> infundieron por primera vez médula ósea cultivada ex vivo a

dos pacientes en 1983, y este mismo grupo ha extendido esta aproximación terapéutica durante años, particularmente en el tratamiento de pacientes con Leucemia Aguda Mieloblástica (LAM). Por su parte, Barnett y cols.<sup>44</sup> han practicado numerosos trasplantes de médula cultivada ex vivo en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Aunque estos primeros trasplantes no amplificaban de forma intencionada las células cultivadas, sí fueron capaces de demostrar que este tipo de procesamiento puede ser realizado de manera segura, y que la reinfusión de células cultivadas carece de toxicidad, si bien la recuperación de la hematopoyesis en estos pacientes era a menudo bastante retardada.

Silver y cols.<sup>45</sup> fueron los primeros en reinfundir médula ósea obtenida tras 14 días en cultivo en perfusión suplementado con IL-3, GM-CSF, EPO y SCF como adyuvante de autotrasplante en 5 pacientes afectados de Enfermedad de Hodgkin y Linfomas no Hodgkin. Estos pacientes no presentaron ningún tipo de toxicidad asociada a la infusión, y todos ellos alcanzaron prendimiento mieloide entre los días 8 y 15, y plaquetario entre los días 12 y 21.

Más recientemente, Brender y cols.<sup>46</sup> estudiaron 5 pacientes que recibieron células CD34+ purificadas de sangre periférica movilizada cultivadas con PIXY 321 durante 12 días e infundidas al día siguiente de la infusión estándar de células no cultivadas. Estos pacientes no presentaron toxicidad alguna y la reconstitución de la hematopoyesis fue comparable a la de autotrasplantes de sangre periférica convencionales<sup>46</sup>.

Brugger y cols.<sup>47</sup> han reinfundido células de sangre periférica movilizada cultivadas ex vivo como única fuente de soporte hematopoyético a pacientes sometidos a quimioterapia a altas dosis, aunque no realmente mieloablativa, con resultados alentadores. Quince millones de células CD34+ de sangre periférica fueron cultivadas

en presencia de SCF, IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6 y EPO durante 12 días, y las células resultantes de este cultivo fueron reinfundidas bien como suplemento de infusiones estándar de sangre periférica movilizada (4 pacientes), o bien como único soporte hematopoyético (6 pacientes). De los seis pacientes que recibieron exclusivamente células cultivadas, 5 supervivientes prendieron rápidamente, con medias de días necesarios para alcanzar 500 y 1000 granulocitos tan sólo superiores en dos días a las correspondientes a los pacientes que recibieron simultáneamente células cultivadas y no cultivadas, mientras que el prendimiento plaquetario fue idéntico en ambos grupos de pacientes. De modo interesante, estos autores comprobaron que existía una fuerte correlación entre el número de células expandidas reinfundidas a los pacientes y la velocidad de la recuperación plaquetaria, correlación que ya había sido observada en el estudio original de Silver y cols.<sup>45</sup>.

Considerados de manera global, aunque no existe suficiente experiencia como para conocer la durabilidad de la recuperación hematopoyética de los pacientes trasplantados con células cultivadas, y aunque los regímenes de quimioterapia empleados en estos pacientes no han sido realmente mieloablativos, los resultados preliminares de estos trabajos sostienen la noción de que un pequeño número de progenitores hematopoyéticos cultivados ex vivo bajo ciertas condiciones puede dar lugar a una reconstitución hematológica completa.

### **I.-3.2. Usos clínicos potenciales de las células hematopoyéticas expandidas.**

Considerando de una forma global las posibilidades de expansión y diferenciación ex vivo de las células hematopoyéticas, es posible suponer una amplia gama de aplicaciones clínicas. Desde el punto de vista más básico, las células mieloides

expandidas ex vivo podrían ser utilizadas en pacientes con compromiso hematológico en diversas situaciones frecuentes en la práctica clínica hematooncológica, que incluyen la quimioterapia a altas dosis y el trasplante autólogo y alogénico de médula ósea. En el caso del trasplante tanto autólogo como alogénico, la expansión ex vivo puede ser utilizada para reducir la morbilidad de la pancitopenia postrasplante así como para evitar recolecciones extensas o largos procesos de leucoféresis. En el caso particular del trasplante autólogo, el cultivo y expansión ex vivo del injerto podría ser utilizado además teóricamente para el purgado de células tumorales residuales.

La expansión de progenitores mieloides tiene un extraordinario interés en el caso del trasplante de SCU, por varias razones. En primer lugar, está claro que las células hematopoyéticas fetales y las presentes en la SCU tienen una capacidad proliferativa incrementada, y podría ocurrir que la SC de cordón tuviese también una capacidad incrementada de auténtica autorrenovación. En segundo lugar, existe la posibilidad aunque no la evidencia de que las células linfoides derivadas de la SC de SCU pueden causar menos enfermedad injerto contra huésped postrasplante alogénico que las células linfoides adultas. En tercer lugar, la SCU constituye una fuente de progenitores hematopoyéticos que es habitualmente un material de desecho por lo que la creación de bancos de SCU se ve facilitada. La expansión ex vivo de la SCU podría llegar a ser la clave para la generalización de este tipo de trasplantes, actualmente reservado casi totalmente a niños pequeños, al poder proporcionar suficiente número de progenitores para receptores adultos o niños mayores.

La posibilidad de controlar la expansión ex vivo más allá de la línea mieloide podría tener aplicaciones más amplias y más sofisticadas. La expansión ex vivo de la línea linfoide a partir de los prolinfocitos podría permitir la “educación” ex vivo de los linfocitos T del donante para conseguir una actividad antitumoral específica, lo que

proporcionaría un importantísimo avance en la inmunoterapia adoptiva. La expansión simultánea de células mieloides y linfoides conseguiría aportar tanto soporte hematopoyético como actividad antitumoral específica.

Por último la capacidad de expandir las auténticas SC pluripotentes con capacidad de autorrenovación constituiría el punto de partida para la generalización de la terapia génica, ya que la división de las SC ex vivo constituye la limitación más importante para su transducción mediada por vectores retrovirales o adenovirales. La posibilidad de regular la división de las SC in vitro permitiría incrementar su nivel de transducción permitiendo así dar paso a diversas aplicaciones clínicas de las SC modificadas genéticamente.

En la actualidad a pesar de los importantes avances en el terreno de la expansión ex vivo siguen quedando varias cuestiones de vital importancia por resolver, antes del empleo clínico generalizado de células expandidas, que pueden resumirse de la siguiente forma:

- 1) Determinación del tipo de pacientes que podrían beneficiarse de la infusión de un injerto expandido y en qué situaciones: autotrasplante de médula ósea, alotrasplante, trasplantes de sangre periférica o rescate de pancitopenias post quimioterapia no mieloablativa.
- 2) Determinación de la necesidad de expandir sólo progenitores codificados o LTC-IC o auténticas stem cells en cada una de las posibles situaciones clínicas.
- 3) Determinación del contenido de células con auténtica capacidad de autorrenovación y repoblación hematopoyética permanente en los injertos expandidos.
- 4) Determinación de la capacidad de los injertos expandidos de prender más rápidamente que los no modificados para así reducir o anular la neutropenia postrasplante.

5) Determinación, en el caso particular de la SCU que de forma conocida prenda de manera más lenta, si la expansión ex vivo pudiese solucionar este problema o por el contrario lo agrava.

6) Determinación de la fisiología in vivo postrasplante de las células T derivadas de injertos expandidos.

#### **I-4.Efectos In Vitro de las Citocinas Empleadas en Expansión.**

Son numerosas las combinaciones de citocinas que se han empleado en los diversos modelos de expansión, con resultados variables como se ha expuesto con anterioridad. A continuación resumimos de manera individualizada los efectos in vitro de las citocinas más comúnmente empleadas en expansión.

##### **I-4.1.Interleucina 3.**

La interleucina 3 (IL-3) posee el más amplio espectro de acción sobre células hematopoyéticas entre todas las citocinas conocidas, de tal manera que su rango de células diana incluye todos los progenitores de todas las líneas hematopoyéticas derivadas de la SC pluripotencial. Así, IL-3 puede estimular la generación y diferenciación de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, megacariocitos y células eritroides <sup>48</sup>, y en presencia de TNF- $\alpha$  estimula la generación de células dendríticas a partir de células CD34+ <sup>49</sup>. Además IL-3 actúa sobre células pluripotenciales más primitivas: estimula el crecimiento in vitro de colonias mixtas eritroides y mieloides, y estimula tanto in vitro como in vivo la división de células

(CFUs) capaces de formar colonias esplénicas en ratones irradiados <sup>50</sup>. IL-3 además promueve directa o indirectamente la supervivencia in vitro de células capaces de repoblar ratones con linfocitos T y B <sup>48</sup>.

In vitro, las células hematopoyéticas primitivas y los progenitores mantenidos en medio de cultivo exclusivamente sobreviven sólo pocas horas. Al igual que otros factores de crecimiento hematopoyéticos, IL-3 promueve la supervivencia celular in vitro a través de la inhibición de la apoptosis : diversas subpoblaciones celulares obtenidas a partir de médula ósea murina cultivada con IL-3 permanecen IL-3-dependientes no sólo para su proliferación sino también para su supervivencia, y cuando se deprivan de IL-3 en los cultivos se produce la apoptosis <sup>51</sup>. Experimentos que demuestran la rápida desaparición de células IL-3 dependientes inyectadas en animales normales que carecen de niveles detectables de IL-3 en su suero, son consistentes con este concepto <sup>52</sup>.

Como sucede habitualmente con otras citocinas, IL-3 muestra una fuerte actividad sinérgica con otros factores de crecimiento hematopoyéticos. En humanos, IL-3 actúa sinérgicamente con CSF-1 en la producción de macrófagos, con G-CSF en la producción de neutrófilos y con IL-11 en la producción de megacariocitos. Tanto en humanos como en ratones, IL-3 actúa en la estimulación de las SC más primitivas en sinergismo con diversas citocinas tales como CSF-1, SCF e IL-1 <sup>48</sup>.

#### **I.-4.2. Interleucina 6.**

La interleucina 6 (IL-6) e IL-3 inducen de manera sinérgica la proliferación in vitro de progenitores hematopoyéticos pluripotenciales murinos <sup>53</sup>. La combinación de estas dos citocinas debe su acción sinérgica a que IL-6 actúa sobre los progenitores más

inmaduros haciendo que abandonen  $G_0$  mientras que IL-3 soporta la proliferación continuada de los progenitores una vez que entran en ciclo celular activo <sup>54</sup>. Se ha podido comprobar que el cultivo de células de médula ósea durante 6 días en presencia de IL-3+IL-6 incrementa su capacidad de rescatar ratones irradiados produciendo un mayor número de colonias esplénicas que las células cultivadas en presencia de IL-3 exclusivamente <sup>55</sup>. El efecto sinérgico de IL-6 con IL-3 también se demuestra en la megacariocitopoyesis <sup>56</sup>. IL-6 produce per se un incremento en el tamaño y ploidía de los megacariocitos así como en su actividad acetilcolinesterasa, y estos efectos se producen por una acción directa, ya que la adición de un anticuerpo monoclonal anti-IL-6 a cultivos de médula ósea inhibe el desarrollo de los megacariocitos tanto en presencia como en ausencia de IL-3 <sup>57</sup>. Por último IL-6 también parece tener un papel en la maduración final de células de las estirpes granulocítica y monocítica como lo demuestra el hecho de que IL-6 inhibe el crecimiento de diversas líneas leucémicas mieloides murinas y humanas promoviendo su diferenciación a células granulocíticas y macrofágicas <sup>58</sup>. Del mismo modo se ha podido demostrar que mientras en ratones normales el tipo celular predominante en las CFU-GM son los macrófagos, en ratones deficientes en IL-6 las CFU-GM están constituidas por células inmaduras de tipo mieloblasto y monoblasto <sup>59</sup>, lo que sugiere un papel de la IL-6 en la maduración de la línea granulomonocítica no sólo in vitro sino también in vivo.

#### **I-4.3. Factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas (GM-CSF).**

El rango de actividades de GM-CSF detectadas in vitro es extraordinariamente amplio y comprende desde la regulación de la diferenciación y proliferación de progenitores hematopoyéticos hasta la regulación de la supervivencia y función de



células maduras tales como granulocitos, macrófagos y células dendríticas, lo que sugiere un papel prominente de GM-CSF tanto en la hematopoyesis como en la defensa antibacteriana y la respuesta inmune.

Uno de los primeros efectos de GM-CSF detectados *in vitro* fue la regulación de la diferenciación y proliferación de los progenitores granulocítico-macrofágicos *in vitro*. GM-CSF estimula la proliferación de una amplia gama de colonias mieloides en una forma dosis-dependiente en cultivos *in vitro* en medio semisólido: a bajas dosis se estimulan los progenitores de tipo granulocítico-macrofágico, mientras que a dosis superiores se originan colonias eritroides, multilineales y ocasionalmente megacariocíticas <sup>60</sup>.

GM-CSF incrementa la actividad antibacteriana de los neutrófilos estimulando la fagocitosis, el metabolismo oxidativo y la expresión de antígenos de superficie asociados con receptores de Fc (Fc $\gamma$ RI, CR-1 y CR-3) implicados en los mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos <sup>61</sup>. Además induce la producción *in vitro* de IL-1 y del antagonista del receptor de IL-1 por los neutrófilos <sup>62</sup>.

Sobre los monocitos y macrófagos GM-CSF ejerce diversas acciones: promueve la diferenciación de monocitos, incrementa el metabolismo de las células maduras y su función como células presentadoras de antígeno induciendo la expresión de CD1 y de MHC clase II <sup>63</sup>. Además induce la producción por los monocitos de TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, M-CSF y IL-1Ra así como la expresión de INF $\gamma$ R y moléculas de adhesión como CD11b y CD35 <sup>61</sup>.

Además de las acciones fundamentales sobre la línea granulocítico-macrofágica GM-CSF actúa estimulando otras estirpes celulares: es la principal citocina estimulante de la diferenciación *in vitro*, viabilidad y función de las células dendríticas <sup>64</sup>, potencia la proliferación de células T mediada por IL-2 <sup>65</sup>, induce la proliferación y activación

de los eosinófilos <sup>66</sup> e induce diversas funciones en las células endoteliales relacionadas con la angiogénesis y la inflamación tales como la migración, proliferación y expresión de moléculas de adhesión <sup>67</sup>.

#### **I.-4.4.Stem Cell Factor.**

La caracterización biológica inicial de Stem Cell Factor (SCF) incluía el estudio exhaustivo de sus habilidades como factor estimulante de colonias hematopoyéticas. Sin embargo, como agente único SCF tiene sólo una modesta actividad como factor estimulante de colonias. En cultivos semisólidos de médula ósea murina, SCF induce la formación de un número limitado de pequeñas colonias conteniendo principalmente neutrófilos, mientras que en cultivos líquidos a más largo plazo de estas mismas células induce sobre todo la formación de mastocitos <sup>68</sup>. Sobre células de médula ósea humana SCF tiene escasos efectos, pero es sin embargo un potente coestimulador que actúa sinérgicamente con otros factores de crecimiento como EPO, trombopoyetina, GM-CSF, G-CSG, IL-3, IL-7 y M-CSF <sup>69, 70</sup>. El efecto de SCF en estas combinaciones es el incremento del número y tamaño de las colonias generadas en cultivo, sin influenciar la diferenciación de línea de los progenitores.

No está aún totalmente claro cómo podrían emplearse en clínica los efectos sinérgicos de SCF con otras citoquinas. Los datos disponibles hasta el momento indican que la adición de SCF mejora los resultados de otras combinaciones de citoquinas para la expansión de progenitores con vistas a trasplante <sup>70</sup>. Una segunda área, posiblemente también ligada a la alteración del estatus proliferativo de las células hematopoyéticas, es la manipulación de la frecuencia de transducción en los modelos de transferencia génica mediada por vectores retrovirales <sup>71</sup>. A partir de datos preliminares parece que la

combinación de las técnicas de expansión con los métodos de transferencia génica pueden hacer posible una cierta “ingeniería” del injerto, que resulte en un injerto especialmente diseñado para cada situación, tanto si la indicación es la corrección de un defecto genético o el soporte de quimioterapia a altas dosis en pacientes con cáncer.

#### **I.-4.5.Flt3-Ligando.**

Antes de que Flt3-Ligando (FL) fuera clonado ya se había demostrado la expresión de Flt3 en las SC hematopoyéticas y en los progenitores, y se hipotetizaba que FL podría tener un papel en el desarrollo de la hematopoyesis <sup>72</sup>. Esta hipótesis fue posteriormente demostrada una vez que FL fue clonado y sus actividades biológicas fueron determinadas. FL como agente único estimula débilmente la proliferación y la formación de colonias in vitro a partir de progenitores hematopoyéticos, pero en adición con otras citocinas ejerce efectos sinérgicos.

Diversos estudios dirigidos a la caracterización de las actividades biológicas de FL usando estudios in vitro han demostrado que FL afecta al crecimiento tanto de progenitores primitivos multipotentes como de progenitores codificados de línea mieloide y linfoide. Si bien la actividad proliferativa de FL per se es escasa, es capaz de soportar la supervivencia de los progenitores y mantener su responsividad a otras citocinas que sí estimulan la proliferación <sup>73</sup>. A través de este mecanismo de acción FL actúa sinérgicamente con una amplia variedad de factores de crecimiento e interleucinas aumentando la expansión de unidades formadoras de colonias. Sin embargo, los progenitores más primitivos (LTC-IC) de médula ósea humana sí son inducidos a proliferar por FL como agente único <sup>73, 74</sup>, y se puede lograr una expansión in vitro de hasta 30 veces de este tipo de células con la combinación de FL+SCF+IL-3 <sup>74</sup>. El

concepto de que la acción de FL se ejerce sobre los progenitores más primitivos se ve apoyado por los datos obtenidos a partir de ratones deficientes en Flt3. Estos animales son viables y aparentemente sanos, pero tienen un defecto en las SC más primitivas medido en un ensayo de repoblación competitiva a largo plazo: cuando la médula ósea de estos ratones es transferida a receptores irradiados su potencial de reconstituir la hematopoyesis es muy inferior al correspondiente a médula ósea de ratones normales <sup>75</sup>.

FL comparte un cierto número de actividades biológicas con SCF, incluyendo su capacidad de actuar sinérgicamente con un amplio número de citocinas favoreciendo la proliferación de progenitores mientras su actividad como agentes únicos es muy débil. Sin embargo la ausencia de un efecto de FL sobre la eritropoyesis y la producción de mastocitos, sobre los que SCF tiene un potente efecto, indican que las funciones biológicas de ambas citocinas no son enteramente superponibles.

Los efectos de FL sobre progenitores de línea linfóide B y T también han sido estudiados. El cultivo de células CD34+ de médula ósea humana sobre un estroma de timocitos fetales irradiados da lugar al desarrollo de células TCR+ en presencia de IL-12, y la adición de FL a este tipo de cultivo aumenta la producción celular sin alterar el fenotipo de las células T obtenidas <sup>76</sup>. En la estirpe linfóide B, las células pre-pro-B expresan Flt3, y esta expresión va desapareciendo a medida que progresan hacia células pre-B <sup>77</sup>. Progenitores no codificados de hígado fetal de ratón se diferencian en células de estirpe B en respuesta a FL+IL-7+IL-11 mientras que FL+IL-7 estimula la expansión de las células pro-B <sup>78</sup>. En células humanas, FL actúa sinérgicamente con IL3+IL-7 promoviendo el crecimiento de células pro-B y su diferenciación a células pre-B. La hipótesis de que FL actúa sobre el desarrollo temprano de la estirpe B se ve demostrado in vivo en ratones Flt3 deficientes, los cuales presentan un número reducido de células

tanto pro-B como pre-B<sup>75</sup>. Conjuntamente estos resultados demuestran que FL tiene un papel importante en los eventos tempranos de la diferenciación linfoide B, y aunque menos bien definido, también de la estirpe T.

#### **I.-4.6.Trombopoyetina.**

La hipótesis de que los niveles de plaquetas circulantes y la megacariocitopoyesis eran controlados por un regulador humoral fue propuesta ya por Yamamoto<sup>80</sup> en 1957, y denominado Trombopoyetina (TPO) por Keleman en 1958<sup>81</sup>. Desde ese momento muchos grupos han dirigido sus investigaciones al aislamiento y purificación de la TPO, pero sólo muy recientemente varios laboratorios de manera simultánea han conseguido purificarla, clonar su gen e identificarla con el ligando del receptor c-mpl<sup>82, 83</sup>. A partir del momento en que se dispone de la proteína purificada una serie de evidencias experimentales han llevado a corroborar la hipótesis de que TPO constituye el regulador fisiológico de la trombopoyesis. Así, se ha podido demostrar que TPO soporta la proliferación de los progenitores megacariocíticos y su diferenciación a megacariocitos poliploides tromboformadores<sup>82</sup>. Los ratones c-mpl deficientes presentan un marcado descenso en el número de plaquetas y de megacariocitos junto con niveles elevados de TPO en suero<sup>84</sup>, y la administración de TPO a ratones normales produce un llamativo incremento en las cifras de plaquetas circulantes a través de una megacariocitopoyesis acelerada<sup>85</sup>.

Ciertas observaciones recientes han sugerido la posibilidad de que TPO puede estar además implicada en la proliferación de progenitores hematopoyéticos inmaduros. El protooncogén v-mpl homólogo de c-mpl produce un síndrome mieloproliferativo en ratones que afecta a las líneas granulocítica, eritroide, monocítica, megacariocítica y

mastocitaria<sup>86</sup>. Además el transcrito del *c-mpl* está presente en células CD34+CD38-humanas altamente enriquecidas en progenitores primitivos<sup>87</sup>.

A partir de estas evidencias han comenzado a publicarse los primeros resultados de cultivos in vitro de progenitores hematopoyéticos en presencia de TPO. Kobayashi y cols.<sup>88</sup> han demostrado que TPO actúa sinérgicamente con SCF y/o IL-3 soportando la producción de colonias hematopoyéticas multilineales a partir de progenitores inmaduros de médula ósea humana, y en combinación particularmente con SCF constituye un estímulo de la producción de progenitores en suspensión más potente que otras citocinas como IL-6, IL-11 y G-CSF. Borge y cols.<sup>89</sup> han demostrado otro efecto importante de TPO in vitro sobre células de médula ósea humana CD34+CD38-consistente en su capacidad de mantener la viabilidad celular vía inhibición de la apoptosis. Este doble efecto de estimulación de la producción de progenitores y de inhibición de la apoptosis de stem cells inmaduras hacen de TPO una de las citocinas con mayor aplicabilidad teórica en los modelos de expansión de células hematopoyéticas humanas.

#### **I.-5. Uso de los Modelos Animales en la Evaluación de la Capacidad de Repoblación a Largo Plazo de Stem Cells Humanas.**

Los estudios in vitro no son capaces de resolver la cuestión de la capacidad de repoblación de la hematopoyesis a largo término de las SC humanas.

La necesidad de estudio del prendimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas humanas primitivas in vivo ha llevado al desarrollo de varios modelos animales de ratones inmunodeficientes. Estos modelos incluyen el clásico ratón con

Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID) C.B-17 scid/scid<sup>90</sup>, el ratón inmunodeficiente beige atímico ligado a X (bnx)<sup>91</sup>, el ratón SCID humanizado (SCID-hu) en el cual se trasplantan quirúrgicamente tejidos hematopoyéticos humanos fetales tales como hígado, timo y fragmentos óseos<sup>92-94</sup>, y un ratón SCID transgénico que expresa los genes de IL-3, GM-CSF y SCF humanos<sup>95</sup>.

Recientemente, una nueva cepa de ratón NOD/LtSz-scid/scid (NOD/SCID) ha sido desarrollada mediante el cruce de ratones SCID con ratones diabéticos no obesos (NOD/Lt)<sup>96</sup>. Varios autores han estudiado este modelo animal llegando a determinar que el nivel de prendimiento de células humanas tras xenotrasplante de esplenocitos<sup>97</sup>, células mononucleadas de sangre periférica<sup>98</sup>, médula ósea<sup>99</sup> o SCU<sup>100</sup> es entre cinco y diez veces superior al que puede conseguirse con los mismos trasplantes en el clásico ratón SCID.

Una vez determinada la utilidad de los modelos de ratones inmunodeficientes en el estudio de la capacidad de prendimiento de SC humanas, son varios los autores que han empleado estos modelos murinos para estudiar la capacidad funcional de repoblación permanente de la hematopoyesis de injertos expandidos. Así, Laver y cols.<sup>101</sup> demostraron que el prendimiento de la hematopoyesis humana en ratones BNXd trasplantados con células CD34+ de SCU deplecionadas de linfocitos T y expandidas con IL-3+SCF no se veía comprometido; este estudio, sin embargo, atendía exclusivamente al prendimiento a corto plazo y no estudiaba el efecto de la expansión mediada por citocinas en el prendimiento sostenido a largo término de las SC de SCU expandidas. Humeau y cols.<sup>102</sup> infectaron células CD34+ de sangre periférica con el gen viral nis-Lac Z, y las cultivaron en presencia de IL-3+IL-6+GM-CSF+SCF; las células fueron a continuación inyectadas en implantes de médula ósea y timo de ratones SCID-

hu, obteniéndose prendimiento de células originarias del donante en médula ósea pero no en timo.

En la actualidad se dispone de los primeros estudios de capacidad funcional de prendimiento de células humanas expandidas en ratones NOD/SCID. De especial interés resulta el trabajo de Bathia y cols.<sup>103</sup> en el que demuestran que la célula humana capaz de repoblar la hematopoyesis de ratones NOD/SCID conocida como “Scid repopulating cell” (SRC) puede ser mantenida y/o modestamente expandida tras el cultivo in vitro de células CD34+CD38- de SCU con SCF+FL+G-CSF+IL-3+IL-6; el análisis cuantitativo demostró un incremento entre 4 y 10 veces en el número de células CD34+CD38- y en el número de CFU, así como un incremento entre 2 y 4 veces en el número de SRC. Por el contrario, Güenechea y cols. han publicado recientemente un retraso significativo en el prendimiento en ratones NOD/SCID de células de SCU expandidas con IL-3+IL-6+SCF con respecto a células no expandidas<sup>104</sup>. Obviamente las diferencias en los sistemas de cultivo, las citocinas adicionadas al medio y las diferencias en los métodos de trasplante pueden ser responsables de estos resultados aparentemente contradictorios.



## **II.-JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

## **II.- JUSTIFICACION, HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

### **II.-1. Justificación.**

A pesar del extraordinario interés que ha despertado la posibilidad de expansión ex vivo de células hematopoyéticas humanas, y de los numerosos estudios experimentales que se han llevado a cabo en este campo durante los últimos años, persisten numerosas cuestiones sin resolver, que nos parecen previas a la aplicación clínica de estas técnicas.

La primera cuestión a plantear es si las células CD34+ expandidas “ex vivo” mantienen realmente la capacidad de establecer un injerto hematopoyético sostenido. La única manera de responder a esta cuestión es el modelo de trasplante xenogénico en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID); de este tipo de modelos existen escasos estudios, llevados a cabo exclusivamente con células de SCU y MO, y con resultados hasta cierto punto contradictorios.

La segunda cuestión importante es si es o no posible expandir las células CD34+ de sangre periférica tras movilización con factores de crecimiento (G-CSF), ya que esta es la fuente de SC que hasta el momento se ha presentado como más ventajosa, tanto por facilidad de obtención como por rapidez de prendimiento. En este sentido, aunque las primeras experiencias clínicas de trasplante de células expandidas se realizaron a partir de progenitores de sangre periférica, los regímenes de acondicionamiento empleados en estos estudios no eran realmente mieloablativos, por lo que no se pudo demostrar la capacidad de injertar de las células expandidas. A nivel experimental son escasos los estudios llevados a cabo con progenitores de sangre periférica y los resultados tan contradictorios que han llevado a algunos autores a concluir que no es posible expandir progenitores a partir de esta fuente, mientras que a otros les han llevado a la conclusión contraria.

Basados en estas premisas nos proponemos estudiar la capacidad de expansión “ex vivo” de células CD34+ de sangre periférica con combinaciones de citocinas que incluyan las que actúan sobre SC no codificadas como TPO, FL y SCF, junto con otras como IL-3 e IL-6 que actúan sobre células progenitoras codificadas. Igualmente, nos proponemos valorar la capacidad real de injerto a largo plazo de las células de sangre periférica expandidas, diferenciándolas de las CD34+ originales sembradas en el cultivo mediante una técnica de “cell tracking” que nos permite seleccionar exclusivamente las células CD34+ generadas de novo, para su posterior trasplante y valoración in vivo en ratones NOD / SCID.

## **II.-2. Hipótesis.**

Al igual que las células CD34+ procedentes de SCU o de MO, las de sangre periférica (SP) pueden ser expandidas “ex vivo” por combinaciones de citocinas que incluyan aquellas que actúan expandiendo los compartimentos de SC más inmaduras (autorrenovación) y aquellas otras que potencian la expansión de células progenitoras codificadas de línea.

## **II.-3. Objetivos:**

- 1) Valorar la expansión de células CD34+ de SP en cuanto número y capacidad funcional con diversas combinaciones de citocinas.
- 2) Purificación de las células CD34+ generadas de novo en los cultivos mediante “cell tracking” y posterior separación celular activada por fluorescencia (“cell sorting”).
- 3) Valoración de la capacidad de injerto a largo plazo de las células purificadas generadas de novo en los cultivos mediante trasplante en ratones NOD / SCID.

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **III.-1. Obtención y Purificación Celular.**

Las células empleadas en todos los experimentos fueron obtenidas de alícuotas de productos de aféresis de donantes para trasplante alogénico. La movilización previa a los procedimientos de aféresis se llevo a cabo mediante administración de G-CSF a dosis de 12  $\mu\text{gr}/\text{kg}/\text{dia}$ . Las aféresis fueron realizadas mediante un procedimiento estándar de leucoféresis en una máquina Fenwall CS 3000 Plus (Nexell Therapeutics Inc. Irvine CA, USA).

Los productos de aféresis fueron sometidos a un procedimiento de selección positiva. La selección positiva de las células CD34+ se llevó a cabo por un procedimiento inmunomagnético en un sistema automático Isolex 300i (Nexell) que, de forma resumida consiste en lo siguiente: tras un lavado inicial en el que se eliminan las plaquetas y se concentra el producto, las células son incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD34 de origen murino y a continuación con microesferas magnéticas Dynal M-450 recubiertas de un anticuerpo monoclonal de rata anti Ig de ratón, con lo que las células diana CD34+ quedan fijadas a las microesferas magnéticas.

A continuación se somete a la suspensión celular a la acción de un campo magnético en el cual las células diana recubiertas por microesferas quedan atrapadas, separándose así de las células CD34<sup>-</sup> negativas. Por último, las células CD34+ son liberadas de las microesferas por la acción de un péptido específico PR34+ (Nexell) que separa la unión antígeno-anticuerpo entre células y microesferas.

De los productos de selección positiva o de selección positiva/negativa, se obtuvo una alícuota de aproximadamente 1 ml, que se empleó en los experimentos de expansión.

### **III.-2.Determinación de la Pureza Post Selección Positiva.**

Una alícuota de  $1 \times 10^6$  células totales, se incubó 10 minutos en oscuridad con un anticuerpo monoclonal anti CD34 humano ligado a Ficoeritrina ( Clon HPCA-2, IgG1, Becton, Dickinson). Tras dos lavados con PBS, las células fueron adquiridas en un citómetro FACScalibur (Becton-Dickinson, San José, CA, USA) dotado con un láser de Argón enfriado por aire a 488nm y 15mW de potencia. Se empleó un software específico para análisis citométrico CellQuest 1.2.2 ( Becton-Dickinson, San José, CA, USA). Se adquirieron al menos 10.000 eventos totales con detectores fijos con los siguientes valores: FS: EOO, 1.80 Amplificación lineal. SC: 210 y FTM2: 475.

El análisis se realizó primero seleccionando eventos sobre morfología FS versus SC y finalmente sobre un dot-plot SC en eje X versus Ficoeritrina CD34 en eje Y considerándose positivos los eventos con alta expresión de CD34 y bajo SC. Como controles se emplearon células mononucleadas totales y células marcadas con un anticuerpo monoclonal isotípico (IgG1) marcado con Ficoeritrina. En ambos casos la señal transformada logarítmica era inferior a la primera década logarítmica.

### **III.-3.Marcaje Celular con PKH26.**

Las alícuotas obtenidas de los productos de selección positiva fueron sometidas a tinción con el colorante PKH26 (Sigma Chemical San Louis, MO, USA) que tiene la

propiedad de sin afectar la biología celular, permite seguir las células marcadas que emiten fluorescencia roja, que inician los cultivos de expansión y distinguirlas de las células CD34<sup>+</sup> generadas de novo en los cultivos que no emiten fluorescencia. El procedimiento de tinción consistió en la incubación de la suspensión celular a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/ml., durante 4 minutos con el colorante PKH26 a una concentración de  $2 \times 10^{-6}$  M. Transcurridos los 4 minutos la reacción fue parada mediante la adición de un volumen igual de suero de ternero fetal (FCS) durante 1 minuto. Por último, se añadió un volumen igual de medio de cultivo de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) suplementado con un 10% de FCS. A continuación las células fueron lavadas en X-VIVO-15 (Bio-Whittaker Walkersville, MD, USA), resuspendidas, contadas y calculada su viabilidad mediante tinción con Azul Tripan. Una alícuota de estas células conteniendo entre 20 y 50.000 células fue utilizada para el análisis de la fluorescencia inicial de la suspensión celular debida a PKH26 en el día 0.

### **III.-4.Expansión “Ex Vivo”.**

Las células teñidas con PKH26 fueron resuspendidas en X-VIVO-15 suplementado con glutamina (Sigma) y 2-mercaptoetanol  $10^{-4}$  M a una concentración celular final en el cultivo de  $1 \times 10^5$  células/ml. La suspensión celular fue dividida en alícuotas que fueron cultivadas con una única citocina o con combinaciones de ellas, utilizándose en todo caso las siguientes concentraciones finales de citocinas en el cultivo:



TPO.....	20 ng/ml
SCF.....	100 ng/ml
FL.....	100 ng/ml
IL-3.....	20 ng/ml
IL-6.....	20 ng/ml

Todas las citocinas fueron obtenidas de R&D Systems, Minneapolis, MN, USA.

En cada uno de los experimentos las células fueron cultivadas en presencia exclusivamente de TPO, de SCF y de FL, así como con las combinaciones IL-3+IL-6, TPO+SCF+FL (Combinación 3) y TPO + SCF + FL + IL-3 + IL-6 (Combinación 5). Cada una de las suspensiones celulares fueron incubadas en placas de 96 pocillos de fondo plano en estufa a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Con objeto de determinar la duración idónea de los cultivos, las células fueron analizadas en los días +4 y +6, determinándose celularidad, porcentaje de células CD34+, viabilidad y emisión de fluorescencia debida a PKH26.

### **III.-5.Separación Celular Activada por Fluorescencia de las Células Expandidas.**

#### **III.-5.1.Preparación de la suspensión celular.**

A día 0 como muestra control inicial y a los días 4 y 6 de cultivo en medio completo con citocinas, las células se transfirieron a tubos de 25x75 mm (Coulter, Izasa, España). Tras dos lavados con PBS, se añadieron 50µL de gammaglobulina humana para bloquear los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas (Fc). Se empleó el anticuerpo monoclonal anti CD34 humano (Becton-Dickinson) 10µL por cada  $1 \times 10^5$  células, incubándose 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después las células se lavaron de nuevo dos veces con PBS y se resuspendieron en 500µL de PBS. Se empleó Ioduro de Propidio (en una solución de trabajo de 1µg/µL) a concentración de 1µL/ml a la cual solamente las células con perforaciones de membrana, es decir no viables, son permeables al colorante.

### **III.-5.2.-Descripción del citómetro Elite ESP.**

Para la separación celular activada por fluorescencia se empleó un citómetro con capacidad de separación electrostática Coulter® EPICS® Elite ESP (Coulter Corporation, Hialeah, Florida USA). El citómetro consta de dos fuentes de láser Cyonics, Ltd ( Sunnyvale, California, USA) (15mW de potencia y 5.5<sup>a</sup>): Argón con emisión de luz a 488 nm, y un láser de Helio Neón que emite a longitud de onda constante de 633 nm . El láser incide sobre una cámara de cuarzo cúbica por la cual circula la suspensión celular envuelta en líquido salino ISOTON, con un orificio de salida al aire de 100 micras. La dispersión de la luz de hasta 15 grados, se recoge en un receptor de señal frontal atenuado con una máscara negra, generando la señal denominada Forward scatter (FS). La dispersión de luz lateral denominada Side scatter (SS) y las señales producidas por la excitación de la fluoresceína del monoclonal CD34, del colorante PKH26 y del Ioduro de Propidio, es agrupada mediante una lente convergente y fraccionada en distintas longitudes de onda mediante filtros ópticos de paso de banda (PB) o dicroicos largos (DL) que permiten el paso de longitudes de onda fijas o solamente las que superen la longitud determinada respectivamente. La descripción desde la lente convergente hasta el último fotomultiplicador es:

**488 nm PB    525 PB    575 PB    610 PB**

**488 nm DL    488 nm BK    550 DL    640 DL    675 PB**

Para recoger las señales de dispersión lateral se utilizan cuatro fotomultiplicadores que recogen: FMT1 señal de 488nm o la generada por la dispersión del láser argón por el citoplasma celular, FMT2 señal de 525 nm correspondiente a la emisión de la fluoresceína ligada al CD34, FMT3 señal de 575 nm correspondiente a la emisión del PKH26 y FMT4 señal de 610 nm correspondiente a la emisión del Ioduro de Propidio. Las cinco señales generadas son transferidas a un soporte informático con una unidad 4.86 a 25 MHz, dotada de programas de análisis y creación de histogramas, dot plots y tratamiento estadístico.

El citómetro está dotado sobre la cámara de cuarzo de un cristal piezoeléctrico que transforma una señal eléctrica en una vibración que produce la ruptura del líquido de la suspensión celular en minúsculas gotas en las que quedan aisladas células individuales. Esas gotas serán cargadas eléctricamente cuando sea deseado y separadas mediante fuerza electrostática generada por unas placas situadas a la salida de la cámara de cuarzo. De esta forma las gotas que contengan las células que reúnan las condiciones impuestas, serán recogidas en un tubo estéril con medio RPMI.

La calibración precisa del eje cámara-láser-sistema óptico se realiza diariamente utilizando unas microesferas comerciales ( Flow-Check Fluoroesferas, Coulter) mediante unas potencias fijas para cada receptor de señal:

FS: Voltios: 430 Intensidad de ganancia: 10 y pico de ganancia:1

FMT1: Voltios: 230 Intensidad de ganancia: 10

FMT2: Voltios: 475 Intensidad de ganancia: 10 y pico de ganancia: 5

FMT3: Voltios: 510 Intensidad de ganancia: 10 y pico de ganancia: 5

FMT4: Voltios: 580 Intensidad de ganancia: 10 y pico de ganancia: 5

Analizando esta suspensión de microesferas a 100 eventos por segundo se deben conseguir unos coeficientes de variación medios de menos de 1 %.

### **III.-5.3.- Protocolo de separación celular.**

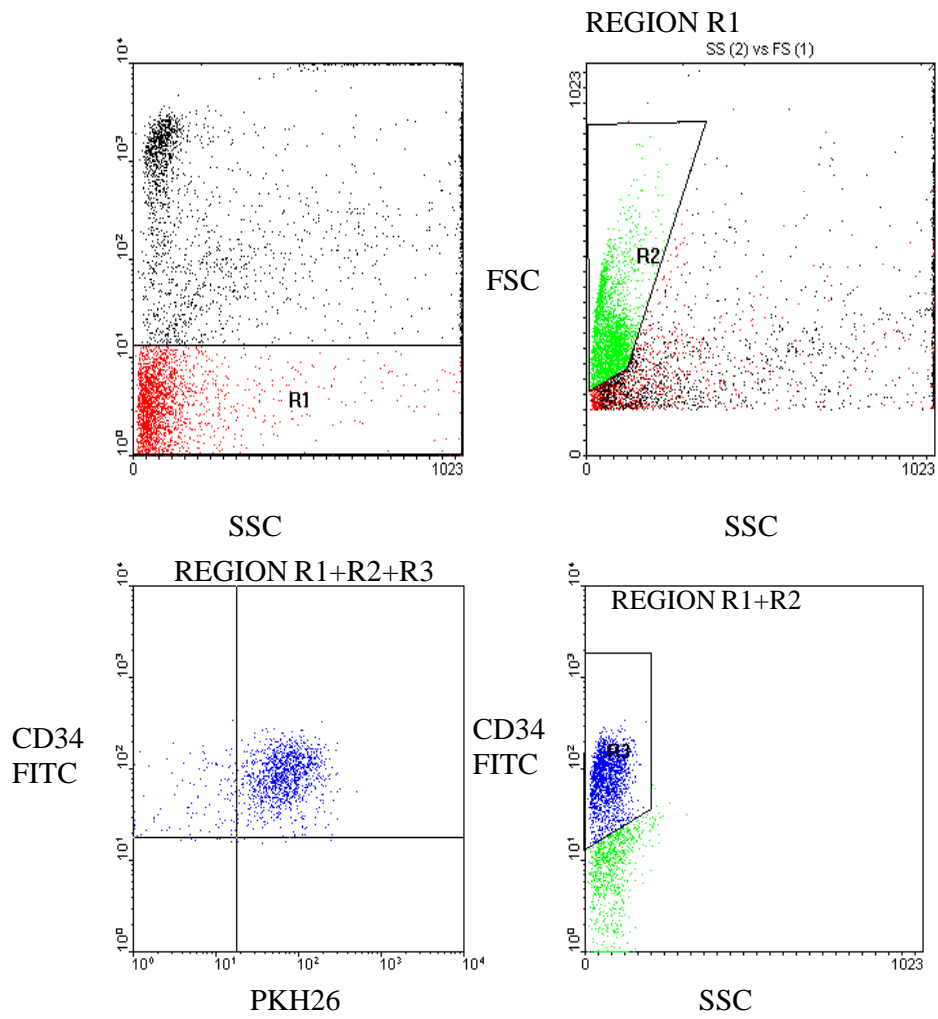
Tras la perfecta alineación del eje láser-cámara-sistema óptico, se inicia la ruptura de líquido mediante la vibración del cristal piezoeléctrico a una frecuencia de 30 Khz y una amplitud total de vibración de 50 por ciento. Las placas de deflexión actúan a un 90 por ciento de su separación máxima. Tras 15 minutos de vibración, se disminuye la frecuencia a 25Khz que produce una ruptura suficientemente cercana a la salida de la cámara de cuarzo. Empleando la suspensión de microesferas y separando 50 de ellas se determina la distancia desde que la gota se selecciona hasta que se carga eléctricamente y se separa, comprobando la presencia de 50 microesferas fluorescente en un microscopio de fluorescencia Zeiss ( el cálculo del “drop delay” se mantiene entre 26-28 gotas de forma estable). Los voltajes para cada fotomultiplicador y las compensaciones por el solapamiento de emisiones son constantes durante todo el experimento y también interensayo. Para las señales de fluorescencia recogidas por los FTM2-3-4 se empleó transformación logarítmica para su expresión en gráficos. Con estos valores, células mononucleadas frescas de sangre periférica analizadas puras o con anticuerpos irrelevantes marcados con fluoresceína y ficoeritrina, no superaban la primera década logarítmica correspondiendo a autofluorescencia y el porcentaje de captación de Ioduro de Propidio será inferior al 5%.

	<b>FS</b>	<b>FTM1</b>	<b>FTM2</b>	<b>FTM3</b>	<b>FTM4</b>
<b>Volts</b>	<b>400</b>	<b>270</b>	<b>930</b>	<b>980</b>	<b>990</b>
<b>Intensidad</b>	<b>10.0</b>	<b>15.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>
<b>Pico Ganancia</b>	<b>1.0</b>		<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>

Compensación de fluorescencia: Y-%X

<b>Y</b>	<b>FTM2</b>	<b>FTM3</b>	<b>FMT4</b>
<b>X</b>			
<b>FTM2</b>		<b>9.2</b>	<b>0.0</b>
<b>FTM3</b>	<b>27.0</b>		<b>9.0</b>
<b>FTM4</b>	<b>0.0</b>	<b>19.0</b>	

Para la perfecta identificación de las células hijas expandidas CD34+ y viables, se empleó un protocolo de adquisición secuencial creando ventanas primero sobre los eventos viables, después sobre las células agrupadas, sobre las células CD34+ y finalmente analizando la expresión de PKH26 ( Figura 1). A día 6 de cultivo, solamente las células por debajo del cut-off inicial de expresión de PKH26, fueron separadas, dibujando una ventana rectangular. Las células se recogieron en medio RPMI estéril.



**FIGURA 1: Representación de análisis secuencial de células CD34 positivas viables ( Ioduro Propidio negativo) para determinar la captación de colorante PKH26 pre expansión.**



### **III.-6.Determinación de la Frecuencia de LTC-IC Mediante Análisis de Dilución Límite (LDA).**

Células CD34+ sin manipular y células CD34+ procedentes de expansión fueron utilizadas para evaluar la frecuencia de LTC-ICs utilizando un método libre de estroma descrito por Traycoff y cols.<sup>110</sup>. Las células se cultivaron en una dilución límite (2,4,8,16,32 y 64 células por pocillo) en placas de 96 pocillos con 100  $\mu$ l IMDM + 10% de FCS, suplementado con IL3 (10ng/ml), IL6 (10ng/ml), factor estimulante de colonias granulocíticas-macrófagas (GM-CSF; R&D Systems, 10ng/ml) y eritropoyetina (EPO; R&D Systems, 5U/ml). Se seleccionaron las células CD34+ con baja expresión de PKH26 utilizando un citómetro Coulter ESP con un brazo Autoclone (Coulter Corporation) para introducir en cada pocillo el número de células correspondiente. Las células se incubaron a 37° C en una atmósfera 100% humidificada y conteniendo 5% de CO<sub>2</sub> en aire durante 7 días. Fueron realimentadas con 100  $\mu$ l de medio suplementado con citocinas a las mismas concentraciones, y se incubaron otros 7 días. Catorce días después de comenzar el cultivo se extrajeron 120  $\mu$ l de cada pocillo y las células fueron cubiertas con 150  $\mu$ l de un medio formado por 33% de FCS, 5x10<sup>-5</sup> mol/L de 2-mercaptoetanol, citocinas (como se indicó anteriormente) y 1% de metilcelulosa en IMDM. Las placas se incubaron durante 14 días y se procedió, mediante un microscopio invertido, al recuento de CFU-GM, unidades formadoras de colonias eritroides (BFU-E) o CFU-GEMM, en cada pocillo. Los pozos fueron considerados positivos con la presencia de al menos una CFC. El número de pocillos positivos y negativos fueron calculados y posteriormente analizados para establecer la frecuencia de LTC-IC por población celular.

### **III.-7. Inmunofenotipo de las Células Expandidas.**

Alícuotas de células sin manipular y células expandidas y marcadas, se lavaron dos veces con PBA. A continuación, las células fueron teñidas con per-CP (proteína Peridin Chlorophyll) marcada con anticuerpo monoclonal antihumano CD34 (HPCA-2, Becton Dickinson) y seguidamente con los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón antihumanos conjugados con Fluoresceina Isotiocianato (FITC). CD33 (clon WM-54, Dako; Denmark), CD38 (clon T16, Immunotech, France), y anti-HLA-DR (clon L243, Becton Dickinson). Después de 10 minutos de incubación en oscuridad, se lavaron otras dos veces en PBA y se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo FACScalibur para comprobar la expresión de CD34, intensidad de PKH26 y expresión de CD33, CD38 y HLA-DR.

### **III.-8. Análisis del Ciclo Celular.**

Una alícuota de las células CD34<sup>+</sup> seleccionadas procedentes de SCSP, se conservó sin marcar con PKH26 y se estudió su ciclo celular, para ser comparado con el de las células marcadas, tanto antes, como después de 6 días en cultivo. Para esto las células se lavaron dos veces en PBA y se resuspendieron en 1ml de etanol 70% frío. A continuación las células fueron tratadas con RNAsa y 20  $\mu$ l de PI. Las fases del ciclo celular se establecieron con el citómetro de flujo FACScalibur y se analizaron con MODFIT software (Becton Dickinson).

### **III.-9.Trasplante de Células Expandidas en Ratones NOD/SCID.**

Con objeto de valorar la capacidad de prendimiento in vivo de las células expandidas, las células CD34+ viables obtenidas de los cultivos de expansión y posteriormente separadas por emisión o no de fluorescencia debida a PKH26 fueron trasplantada a ratones inmunodeficientes y posteriormente valorado el quimerismo humano.

#### **III.-9.1.Animales.**

Hemos utilizado en nuestros trabajos ratones hembras de la cepa NOD/LtSz-Prkde<scid >/J (NOD/SCID), que procedían de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, (USA)<sup>105</sup> de cinco semanas de vida. Este modelo de ratón fue creado mediante retrocruzamiento de la mutación SCID sobre la estirpe del ratón diabético no obeso NOD/LtSz<sup>96</sup>, obteniendo un animal diabético no obeso y lo que es más importante con una inmunodeficiencia congénita.

Los ratones fueron instalados en una cámara de aislamiento móvil de presión positiva, construida en acero inoxidable Z6 CN 18 09 y las puertas en altuglas transparente.

La cámara está equipada con: filtro absoluto, filtro de carbón activado, prefiltro lavable de entrada de aire, ventilador de velocidad regulable y manómetro. Así mismo cada compartimento va provisto de un termómetro de temperatura. Ref. : E4ESENC800.

Los ratones fueron mantenidos en condiciones de esterilidad, en jaulas con pienso y agua igualmente esterilizados.

El pienso suministrado por Extralab<sup>®</sup> Ets Pietrement B. P. 5977482 PROVINS CEDEX como alimento completo para ratas / ratones esterilizado con la siguiente composición porcentual:

-	Proteínas totales	18%
-	Materia grasa total	5%
-	Celulosa total	4,5%
-	Residuos totales	6%
-	Humedad	11%

Este alimento se fabrica con: granos de cereales, con productos y subproductos de cereales y oleaginosas, productos de pescado, forrajes secos, aceites y grasas, minerales, y todo ello complementado con vitamina A 45000 UI/Kg. , Vitamina D3 2000 UI/Kg. , y Vitamina E 80 UI/Kg.

El agua procedente de la red de abastecimiento de la población se filtró mediante filtros Millipore Sterivex<sup>®</sup> con dispositivo de filtro de 0,22 µ con dispositivo de campana, para esterilización de soluciones acuosas. Se administró a los ratones tanto pienso como agua ad libitum..

Se emplearon jaulas para ratones tipo S (424 cm<sup>2</sup>) de capacidad de 5 a 11 ratones según peso. Compuesta por:

Cubeta de policarbonato tipo S. Ref. E1CCBAC007

Tapa en acero inoxidable con separador móvil. Ref. E1CVCOU117

Botella de PE 250 ml. Ref. E5BEBIB001

Tapón de acero inoxidable con pipeta de 36mm y rosca. Ref. E6BXEMB901

Así mismo cada jaula iba provista de una capucha filtrante (cubre-jaula), irradiadas para mayor aislamiento de los animales inmunodeprimidos. Ref. E4FVCOU917

Este material así como el armario-cámara de aislamiento nos fueron suministrados por CRIFFA, S.A. Barcelona.

### **III.-9.2.Cabina de flujo laminar.**

Para trabajos en condiciones de esterilidad y ausencia de partículas se empleo una cabina de flujo laminar, que mediante un barrido de aire filtrado e impulsado en régimen laminar sobre la zona de trabajo nos proporcionó el ambiente adecuado para el trasplante y todas las manipulaciones llevadas a cabo sobre los ratones, como limpieza de jaulas, cambio de cama de viruta estéril, suministro de comida y agua estériles, así como su introducción en los tubos de irradiación.

Se utilizó clase 100 según norma US Federal Estándar 209e con filtro HEPA (ULPA) con eficacia de 99,999%. Modelo IDL. 96H código 490960, y con dimensiones 1500 x 725 x 600 con los siguientes accesorios: lámpara germicida serie-H (Kit); soporte para cabina IDL. 96; Magnehelic, manómetro; toma de corriente.

Para su mantenimiento de esterilidad, se limpió su superficie con una solución llamada Instrunet<sup>®</sup>30 Esporicida compuesto de:

composición	sin activar	activado
Fenol 90%	10,27%	9,4%
Glutaraldehido	25,00%	2,0%

Con capacidad esporicida, virucida, tuberculicida, bactericida, pseudomonicida y fungicida.

### **III.-9.3.Radiación.**

Se empleo una fuente de Cesio 137, para lo cual se utilizo un irradiador de muestras biológicas GammaCell 1000 (Nordion International Inc, Ontario, Canadá) que consta de dos partes:

Un contenedor fijo de la fuente radiactiva: Cesio137 que presentaba una actividad en fecha 29-8-83 de 612 Curios, y que actualmente emite a una tasa de 3.1 Gy/min. Dicha fuente se encuentra encapsulada en plomo encastrado en una chaqueta de acero

Un rotor que contiene el canister para el posicionamiento de las muestras biológicas. El canister se sitúa sobre una base rotatoria continua que permite una exposición homogénea de la muestra a la fuente. Dicho rotor se halla conectado a un motor eléctrico que permite un giro del mismo de 180°, lo que consigue la exposición o retirada a la fuente radiactiva.

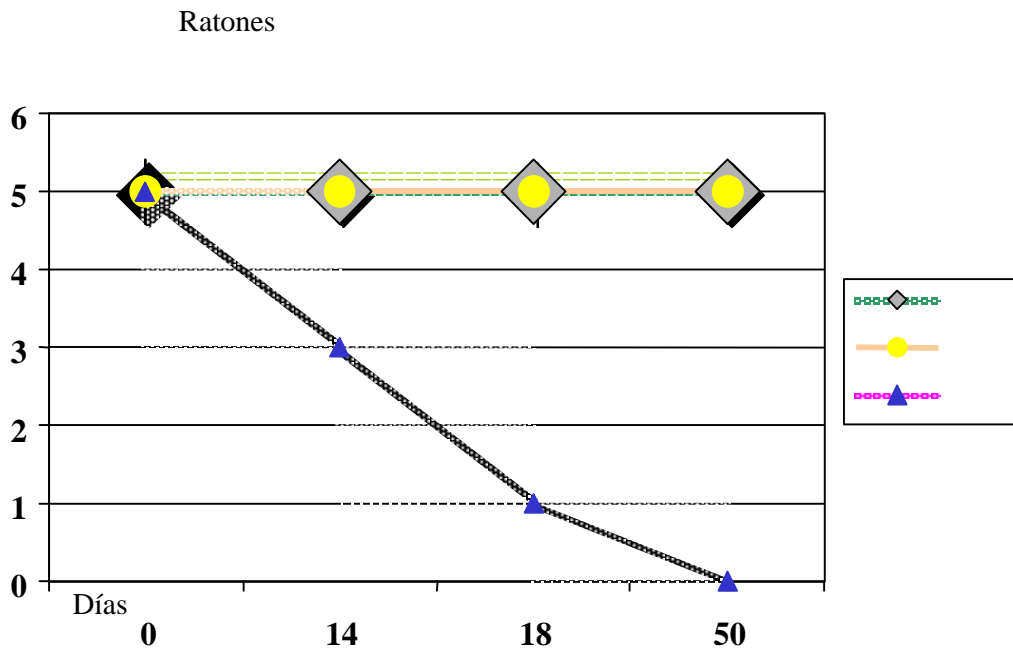
En su parte anterior tiene un panel con un temporizador que permite determinar el tiempo total de exposición de la muestra a la fuente radiactiva.

Mediante estudios dosimétricos se ha determinado la posición ideal de las muestras dentro del canister que permite una dosis administrada lo más homogénea posible y con menos rango de variación dentro del campo expuesto ( $\pm 5\%$ ).

Los ratones fueron radiados con una dosis subletal de irradiación corporal total de 310 cGy, y una tasa de 5 cGy/minuto. Elegimos esta dosis por no observar mortalidad debida a la radiación, y siguiendo algunos trabajos donde las dosis de radiación están próximas a las empleadas por nosotros, desde los 375 cGy usada por

Bonnet D. y cols.<sup>105</sup>, a los 300 cGy utilizados por Johannes C.M. van der Loo y cols.<sup>106</sup>.

Se realizó un estudio de supervivencia previa con grupos de cinco ratones que fueron radiados con distintas dosis desde 200, 300 y 400 cGy, observando que la dosis de 300 cGy era la dosis superior en la que el número total de animales radiados sobrevivían después de 50/días. Por el contrario con una dosis de 400 cGy a los 14 días solamente vivían el 60%, a los 18 días el 20%, y a los 50 días no sobrevivía ninguno de los animales.(Fig.2)



**FIGURA 2: Curva de Supervivencia para distintas dosis de radiación (2, 3 y 4 Gy) en 5 ratones NOD/SICD para cada dosis.**

Para su radiación se transportaron en dispositivos individuales fabricados para tal propósito empleando tubos de polietileno de 50cc de volumen marca Greiner<sup>®</sup>, a los cuales se les había perforado bilateralmente a 1/3 de su base y en el centro del tapón de rosca, los espacios comprendidos en el cono de la base y el del mencionado tapón de rosca se rellenaron con algodón. Una vez preparados se esterilizaron mediante óxido de etileno.

Los ratones dentro de los tubos descritos anteriormente (cada uno en un tubo) se colocaron en el vaso (canister) del GammaCell 1000; para que se mantuvieran en posición vertical se fabricó una peana de espuma de polietileno de 3,5cm de altura que se colocó en el fondo del vaso con una escotadura central de 28mm de diámetro y 17mm de profundidad, en la que se aloja el tubo de 50cc, quedando expuesto a la radiación de forma uniforme.

#### **III.-9.4.Técnica de trasplante.**

Una vez radiados los ratones mediante el procedimiento descrito, se procedió a su trasplante en el mismo día post-irradiación, para ello se procedió a su inmovilización utilizando un sistema que hemos puesto nosotros en práctica, con excelentes resultados.

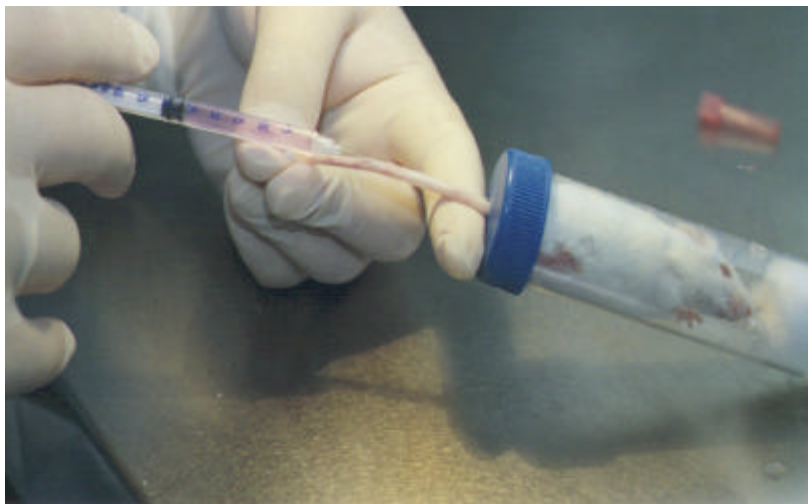
Para inmovilizar al ratón hemos empleado un tubo de polietileno de 50 ml, al igual que empleamos para su radiación total, marca Greiner<sup>®</sup> al que igualmente se perforó por ambos lados opuestos en el 1/3 próximo a su base y en el centro del tapón de rosca por donde se sacó el rabo, quedando aislado del resto del cuerpo del animal para poder así practicar su venopunción en las venas laterales del rabo. Con este



procedimiento evitamos la anestesia del animal y la consiguiente mortalidad postanestesia, así como posibles alteraciones hemodinámicas y/o endocrinas subsecuentes.

Cuando el ratón se encuentra inmovilizado limpiamos el rabo con varias pasadas de un algodón impregnado con alcohol de 70°, consiguiendo dos objetivos por un lado su limpieza y por otro la mayor dilatación de sus venas. Posteriormente lo aproximamos a una fuente de luz y calor emitido por una bombilla halogenada, consiguiendo así la mayor dilatación de sus venas del rabo.

Inmediatamente pasamos a su venopunción e inyección del medio de cultivo con las células suspendidas, para lo cual utilizamos jeringas de 1ml con escala centesimal con aguja montada 25G<sub>5/8</sub>, marca Plastiplak<sup>®</sup> con cono luer y cilindro transparente, que permite una dosificación más fácil y precisa, así como la observación y eliminación de burbujas de aire. (Fig.3).



**Figura 3.-Venopunción en vena lateral del rabo en ratón inmovilizado e infusión de la suspensión celular en PBS.**

### **III.-9.5.Obtención de piezas.**

Los ratones fueron sacrificados entre las seis y ocho semanas postrasplante, mediante luxación cervical. Una vez que se confirma su exitus se pasa hacer la disección practicando una incisión media desde región preesternal hasta proximidades de genitales, separando piel y fascias así como músculos del abdomen y se aborda cavidad abdominal obteniendo bazo. Esta pieza se introduce en medio de cultivo PBS para su posterior procesamiento.

Seguidamente practicamos ambos cortes sobre la piel de los miembros inferiores, separamos músculos hasta llegar a la unión coxo- femoral, la desarticulamos. Igualmente hacemos con la unión femoro-tibial. Una vez individualizados los dos fémures del ratón se procede a su limpieza de masa muscular. Cuando tenemos ambas piezas óseas limpias se procede a cortar las epífisis distales y proximales a nivel de metáfisis mediante bisturí, quedando las diáfisis femorales libres.

Para la obtención de la medula ósea se hace pasar medio de cultivo PBS a presión mediante inyección con aguja montada Plastiplak<sup>®</sup> 25G<sub>5/8</sub> descrita anteriormente, por los canales medulares intradiafisarios femorales. Se recoge este medio en tubos de ensayo de 4 ml, para su lavado y posterior contaje.

### **III.-9.6.Determinación de quimerismo hematopoyético.**

Las células obtenidas de ambos fémures se lavaron dos veces en medio PBS conteniendo 1% de albúmina sérica y 0.2% de azida sódica. Para lisis de hematíes se empleó 1 ml de solución de lisis: 0.155 mol /L NH<sub>4</sub>CL + 0.01mol/L KHCO<sub>3</sub> + 10<sup>-4</sup> mol/L EDTA, incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Una vez lavadas en PBS completo, se añadieron 20mL de Inmunoglobulina Humana inespecífica, y se realizó estudio de quimerismo empleando Anticuerpos monoclonales Ratón anti Humano marcados con fluoresceína o ficoeritrina, en estudio a doble color empleando anticuerpo panleucocitario CD45 en combinación con Anticuerpo línea específico: CD34 para progenitores hematopoyéticos, CD19 para linfocitos B, CD3 para linfocitos T y CD13 para serie mieloide. Los detalles de cada monoclonal se recogen en la tabla 1

**Tabla 1.- Donde podemos apreciar los distintos monoclonales, los clones, fluorocromos y fuentes correspondientes.**

ANTICUERPO	CLON	FLUOROCROMO	FUENTE
CD45	IOC1B	Fluoresceína	Immunotech, Marsella, Francia
CD3	UCHT1	Ficoeritrina	Dako, Dinamarca
CD19	HD37	Ficoeritrina	Dako, Dinamarca
CD13	LeuM7	Ficoeritrina	Becton-Dickinson San José, CA, USA
CD34	HPCA2	Fluoresceína	Becton-Dickinson  San José, CA, USA
CD38	T16	Fluoresceína	Immunotech, Marsella  Francia

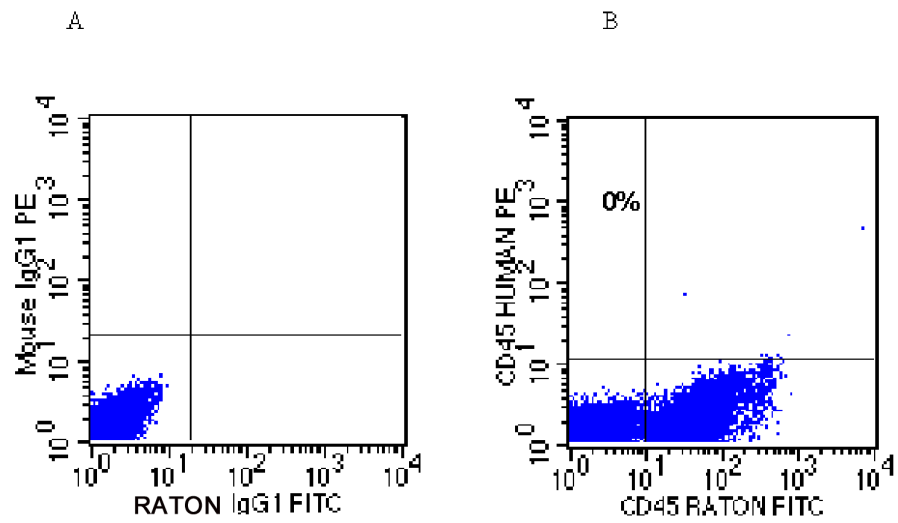
Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, en oscuridad, las células se lavaron dos veces en PBS completo y fueron resuspendidas en un volumen final de 500  $\mu$ L de PBS con 1  $\mu$ l/ml de Ioduro de Propidio (solución stock 1mgr / ml).

La adquisición se realizó en un citómetro FACScalibur ( Becton-Dickinson, San José, CA, USA ) dotado con un láser de Argón enfriado por aire a 488nm y 15mW de potencia. El sistema óptico presenta una configuración estándar con filtros de paso de banda de 530 nm para el FTM1, de 555nm para FTM2 y 650nm para FTM3.

Las señales se recogieron para posterior análisis en un soporte informático Macintosh Quadra 650 ( Apple Computers ). Se empleo un software específico para análisis citométrico CellQuest 1.2.2 ( Becton-Dickinson, San José, CA, USA ). Se adquirieron al menos 10.000 eventos totales con detectores fijos con los siguientes valores:

FS: EOO, 1.80 Amplificación linear. SC: 210, FTM1: 550, FTM2: 475 y FTM3: 600 con amplificación logarítmica todos ellos. La compensación de solapamiento de fluorocromos fue: FTM1 -0.5% FTM2 FTM2 -31% FTM1 FTM2 -0.3% FTM3 y FTM3 -28% FTM2.

El análisis se realizó primero seleccionando eventos viables que no captaban Ioduro de Propidio, después sobre morfología FS versus SC y finalmente sobre un plot de puntos Fluoresceína versus Ficoeritrina que detecta CD45 versus Antígenos línea específicos. Análisis previos de médula ósea de ratones sacrificados sin ser sometidos a trasplante, mostraron negatividad total para eventos detectados con estos monoclonales. El límite de detección de un citómetro determinado en ensayos de dilución es de 1 célula diana entre 10.000 totales. Como controles se utilizaron Anticuerpos monoclonales isotípicos irrelevantes marcados con fluoresceína o ficoeritrina (Fig. 4).



**FIGURA 4: Histogramas para valoración de quimera humana en médula ósea de ratón NOD/SICD. A) Controles isotípicos inespecíficos con FITC y PE. B) Médula ósea de ratón no injertado con células humanas.**

### **III.-10.Análisis Estadístico.**

Todos los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para el análisis de LDA se usó un paquete estadístico específico basado en el test Poisson: L-Calc<sup>TM</sup> (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá).

La significación estadística de las diferencias entre las medias se analizó mediante t de Studens o análisis de varianza (ANOVA), cuando fue necesario.

## **IV.- RESULTADOS.**



## **IV.-RESULTADOS.**

### **IV.-1.Expansión de Células Totales, Células CD34+ y CFC.**

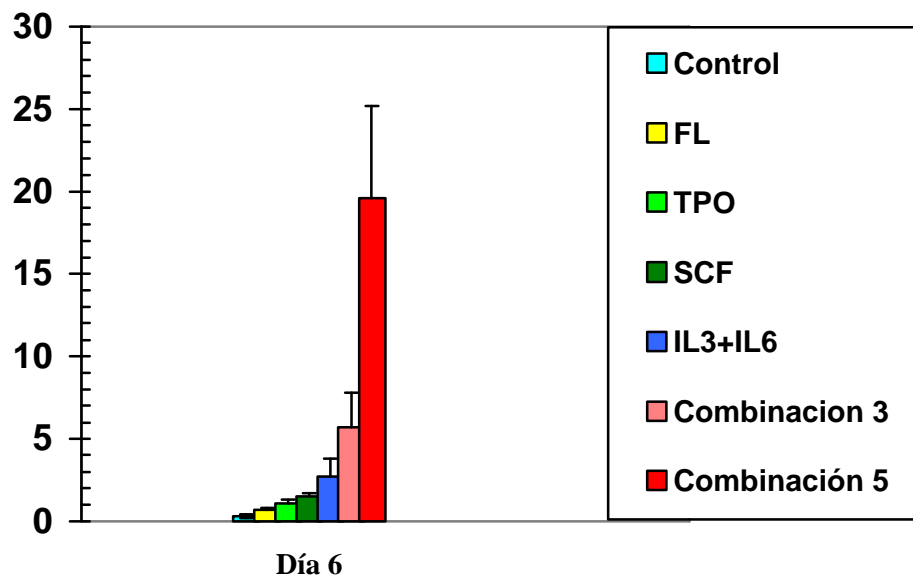
Nosotros hemos estudiado los efectos de cada una de las citocinas, solas y en combinaciones de estas, en el número total de células del cultivo, número de células CD34+ y CFCs tras cultivo en suspensión durante 6 días . Los valores obtenidos representan la media de siete experimentos. Como se demuestra en la figura 5, cuando se cultivaron CD34+ de SCSP sin la adición citocinas, tanto el número de células totales como el de CD34+ disminuyeron respecto a los valores iniciales ( $0.3 \pm 0.1$  y  $0.2 \pm 0.08$  número de aumentos respectivamente,  $p < 0.05$ ). Se observaron disminuciones no significativas en las células totales y células CD34+ cuando se agregó solamente la citocina FL ( $0.7 \pm 0.1$  y  $0.6 \pm 0.1$  veces de aumento, respectivamente,  $p = \text{NS}$ ); la TPO mantuvo el numero total de células ( $1.1 \pm 0.2$ -veces,  $p = \text{NS}$ ) y disminuyeron ligeramente las células CD34+ ( $0.7 \pm 0.1$ -veces,  $p = \text{NS}$ ), con respecto a los valores iniciales, mientras SCF produjo un aumento ligero en ambos ( $1.5 \pm 0.2$  y  $1.4 \pm 0.2$ -veces respectivamente,  $p = \text{NS}$ ). Se objetivó una expansión significativa de ambas, células nucleadas totales y células CD34+ después de ser cultivadas con IL3+IL6 ( $2.7 \pm 1.1$  y  $2.5 \pm 1.0$  veces de aumento respectivamente,  $p < 0.05$ ) así como con TPO+SCF+FL ( $5.7 \pm 2.1$  y  $5.9 \pm 1.9$  veces de aumento, respectivamente,  $p < 0.05$ ). La combinación de SCF+TPO+FL+IL3+IL6 indujo el mayor aumento respecto a los valores celulares iniciales, tanto en cuanto a células totales ( $19.6 \pm 5.6$  veces de incremento,  $p < 0.0001$ )

como a células CD34+ ( $18.2 \pm 4.4$  veces de incremento,  $p < 0.0001$ ). Estos valores de expansión son significativamente mayores que los obtenidos con IL3+IL6 y TPO+SCF+FL ( $p < 0.0001$  one-way ANOVA).

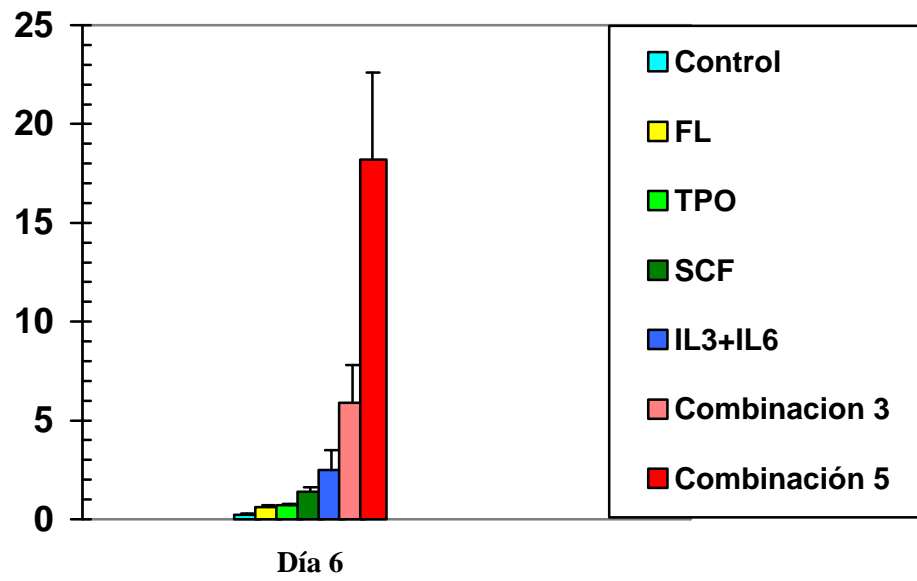
Con respecto a la expansión de CFCs, los resultados son similares: el número de este tipo de progenitores celulares hematopoyéticos disminuyó en cultivos con citocinas aisladas, a valores similares a los de los controles sin citocinas (ver figura 5). Las CFCs aumentaron moderadamente, un promedio de  $3.5 \pm 0.9$  veces ( $p < 0.05$ ), cuando las células eran cultivadas con TPO+SCF+FL, y un promedio de  $2 \pm 0.7$  veces ( $p < 0.05$ ) en los cultivos en suspensión con IL3+IL6. De nuevo, en cultivos estimulados con SCF+TPO+FL+IL3+IL6, se produjo la máxima expansión, con una media de  $18.7 \pm 2.7$  veces de aumento en el compartimento de CFC ( $p < 0.0001$ ).

**FIGURA 5: A) Incremento numérico de células totales, B) de células CD34+ y C) CFCs tras cultivo ex vivo con diferentes citocinas y sus combinaciones; Combinación 3(TPO+SCF+FL) y combinación 5 (SCF+TPO+FL+IL3+IL6)**

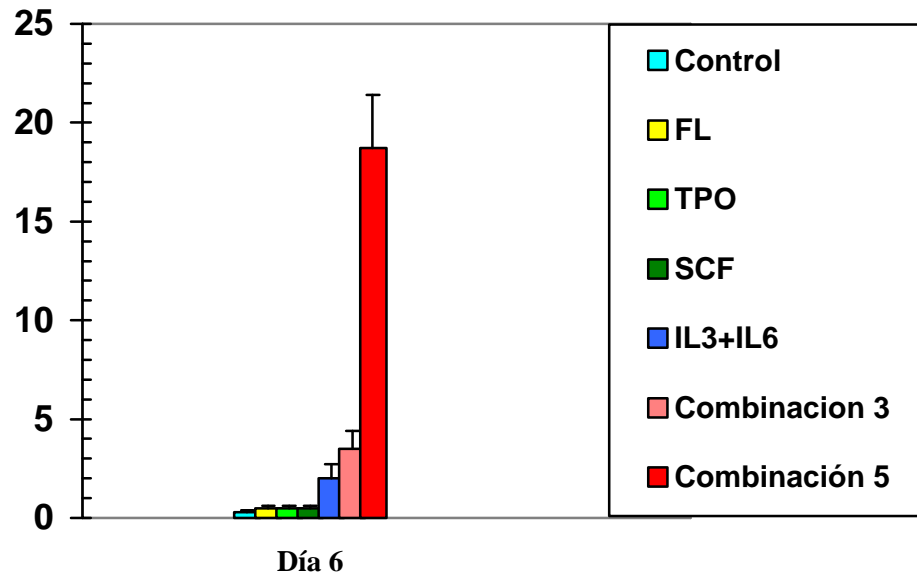
A)



B)



C)



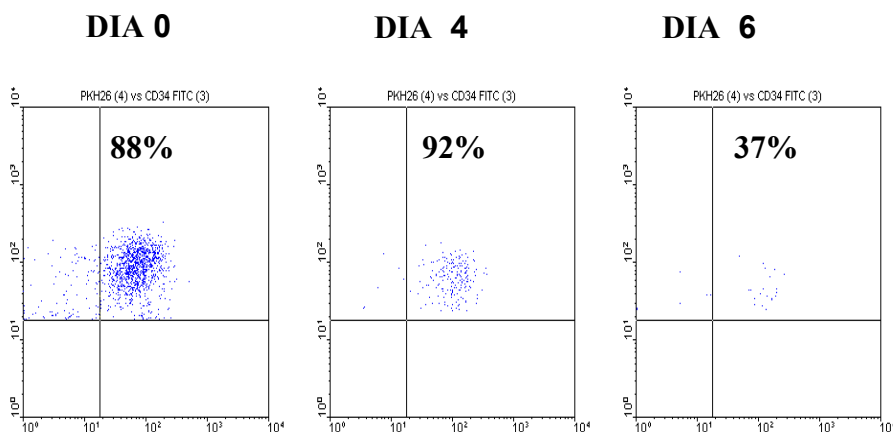
#### **IV.-2.El Efecto de las Diferentes Citocinas en la División Celular.**

Nosotros hemos probado la capacidad de las citocinas TPO, SCF y FL aisladas y en combinación, así como añadiéndoles la suma de IL3+IL6 para inducir la división celular, medida por la pérdida de tinción con fluorescencia PKH26. Las alícuotas de proliferación celular fueron separadas de los medios de cultivo los días 4° y 6°, y se tiñeron con anti-CD34 conjugado con FITC. La figura 6 muestra un experimento representativo, y la tabla 2 resume los resultados de siete experimentos. El análisis mediante citometría de flujo de las células cultivadas reveló un declive mínimo en el porcentaje de células CD34+ junto con un declive gradual en el porcentaje de células PKH26+ entre las células CD34+. Cuando se cultivó exclusivamente con TPO o con SCF solamente, la mayoría de las células CD34+ experimentó la división con sólo una ligera pérdida de la expresión CD34 ( $68.3 \pm 5.5$  % y  $65.9 \pm 7.9$  % de células CD34+PKH26- después del 6° día de cultivo, respectivamente). Como contraste, la FL como citocina única es incapaz de inducir la división celular, con solo  $14.8 \pm 3.3$  % de células CD34+PKH26- después del cultivo. Cuando las células fueron cultivadas en presencia de TPO+SCF+FL, el  $91.9 \pm 2.73$ % sufrían la división celular, demostrando un efecto sinérgico de estas tres citocinas en la estimulación de la división celular. La suma de IL3+IL6 a TPO+SCF+FL produjo un estímulo ligeramente mayor de la división celular (solo

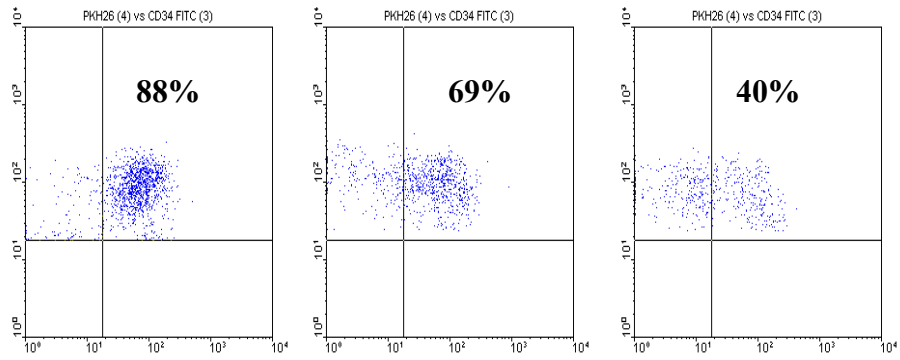
1.7 % de las células permanecían no divididas), con el mantenimiento de expresión CD34 en 81 % de células nucleadas totales.

**FIGURA 6: Efecto de las diversas citocinas y sus combinaciones en la división celular trazada con colorante PKH26. El eje X representa la expresión de PKH26 y el eje Y representa la expresión de CD34. A medida que las células entran en mitosis ( días 4 y 6) mantienen la expresión de CD34 pero pierden PKH26 al sufrir divisiones de membrana donde está adherido el colorante.**

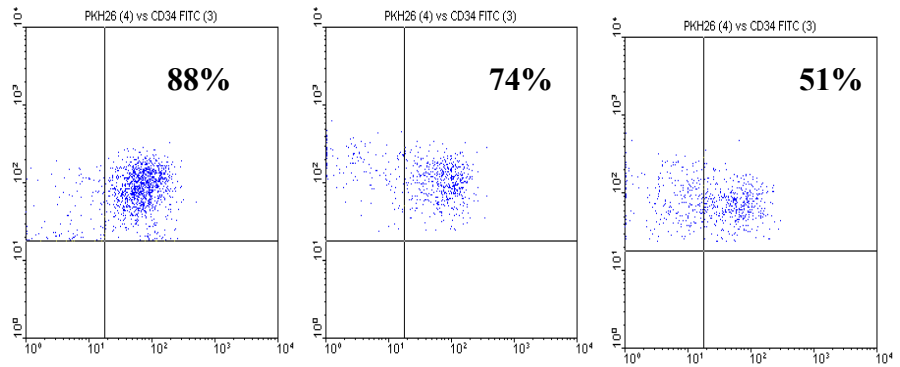
### CONTROL sin CITOCINAS



## TROMBOPOYETINA

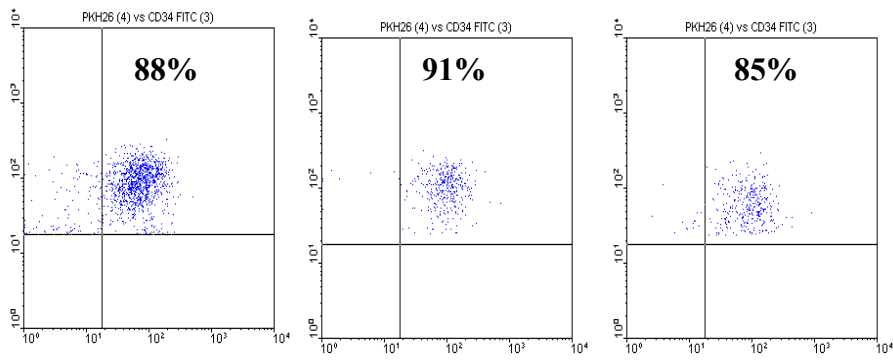


## STEM CELL FACTOR FACTOR FACTOR

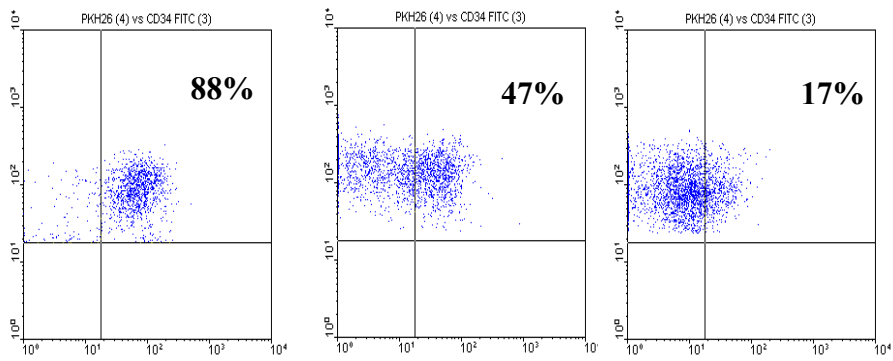




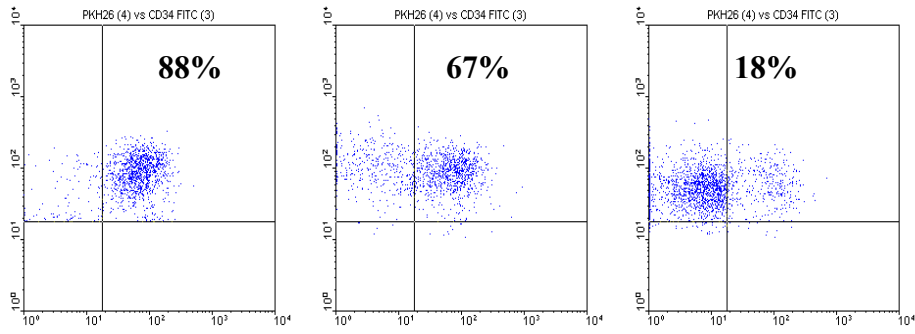
## FLT3 LIGANDO



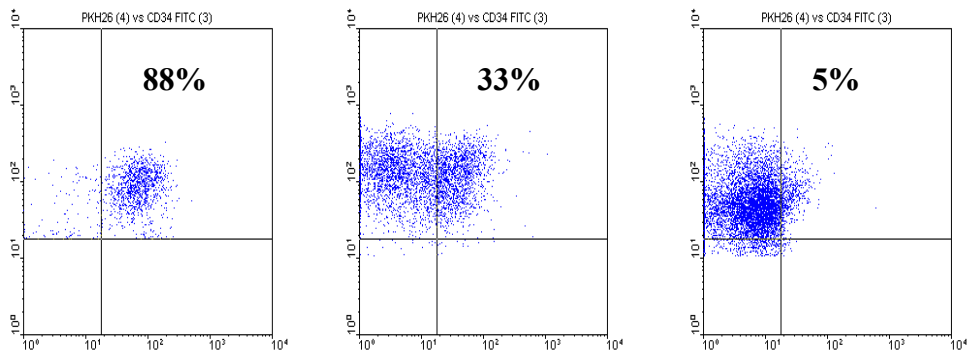
## TPO + SCF + FL



## IL3+IL6



## TPO+SCF+FL+IL3+IL6



**Tabla 2. Porcentaje de células nucleadas totales que expresan CD34 después del cultivo día + 4, y porcentaje de células PKH26- entre las células CD34+.**

<i>Citocinas</i>	<b>%Células CD34+</b>	<b>%Células PKH26-de CD34+</b>
<b>TPO</b>	<b>87.16 ± 4.33</b>	<b>32.38 ± 2.30</b>
<b>SCF</b>	<b>87.16 ± 1.90</b>	<b>36.16 ± 3.99</b>
<b>FL</b>	<b>84.00 ± 4.23</b>	<b>6.58 ± 2.02</b>
<b>TPO+SCF+FL</b>	<b>89.50 ± 4.89</b>	<b>64.16 ± 8.82</b>
<b>IL3+IL6</b>	<b>89.65 ± 2.37</b>	<b>59.16 ± 6.78</b>
<b>TPO+SCF+FL+IL3+IL6</b>	<b>92.66 ± 1.94</b>	<b>80.58 ± 6.11</b>

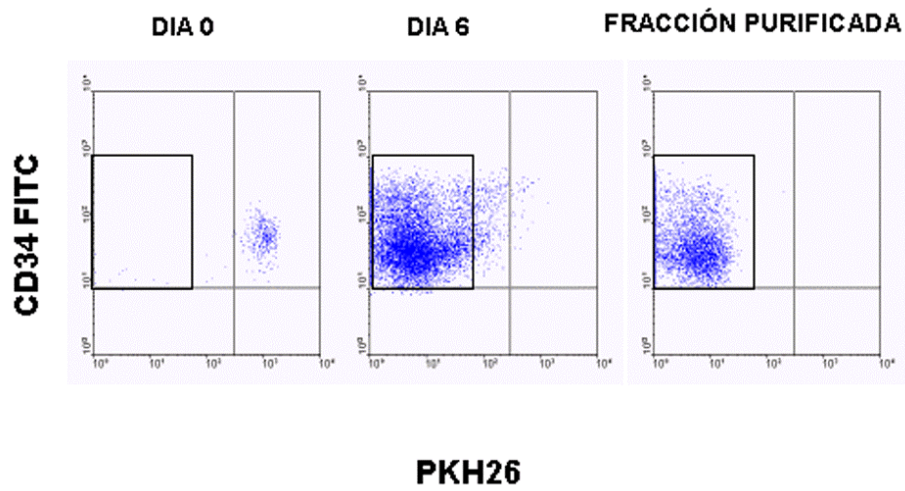
**Tabla 3. Porcentaje de células nucleadas totales que expresan CD34 después de cultivar durante 6 días, y porcentaje de células PKH26- entre las células CD34+.**

<b>Citocinas</b>	<b>% células CD34+</b>	<b>% células PKH26- de CD34+</b>
<b>TPO</b>	<b>70.00 ±13.50</b>	<b>68.38 ± 5.54</b>
<b>SCF</b>	<b>80.83 ± 4.90</b>	<b>65.92 ± 7.94</b>
<b>FL</b>	<b>68.00 ± 11.97</b>	<b>14.86 ± 3.34</b>
<b>TPO+SCF+FL</b>	<b>90.65 ± 3.59</b>	<b>91.98 ± 2.73</b>
<b>IL3+IL6</b>	<b>81.16 ± 5.79</b>	<b>89.81 ± 2.79</b>
<b>TPO+SCF+FL+IL3+IL6</b>	<b>81.00 ± 5.39</b>	<b>98.33 ± 0.71</b>

### **IV.-3. Selección por Separación Activada por Fluorescencia de Células Post Mitóticas PKH26 -.**

Tras 6 días de cultivo, las células se recogieron de los pocillos de expansión y se analizó la expresión de CD34 y PKH26 como se ha descrito anteriormente. Utilizando un citómetro COULTER Elite ESP, se procedió a la purificación de las células CD34 positivas y PKH26 negativo o de expresión inferior a la conseguida en el día 0. Para cada experimento el control de expresión de PKH26 fue individualizado. La fracción purificada fue cultivada para LTC-IC o trasplantada en ratón NOD/SCID . Una pequeña alícuota fue reanalizada para verificar la pureza de la separación. En todos los casos siempre fue superior al 95%. Un ejemplo de purificación se representa en la Figura 7.

**FIGURA 7: Experimento representativo de purificación de células post mitóticas PKH26 negativas. El eje X representa la expresión de PKH26 y el eje Y la expresión de CD34.**



#### **IV.-4.Frecuencia de LTC-IC en las Células Post Mitóticas.**

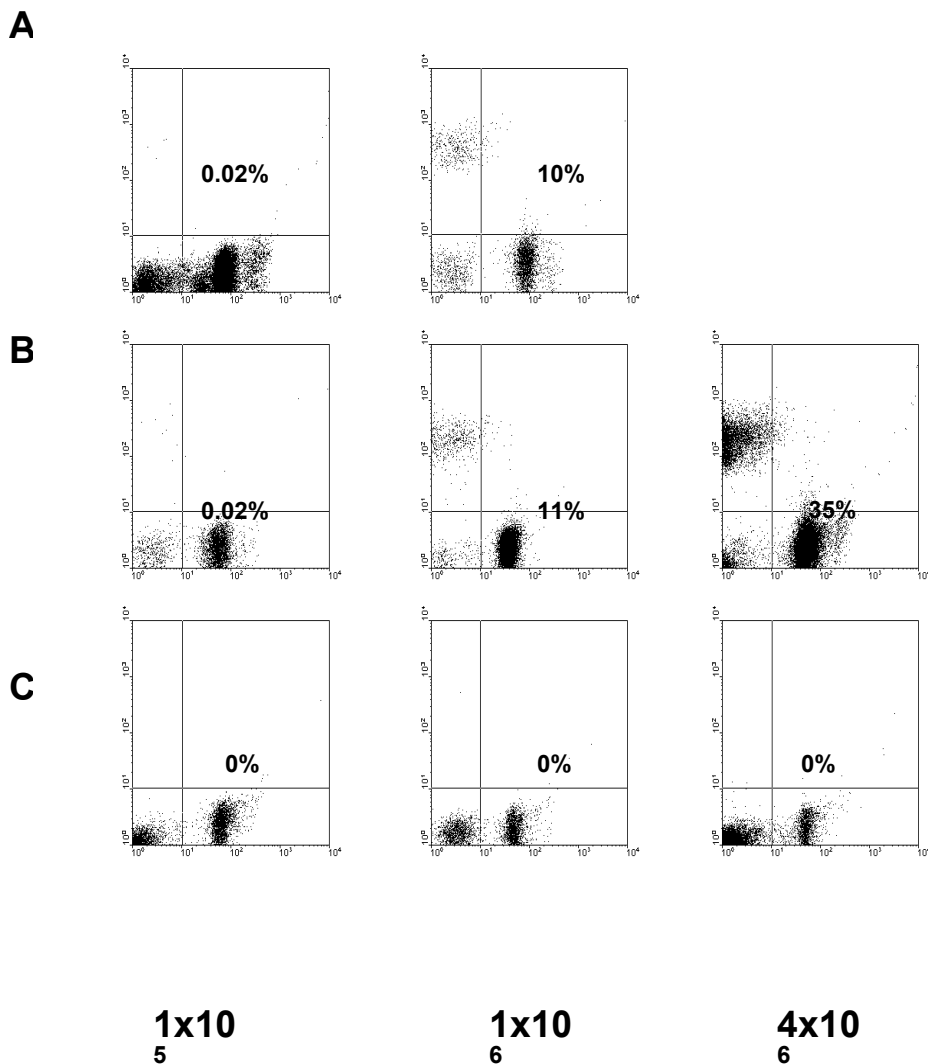
Para determinar si la retención de la expresión del fenotipo CD34 postdivisión celular, se correlaciona con la retención de capacidades funcionales de los progenitores hematopoyéticos primitivos, células CD34+PKH26- fueron seleccionadas por FACS después de cultivadas 6 días. Solo las células viables (PI bajo) se sortearon y se seleccionaron las regiones para excluir completamente las células no divididas que retienen la expresión PKH26 similar al día 0 (figura 7). Células CD34+PKH26- fueron cultivadas en LDA, como se describe en *Material y Métodos*, para determinar la frecuencia de LTC-IC entre estas células divididas. La frecuencia de LTC-IC en células CD34+ aisladas en fresco fue de  $0.37 \pm 0.13$  % (media  $\pm$  SEM de tres experimentos separados); después del cultivo con TPO+SCF+FL y con TPO+SCF+FL+IL3+IL6, las frecuencias de LTC-IC en células CD34+PKH26- fueron de  $4.73 \pm 1.08$  % y  $1.59 \pm 0.58$ , respectivamente. Por consiguiente, la frecuencia experimentó un incremento ( $\Delta$ ) con respecto a los valores de células CD34+ en fresco de  $12.08 \pm 3.4$  veces (media  $\pm$  SEM) después del cultivo con TPO+SCF+FL y  $4.3 \pm 1.6$  veces (media  $\pm$  SEM) en células cultivadas con TPO+SCF+FL+IL3+IL6.

#### **IV.-5.Prendimiento en Ratones NOD/SCID de Células CD34+ PKH26- Generadas de Novo en los Cultivos de Expansión.**

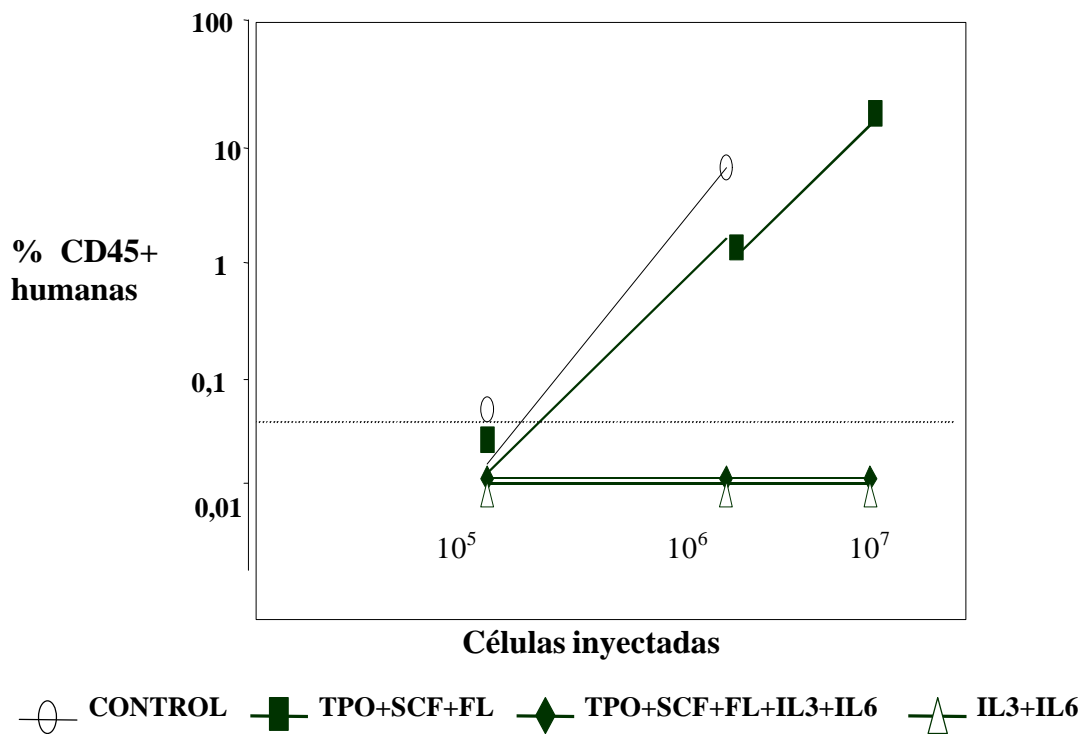
Para investigar si la expansión de células CD34+ resulta en la generación de células post mitóticas, que posean propiedades funcionales de las SC primitivas, se seleccionaron mediante FACS células CD34+PKH26- de cultivos y se trasplantaron en ratones NOD/SCID radiados subletalmente. Se inyectaron grupos de animales con  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células CD34+ PKH26- de cultivos con TPO+SCF+FL, así como de cultivos con TPO+SCF+FL+IL3+IL6. Se trasplantaron las dosis de  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células CD34+ no cultivadas de las muestras iniciales de SCSP seleccionadas positivamente, a grupos de ratones control, que mostraron unos niveles de prendimiento de  $0.05 \pm 0.01$  % y  $7.2 \pm 4.6$  % respectivamente. La figura 8 muestra la valoración del prendimiento humano en un experimento representativo de cada grupo de ratones trasplantado con células expandidas in vitro. El nivel de prendimiento de cada grupo de ratones se muestra en la figura 9.



**FIGURA 8: Niveles de quimerismo humano en ratones NOD/SCID tras inyección de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$  células CD34+ humanas. A representa células no expandidas, B células CD34+ expandidas con combinación de TPO,SCF,FL y C células expandidas con combinación de TPO,SCF,Fl,IL3 y IL6. El efecto deletéreo de I13-IL6 sobre la capacidad de repoblación en ratones inmunodeficientes, queda de manifiesto en la nula representación de eventos CD45 humanos a cualquier dosis de células infundidas.**



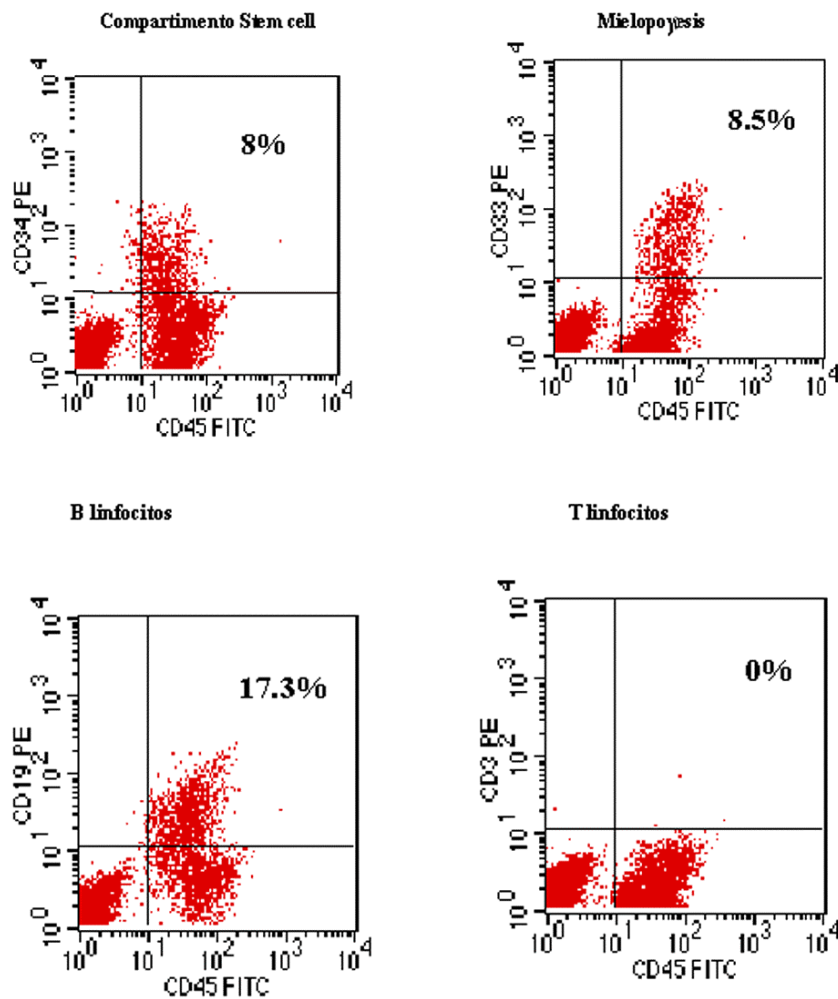
**FIGURA 9: Representación del nivel de quimerismo humano tras la inyección de células CD34 positivas, no manipuladas, expandidas con 3 y 5 citocinas, y expandidas sólo con IL3+IL6. Para células no manipuladas o expandidas con TPO+SCF+FL, el nivel de quimerismo es dosis dependiente de forma lineal.**



Se trasplantaron un total de 59 ratones, 14 de ellos con células no cultivadas como grupo control. El número de animales positivos y el nivel de prendimiento en los ratones trasplantados con células cultivadas con TPO+SCF+FL fueron los siguientes: 2 de 5 ratones trasplantados con  $1 \times 10^5$  células mostraron  $0,02 \pm 0,01\%$  de células humanas; 7 de 9 trasplantados con  $1 \times 10^6$  células y 3 de 3 trasplantados con  $4 \times 10^6$  células mostraron una media de quimerismo humano de  $1,5 \pm 0,4$  y  $17,5 \pm 7,4$  respectivamente. Por el contrario, ningún animal entre 22 trasplantados con células cultivadas con TPO+SCF+FL+IL3+IL6 (7 con  $1 \times 10^5$  células, 8 con  $1 \times 10^6$  y 7 con  $4 \times 10^6$ ) mostraron quimerismo humano. De forma similar las células generadas de novo en cultivos con IL3+IL6 fueron incapaces de injertar en 7 ratones trasplantados con las mismas dosis celulares crecientes.

Aquellos ratones trasplantados con células expandidas que mostraron más de 1 % de células humanas en su medula ósea fueron analizados para determinar la presencia de prendimiento humano multilineal. Como puede verse en la figura 10, mostrando el análisis de un ratón representativo, todos los ratones prendidos mostraron un prendimiento multilineal con la sola excepción de linfocitos T que no se encontró en ninguno de los ratones injertados. Se encontraron células CD34+ humanas, CD33+ y CD19+ en la medula ósea de los ratones trasplantados a los valores medios respectivamente de 0.52 %, 3.33 %, y 1 % para  $1 \times 10^6$  de células CD34+PKH26- inyectadas, y de 8 %, 8.5 % y 17.3 % para  $4 \times 10^6$  de células CD34+PKH26- inyectadas. Igualmente, se detectaron niveles más bajos de prendimiento de las distintas líneas celulares en bazo de los ratones, con medias de CD34, CD33 y CD19 humanas de 0.06 %, 0.15 %, 0.13 % respectivamente para  $1 \times 10^6$  células CD34+PKH26-, y de 1.22 %, 4.5 %, y 4.5 % respectivamente para  $4 \times 10^6$  células CD34+PKH26- inyectadas.

**10: Análisis de quimerismo línea específico en ratones injertados con células CD34+ humanas expandidas con TPO+SCF+FL. El eje X representa expresión de CD45 ( panleucocitario conjugado con FITC) y el eje Y representa la expresión de CD34,CD33,CD19 Y CD3 para la determinación de prendimiento de precursores hematopoyéticos, mieloides, linfoides B y linfoides T, respectivamente. En ningún caso se detectó presencia de población linfocitaria T.**



#### **IV.-6.Análisis del Ciclo Celular e Inmunofenotipo de las Células**

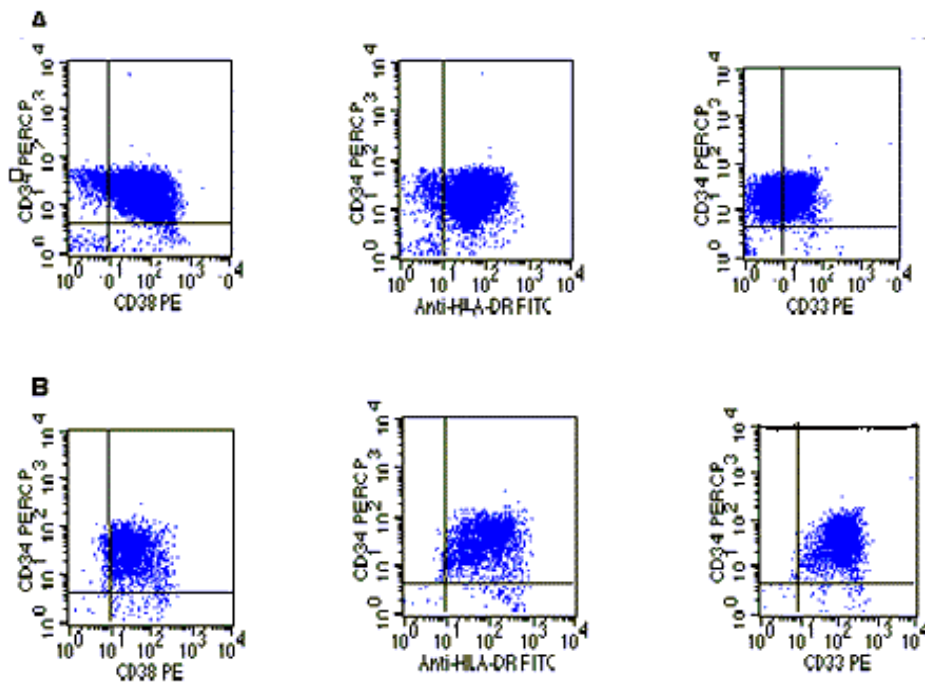
##### **Expandidas PKH26- .**

También hemos estudiado las expresiones de CD38, CD33 y HLA-DR para células CD34+, antes y después de 6 días de exposición a citocinas. Como puede verse en la tabla 2, a pesar del mantenimiento de la positividad de CD34 en las células cultivadas, las células con fenotipos primitivos carentes CD38, CD33 y HLA-DR disminuyen después de la exposición a citocinas, independientemente de la combinación de citocinas que estimulara a las células. Con respecto a la distribución del ciclo celular, el 99 % de células CD34+ en el día 0 estaban G0 / G1; después de 6 días de cultivo con SCF+TPO+FL, el 69.12 % permanecían en G0 / G1 y la adición de IL3+IL6 a la combinación de SCF+TPO+FL no produjo diferencias significativas en el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular, con 64.33 % en G0 / G1.

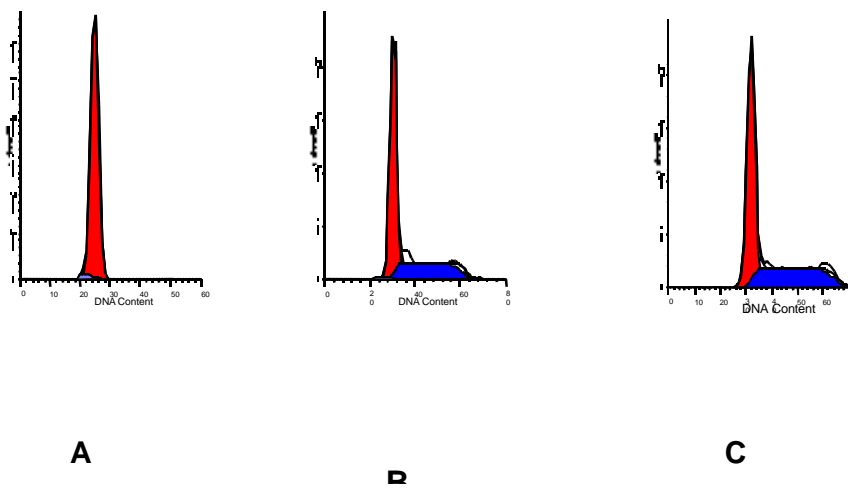
**Tabla 4. Inmunofenotipo y estado del ciclo celular de las células CD34+, después de cultivadas 6 días con TPO+SCF+FL solamente y con la adición posterior de IL3+IL6.**

	<b>%CD38-</b>	<b>% CD33-</b>	<b>%HLA DR-</b>	<b>% G0-G1</b>
<b>Día 0</b>	1.47 ± 0.41	40 ± 5	3.59 ± 2.62	99.15± 0.05
<b>TPO+SCF+FL</b>	0.97 ± 0.09	1.47 ± 0.87	0.91 ± 0.59	69.12± 4.12
<b>TPO+SCF+FL+ IL3+IL6</b>	1.1 ± 0.4	1.04 ± 0.6	0.75 ± 0.04	64.33± 3.33

**FIGURA 11: Histogramas de análisis de inmuofenotipo de las células CD34 precultivo (A) expandidas tras 6 días de cultivo con TPO+SCF+FL (B). El eje X representa la expresión de CD38,CD33, y HLADR medida con anticuerpo marcado con Fluoresceína, y el eje Y representa la expresión de CD34 en PerCP.**



**FIGURA 12: Histogramas de análisis de ciclo celular mediante permeabilización con metanol e Yoduro Propidio las células CD34 precultivo (A) expandidas tras 6 días de cultivo con TPO+SCF+FL (B) y con TPO+ACF+FL+IL3+IL6 (C). Sombreado en rojo células en fase Go/G1 y en azul células en fase S.**





## **V.- DISCUSIÓN.**

## **V.-DISCUSIÓN.**

Los resultados del presente estudio demuestran en primer lugar la capacidad de expandir in vitro progenitores hematopoyéticos procedentes de sangre periférica movilizada en cultivos a corto plazo, libres de suero y sin estroma, utilizando combinaciones de citocinas que actúan sobre células en fases tempranas de la hematopoyesis, y en segundo lugar, el mantenimiento de la capacidad de prendimiento de las células expandidas con estos factores en ratones NOD/SCID, así como la pérdida de esta capacidad de prendimiento con la adición de IL3+IL6 a los cultivos de expansión.

El empleo de un método de marcaje que nos permite separar las células postmitóticas, nos ha posibilitado la determinación de la capacidad funcional

únicamente de las células generadas de novo en los cultivos evitando la posible contribución de células quiescentes que no han experimentado división celular a las características funcionales de las células cultivadas.

Discutiremos separadamente los resultados en cuanto a la cinética de expansión celular, de progenitores codificados y de LTC-IC, y a continuación la capacidad de injerto de las células generadas en los cultivos en ratones NOD/SCID como expresión del mantenimiento de la actividad de stem cells más primitivas durante el procedimiento de expansión.

#### **V.-1. Sobre la Cinética de Expansión Celular y de Progenitores Hematopoyéticos en Cultivo.**

Aunque la posibilidad de expandir in vitro progenitores hematopoyéticos de SP es conocida desde el principio de los años 90, la totalidad de los estudios publicados son eminentemente clínicos, y hasta el presente momento no existen estudios experimentales sobre los aspectos biológicos del proceso de expansión in vitro de esta fuente de stem cells, a diferencia de médula ósea o de cordón umbilical en los que estos aspectos han sido estudiados exhaustivamente. Sin embargo, los resultados publicados con expansión de médula ósea (MO) o de SCU no pueden ser automáticamente extrapolados a la sangre periférica movilizada, ya que esta fuente de SC difiere sustancialmente de otras fuentes tanto cuantitativa como cualitativamente: en primer lugar la frecuencia de SC primitivas es menor en sangre periférica movilizada que en SCU o en MO<sup>107</sup>, y en segundo lugar, y más importante, las células CD34+ de SP han sido previamente expuestas a los efectos de los factores de crecimiento utilizados in

vivo para la movilización, y por tanto pueden haber sufrido de antemano una estimulación máxima que comprometa su capacidad de ser expandidas in vitro. Nuestros resultados no confirman esta hipótesis, sino que por el contrario demuestran una capacidad de expansión in vitro de hasta 18 veces de las stem cells de sangre periférica (SCSP) en presencia de TPO+SCF+FL+IL3+IL6, con mantenimiento del marcador CD34 propio de progenitores hematopoyéticos.

Por otra parte, nuestros resultados en cuanto a expansión celular total y de CD34+ permiten afirmar que la combinación de diferentes citocinas en los cultivos no tiene un valor meramente aditivo de los efectos de cada una de ellas, sino que se ejerce una acción sinérgica. De hecho mientras que en los cultivos estimulados con cada una de las citocinas de manera individual no se produce un incremento significativo de la celularidad sobre valores basales, cualquiera de las combinaciones estudiadas es capaz de conducir a una expansión numérica neta significativa tanto de las células nucleadas totales como de las CD34+ y de los progenitores tipo CFC. Resultados similares han sido publicados con células de médula ósea por Luens y col.<sup>108</sup>, que encontraron que mientras que TPO,SCF y FL de manera individual eran incapaces de producir expansión celular, las combinaciones de cualquiera de dos de ellas producían un ligero incremento (1.7 veces) en el número total de células y la combinación de las tres citocinas inducía una expansión de 3.4 veces en la celularidad global

Además del hecho, que parece evidente, de la necesidad de combinar varias citocinas para conseguir una expansión celular significativa, parece ser de gran importancia cuál sea la combinación de citocinas empleada en lo que se refiere a la expansión neta del número total de células, del número de progenitores CD34+ y del número de progenitores codificados de línea, identificados como CFCs; en nuestro estudio, todos ellos experimentan una expansión significativamente mayor con la

adición de IL3+IL6 a la combinación de TPO+SCF+FL. Estos resultados están en la línea de los publicados por Petzer y col.<sup>74</sup> en los que IL3 constituía el único factor de crecimiento entre los seis testados que era capaz de estimular un incremento neto de las CFCs y además mostraba un fuerte efecto sinérgico con SCF y FL en la expansión de este tipo de progenitores; por el contrario, los factores de crecimiento que actúan sólo sobre las fases más tempranas de la hematopoyesis (TPO, SCF y FL) eran capaces de promover únicamente una expansión de progenitores más primitivos tipo LTC-IC, pero no una amplificación de CFCs que requería de la adición de IL3, IL6 o G-CSF. Considerados conjuntamente, estos resultados y los nuestros propios, confirman las diferencias entre los mecanismos de acción de ciertas citocinas que permiten el mantenimiento de la función de las LTC-ICs (con o sin división celular) y aquellas otras que conllevan la pérdida de esta función a cambio de la adquisición por parte de las células de propiedades que permiten la formación directa de colonias en medio semisólido. La identificación de estos efectos diferenciales de las citocinas sobre los progenitores de sangre periférica es importante en orden al desarrollo de nuevos protocolos de aplicación al trasplante clínico con células expandidas, dirigidos tanto a la amplificación de progenitores codificados de línea para acortar el periodo de pancitopenia, como al mantenimiento de células hematopoyéticas primitivas con capacidad de injerto a largo plazo.

En lo que se refiere al contenido de LTC-IC en las células expandidas, nuestros resultados demuestran una amplificación de 12 veces en el número de este tipo de progenitores en cultivos estimulados con TPO+SCF+FL y de 4 veces en aquellos establecidos en presencia de TPO+SCF+FL+IL3+IL6. La expansión de LTC-ICs a partir de otras fuentes de progenitores hematopoyéticos como MO o SCU ha sido descrita por varios autores y en diferentes condiciones de cultivo. Así Koller y cols. han

descrito expansión de LTC-ICs (media 7.5 veces) a partir de células mononucleadas totales de MO utilizando un sistema de cultivo en perfusión continua durante 14 días<sup>18</sup>; de manera similar, Petzer y cols. han logrado expansión de 30 veces de LTC-ICs en un periodo de 10 días partiendo de una población de progenitores hematopoyéticos medulares altamente purificada y empleando una combinación de seis citocinas que incluye TPO, SCF y FL<sup>109</sup>. En este estudio, cuando los cultivos son estimulados con cada una de las citocinas de forma individual, sólo TPO y FL son capaces de inducir un incremento neto de LTC-ICs a partir de células CD34+CD38- de MO, lo que subraya la importancia del efecto individual de cada una de las citocinas así como la potenciación sinérgica de este efecto en algunas de sus combinaciones.

Junto con las citocinas empleadas y el sistema de cultivo utilizado, otro factor definitorio de la capacidad de expandir in vitro LTC-ICs es la fuente de SC. Prueba de ello es un interesante trabajo publicado por Traycoff y cols.<sup>110</sup>, en el que empleando una misma combinación de citocinas e idénticas condiciones de cultivo, se consigue expandir las LTC-ICs de MO (+146% sobre valores basales), mientras que el número de LTC-ICs de SCU experimenta un descenso neto de -70% sobre valores basales; una posible explicación a este fenómeno es la elevada respuesta proliferativa de las células CD34+ de SCU y su capacidad de abandonar las fases G<sub>0</sub> / G<sub>1</sub> del ciclo celular más rápidamente que las células CD34+ de MO; esta explicación sugiere que el número de divisiones experimentadas en el cultivo puede ser un parámetro crítico en el mantenimiento y/o expansión de las LTC-ICs. De acuerdo con este argumento, la menor expansión de LTC-ICs observada en nuestros experimentos cuando se emplea la combinación de TPO+SCF+FL+IL3+IL6 en comparación con los cultivos estimulados con TPO+SCF+FL podría ser causada simplemente por un mayor número de divisiones celulares en los cultivos generados con la combinación de cinco citocinas, de la que es

buena prueba la mayor expansión numérica y de CD34+ observada en los mismos. Alternativamente, esto puede ser explicado por el propio efecto biológico de IL3 e IL6 cuando se añaden a la combinación básica de las tres citocinas “early acting” : la coincidencia de una menor expansión de LTC-ICs, junto con una más marcada expansión de CFCs con la combinación de las cinco citocinas, sugiere un efecto diferenciador de IL3 y/o IL6 sobre los progenitores primitivos LTC-IC, aún no comprometidos, hacia la línea mieloide o mielomonocítica. Resultados similares han sido publicados por Luens y col.<sup>108</sup>, que demostraron que células postmitóticas de médula ósea obtenidas de cultivos estimulados con TPO+SCF+FL mantenían una alta frecuencia de “Cobblestone-area forming cells” (CAFC), un progenitor muy similar a LTC-IC en la jerarquía de línea hematopoyética, mientras que la frecuencia de CAFC disminuía de forma sustancial en células postmitóticas procedentes de cultivos estimulados con IL3+IL6+ ”Leukemia Inhibitory Factor” (LIF). Aunque en este estudio no hemos determinado separadamente la frecuencia de LTC-IC en nuestros cultivos con IL3+IL6, la adición de estas dos citocinas a la combinación de TPO+SCF+FL reduce la expansión de LTC-IC inducida por las mismas, lo cual es consistente con la ya mencionada capacidad de IL3 de inducir diferenciación de los progenitores primitivos<sup>111,112</sup> así como con el conocido efecto de IL6 de promover una elevada amplificación de CFCs<sup>74</sup>.

Los resultados de nuestros estudios sobre la cinética de la división celular en los cultivos revelan nuevamente un efecto sinérgico de las combinaciones de citocinas en la inducción de la división celular. En presencia de una única citocina, el porcentaje de células que se dividen alcanza un 68% y 65% para cultivos estimulados con TPO y SCF respectivamente, y tan sólo un 14% de las células son inducidas a la división en los cultivos con FL; en evidente contraste, la adición de estas tres citocinas en combinación

da lugar a un 91% de células que han experimentado división tras los seis días de cultivo. Este efecto sinérgico es aún más marcado con la adición de IL3+IL6, de tal manera que en los cultivos estimulados con la combinación de las cinco citocinas un 98% de las células CD34+ postmitóticas basados en la pérdida de la fluorescencia debida a PKH26. Experimentos similares llevados a cabo por Luens y cols.<sup>108</sup> sobre células CD34+ de médula ósea humana revelaron idéntico efecto sinérgico de las citocinas estudiadas en la estimulación de la división celular: en presencia de FL sólo un 12% de células experimentaba división mientras que la adición de SCF+FL y de TPO+SCF+FL estimulaba la división de 60% y 94% de las células respectivamente.

Tanto en nuestros experimentos como en los de Luens y col. es importante subrayar el hecho de que la división celular no lleva aparejada una gran pérdida del marcador CD34, particularmente en los cultivos estimulados con las combinaciones de citocinas (90% y 81% de la celularidad global recuperada de los cultivos con TPO+SCF+FL y TPO+SCF+FL+IL3+IL6 respectivamente mantiene el marcador CD34), lo cual implica que, al menos desde un punto de vista inmunofenotípico, la división celular inducida por estas citocinas no conlleva un importante grado de diferenciación celular.

Otros autores han publicado resultados en esta misma línea de evidencia utilizando diversas combinaciones de citocinas en cultivo de progenitores hematopoyéticos tanto de médula ósea como de cordón umbilical<sup>113,114,73,87</sup>. Por tanto podemos afirmar que nuestros resultados confirman en progenitores hematopoyéticos de sangre periférica el efecto de ciertos factores de crecimiento, previamente demostrado en progenitores hematopoyéticos de otras fuentes, consistente en el estímulo de la división celular de las Stem Cells promoviendo la salida de G<sub>0</sub> de las células quiescentes más primitivas<sup>115,116</sup>. De hecho en el análisis de ciclo celular llevado a cabo



en nuestros experimentos, observamos que 99% de las células CD34+ de sangre periférica antes del cultivo residen en las fases  $G_0 / G_1$  del ciclo, mientras que este porcentaje desciende hasta 69% y 64% después de la exposición a TPO+SCF+FL y TPO+SCF+FL+IL3+IL6 respectivamente.

## **V.-2. Sobre la Capacidad de Injerto de las Células Generadas de Novo in Vitro en Ratones NOD/SCID.**

En la última fase de desarrollo del presente estudio nos propusimos analizar la capacidad funcional de sostenimiento de la hematopoyesis a largo término de las células generadas de novo en los cultivos de expansión. Si bien la stem cell humana no puede ser definida de una manera inequívoca a partir de sus características morfológicas ni inmunofenotípicas, sí que puede ser definida por sus características funcionales de autorrenovación y sostenimiento de la hematopoyesis, lo que precisa necesariamente de ensayos in vivo.

El modelo de trasplante xenogénico en ratones NOD/SCID se ha reputado en los últimos años como capaz de testar la capacidad funcional de un determinado inóculo celular así como su contenido en auténticas SC. De esta forma se ha definido la llamada SRC como una célula diferente funcional y fenotípicamente, y mucho más inmadura, que las LTC-IC las cuales constituyen las células hematopoyéticas humanas más antiguas jerárquicamente que pueden ser testadas in vitro. La importancia de estos hallazgos recientes hace que en la actualidad no pueda afirmarse la caracterización de un determinado inóculo celular como verdaderamente funcional sin testar su contenido en SRCs.

Son numerosos los trabajos en los que se estudia el contenido de SRCs en diversos tejidos hematopoyéticos humanos así como en sangre periférica movilizada<sup>117,101,102</sup>. Sin embargo el contenido en SRCs de células sometidas a expansión in vitro está más escasamente explorado y con resultados hasta cierto punto contradictorios. Así mientras que algunos autores consiguen prendimiento de células expandidas de MO o de SCU en ratones NOD/SCID<sup>103</sup> otros trabajos encuentran una pérdida de la capacidad de repoblación de las stem cells debida a la expansión in vitro<sup>104</sup>.

Hasta el límite de nuestros conocimientos no existen trabajos publicados en los que se analice la capacidad funcional de prendimiento, y por tanto el contenido de SRC en células expandidas de sangre periférica. Los resultados del presente estudio demuestran el mantenimiento de SRCs en células CD34+ de sangre periférica generadas *de novo* in vitro en presencia de TPO+SCF+FL, así como la pérdida de esta capacidad de prendimiento en ratones NOD/SCID tras la adición de IL3 e IL6 a los cultivos.

Nuestros resultados permiten afirmar que, con nuestro sistema de expansión, consistente en cultivos de corta duración (seis días) y combinación de citocinas “early acting” (TPO+SCF+FL), las SRCs procedentes de sangre periférica se incrementan ligeramente o al menos se mantienen. De hecho, entre los 17 ratones trasplantados con células expandidas en presencia de estas tres citocinas hemos encontrado hematopoyesis humana en 12 de ellos, mientras que en los 14 controles trasplantados con células “frescas” no manipuladas se pudo detectar en 10 de ellos. En contraste, ningún ratón entre los 22 trasplantados con células PKH26- cultivadas con TPO+SCF+FL+IL3+IL6 mostraron celularidad humana en su médula ósea. De forma similar, las células generadas de novo en cultivos establecidos en presencia de IL3+IL6

exclusivamente, no demostraron capacidad de injerto de la hematopoyesis humana en ninguno de los siete ratones en los que fueron inyectadas.

Clásicamente, la capacidad de repoblación a largo plazo de la hematopoyesis ha sido atribuida de forma exclusiva a SC muy primitivas que forman parte del conjunto de células hematopoyéticas no responsivas a citocinas y que por tanto permanecen quiescentes tras cultivo *in vitro*<sup>118-120</sup>. Sin embargo, muy recientemente Glimm y Eaves<sup>121</sup> han demostrado en un modelo de cultivo a corto plazo de células CD34+ de SCU e hígado fetal, que la mayoría de las SC hematopoyéticas trasplantables han completado al menos tres ciclos celulares completos *in vitro*, lo que demuestra de forma inequívoca que la actividad “*stem cell*”, medida como la capacidad de prendimiento multilineal en ratones NOD/SCID, no se pierde inevitable o irreversiblemente cuando las células son activadas mitóticamente mediante factores de crecimiento solubles.

Nuestros resultados, en el presente estudio, demostrando que las células postmitóticas CD34+ PKH26- son capaces de prendimiento linfomieloide en los ratones NOD/SCID, proporcionan una demostración igualmente inequívoca del mantenimiento de la capacidad SRC tras la división celular en SCSP tal como ha sido demostrado por Glimm y Eaves en SCU e hígado fetal. Estos hallazgos parecen en abierta contradicción con los publicados por otros autores<sup>110,119</sup> demostrando, en primer lugar, una rápida pérdida de la actividad “*stem cell*” en células humanas y murinas en las primeras horas de exposición a combinaciones de citocinas similares a las empleadas por nosotros, y, en segundo lugar, una retención de esa actividad “*stem cell*” en las células que permanecen PKH26+ y que por tanto se han mantenido quiescentes en los cultivos. En nuestros experimentos, sólo se han trasplantado a ratones NOD/SCID células postmitóticas, es decir PKH26-, lo que no excluye la posibilidad de que en la

fracción PKH26+ persista una baja frecuencia de células quiescentes que mantengan capacidad de prendimiento tal como demuestran los trabajos de Traycoff y cols.<sup>110,119</sup>.

Respecto a la discrepancia entre nuestros resultados y los de estos trabajos en cuanto a la pérdida de capacidad “*stem cell*” detectada en el modelo de Traycoff puede haber dos posibles explicaciones: en primer lugar aunque las combinaciones de citocinas son similares, nuestro modelo de cultivo y el de Glimm y Eaves, a diferencia del de Traycoff y cols. incluye FL, que se ha demostrado como un factor necesario para maximizar la mitogénesis de SC primitivas con mantenimiento de su capacidad funcional original. En segundo lugar, la resolución de PKH26, utilizado por Traycoff en el marcaje celular, es menor, por lo que puede ser difícil distinguir células quiescentes de postmitóticas.

En contraste con nuestros resultados en ratones trasplantados con células expandidas en presencia de TPO+SCF+FL, el grupo de ratones que recibieron células cultivadas con TPO+SCF+FL+IL3+IL6, no mostraron quimerismo humano. Dos razones pueden ser invocadas para explicar este hecho. En primer lugar, como ha sido demostrado<sup>121</sup>, la frecuencia de SRCs disminuye en poblaciones celulares postmitóticas que ha experimentado más de tres divisiones *in vitro*; teniendo en cuenta que el número total de células generadas en cultivo con cinco citocinas es muy superior al generado en los cultivos con tres citocinas, es probable que el número de divisiones celulares en los primeros sea también superior, y posiblemente en exceso de tres divisiones por célula. En segundo lugar, el proceso de prendimiento requiere tanto de la presencia de SC inmaduras que mantengan capacidad funcional de repoblación, como de la expresión de ciertas moléculas de adhesión que han sido recientemente identificadas como esenciales para la migración y el anidamiento celular<sup>122,123</sup>; en el presente trabajo, no hemos

estudiado la presencia de tales moléculas de adhesión tras los cultivos, y por tanto, la posibilidad de que IL3, IL6 o ambas afecten a su expresión, es una cuestión abierta.

Por otra parte, el efecto de IL3 sobre la capacidad de prendimiento de SC primitivas, continúa siendo materia de controversia<sup>124</sup>. Es conocido que IL3 produce no sólo división de progenitores hematopoyéticos muy primitivos, sino también diferenciación<sup>111,112</sup>, lo que puede causar detrimento del mantenimiento de la capacidad funcional de las SC primitivas. En contraste otros autores han publicado resultados demostrando que IL3 e IL6 no comprometen la capacidad de prendimiento de SC primitivas<sup>125,126</sup>. Conneally y cols.<sup>125</sup> han demostrado no sólo mantenimiento, sino también una modesta expansión (dos veces) de las SRC tras la incubación de células CD34+CD38- de cordón umbilical en presencia de SCF+FL+IL3+IL6+GM-CSF. De forma similar, Piacibello y cols. han demostrado una expansión masiva (hasta setenta veces) de SRC de cordón umbilical cultivadas a largo plazo, hasta 9-10 semanas, en presencia de FL+MGDF+SCF+IL6. Las diferencias entre el origen de las células (SCU en estos estudios y sangre periférica en nuestros experimentos) así como en las condiciones de cultivo (a corto plazo y libre de suero en nuestro estudio y a largo plazo y con adición de suero bovino fetal en el de Piacibello), pueden explicar estos resultados aparentemente contradictorios.

Aunque algunos estudios clínicos muy recientes han comunicado que células progenitoras de sangre periférica expandidas in vitro acortan el tiempo de prendimiento en comparación con controles históricos<sup>127-129</sup>, el mantenimiento o no de células primitivas con capacidad de repoblación a largo plazo no se ha determinado de forma directa en los mencionados estudios, sino que solamente se deduce indirectamente a partir del mantenimiento a largo plazo de la hematopoyesis en pacientes trasplantados con células expandidas exclusivamente. En este sentido, nuestros resultados pueden

constituir un paso importante en el desarrollo de nuevos protocolos de aplicación del trasplante con células expandidas de sangre periférica en clínica humana: hemos demostrado que, en nuestras condiciones de cultivo, la combinación de TPO+SCF+FL produce una modesta expansión de células CD34+ totales así como de progenitores codificados de línea, junto con un mantenimiento de las SRCs, mientras que la adición de IL3+IL6 incrementa la expansión de células CD34+ y progenitores codificados a costa de una pérdida de la capacidad SRC.

Estos hallazgos son de gran interés puesto que proporcionan las evidencias experimentales necesarias para el desarrollo de protocolos de expansión en clínica que deben ser adaptados según la necesidad concreta bien de un mayor número de progenitores codificados en el injerto o bien del mantenimiento de la capacidad de repoblación a largo plazo de los injertos expandidos. La posibilidad de infundir simultáneamente a los pacientes células expandidas de forma separada, con y sin la adición de IL3+IL6, en orden a conseguir tanto una gran cantidad de progenitores codificados para acortar el periodo de pancitopenia postrasplante como suficiente cantidad de SRC para asegurar el injerto a largo plazo, constituye una interesante vía de investigación clínica que sin duda deberá ser explorada en el futuro inmediato.

## **VI.- CONCLUSIONES.**

## VI.-CONCLUSIONES

1<sup>a</sup>- El cultivo de SCSP en presencia de IL3 + IL6, TPO + SCF + FL y TPO + SCF + FL + IL3 + IL6 produce una expansión significativa de células nucleadas totales, células CD34+ y CFCs. Esta expansión es significativamente superior con combinación de las cinco citocinas testadas.

2<sup>a</sup>- En cultivos iniciados con FL como citocina única sólo un pequeño porcentaje de células CD34+ de sangre periférica experimenta división celular, mientras que TPO y SCF de manera individual promueven la división celular de 68% y 65% de las SCSP respectivamente.

3<sup>a</sup>- TPO, SCF y FL actúan de manera sinérgica in vitro en la estimulación de la división celular de SCSP que se produce en un 91% de las células CD34+. Este efecto sinérgico se ve ligeramente incrementado con la adición de IL3 + IL6.

4<sup>a</sup>- La frecuencia de progenitores LTC-IC en células post-mitóticas CD34+PKH26- de SP se incrementa un promedio de 12 veces en los cultivos con TPO + SCF + FL y de 4 veces en aquellos establecidos en presencia de TPO + SCF + FL + IL3 + IL6.

5<sup>a</sup>- Las características inmunofenotípicas de células CD34+ generadas de novo in vitro son similares tras cultivo con TPO + SCF + FL y TPO + SCF + FL + IL3 + IL6, mostrando una disminución porcentual de los fenotipos más primitivos en relación a las células antes de cultivo, independientemente de las citocinas utilizadas.

6<sup>a</sup>- El porcentaje de células en fase G0/G1 del ciclo celular disminuye significativamente tras el cultivo in vitro de CD34+ de SP, con respecto a la situación basal. Esta disminución es similar en cultivos con TPO + SCF + FL y en aquellos en los que además se añadió IL3 + IL6.



7<sup>a</sup>- Las células CD34<sup>+</sup> generadas de novo en cultivos con TPO + SCF + FL mantienen la capacidad de prendimiento en ratones NOD/SCID a niveles similares a células no expandidas. El prendimiento humano es multilineal como se demuestra por la presencia de células progenitoras mieloides y linfoides B en médula ósea y bazo de los ratones.

8<sup>a</sup>- La adición de IL3 + IL6 a la combinación de TPO + SCF + FL inhibe completamente la capacidad de prendimiento de las células generadas de novo en los cultivos.

## **VII.- BIBLIOGRAFÍA.**

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966; **44**:287-293.
2. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. *J Cell Physiol* 1977; **91**:335-344.
3. Gartner S, Kaplan HS. Long term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **74**:4756-4759.
4. Sutherland HJ, Hogge DE, Cook D, Eaves CJ. Alternative mechanisms with and without steel factor support primitive human hematopoiesis. *Blood* 1993; **81**:1465-1470.
5. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993; **178**:787-791.
6. Lemishka I, Raulet DH, Mulligan RC. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 1986; **45**:917-927.
7. Abkowitz JL, Persik MT, Shelton GH *et al*. Behavior of hematopoietic stem cells in a large animal. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; **92**:2031-2039.
8. Haylock DN, To LB, Dowse TL *et al*. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood* 1992; **80**:1405-1412.
9. Srour EG, Brandt JE, Briddell RA *et al*. Long-term generation and expansion of human primitive hematopoietic progenitor cells *in vitro*. *Blood* 1993; **81**:661-669.
10. Coutinho LH, Will A, Radford J *et al*. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (CSF), human granulocyte macrophage- CSF, and gibbon interleukin-3 on hematopoiesis in human long-term bone marrow culture. *Blood* 1990; **75**:2118-2129.

11. Brugger W, Mocklin W, Heimfeld S *et al.* Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1b (IL-1b), IL-6, IL-3, interferon-g, and erythropoietin. *Blood* 1993; **81**:2579-2584.
12. Henschler R, Brugger w, Luft T *et al.* Maintenance of transplantation potential in ex vivo expanded CD34+ selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood* 1994; **84**: 2898-2903.
13. Caldwell J, Locey B, Palsson BO, Emerson SG. The influence of culture perfusion conditions on normal human bone marrow stromal cell metabolism. *J Cell Physiol* 1991; **147**: 344-353.
14. Caldwell J, Locey B, Clarke MF *et al.* The influence of culture conditions on genetically engineered NIH-3T3 cells. *Biotech Prog* 1991; **7**: 1-7.
15. Guba SC, Sartor CI, Gottschalk LR *et al.* Bone marrow stromal cells secrete IL-6 and GM-CSF in the absence of inflammatory stimuli: Demonstration by serum-free bioassay, ELISA, and reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Blood* 1992; **80**: 1190-1198.
16. Schwartz R, Palsson BO, Emerson SG. Rapid medium and serum exchange increases the longevity and productivity of human bone marrow cultures. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; **88**: 6760-6764.
17. Schwartz R, Emerson SG, Clarke MF *et al.* In vitro myelopoiesis stimulated by rapid medium exchange and supplementation with hematopoietic growth factors. *Blood* 1991; **78**: 3155-3161.
18. Koller MR, Emerson SG, Palsson BO. Large-scale expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion culture. *Blood* 1993; **82**: 378-384.

19. Koller MR, Palsson MA, Manchel I *et al.* LYC-IC expansion is dependent on frequent medium exchange combined with stromal and other accessory cell effects. *Blood* 1995; **86**: 1784-1793.
20. Sandstrom CE, Bender JG, Papoutsakis ET *et al.* Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1995; **86**: 958-970.
21. Zandstra PW, Eaves CJ, Cameron C *et al.* Cytokine depletion in long-term stirred suspension cultures of normal human marrow. *J Hematol* 1995; **4**: 235-241.
22. Muench MO, Firpo MT, Moore MAS. Bone marrow transplantation with interleukin-1 plus kit-ligand ex vivo expanded bone marrow accelerates hematopoietic reconstitution in mice without the loss of stem cell lineage and proliferative potential. *Blood* 1993; **81**: 3463-3473.
23. Spangrude GJ, Brooks DM, Tumas DB. Long-term repopulation of irradiated mice with limiting numbers of purified hematopoietic stem cells: In vivo expansion of stem cell phenotype but not function. *Blood* 1995; **85**: 1006-1016.
24. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hango G *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:3828-3832.
25. Broxmeyer HE, Hango G, Cooper S *et al.* Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4109-4113.
26. Broxmeyer HE, Kurtzberg J, Gluckman E *et al.* Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991; **17**: 313-329.

27. Fleischman RA, Mintz B. Development of adult bone marrow stem cells in H-2-compatible and –incompatible mouse fetuses. *J Exp Med* 1984; **159**: 731-739.
28. Lu L, Xiao M, Shen RN *et al.* Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood* 1993; **81**: 41-48.
29. Carow CE, Hangoc G, Broxmeyer HE. Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive replating capacity for secondary (CFU-GEMM): An effect enhanced by cord blood plasma. *Blood* 1993; **81**: 942-949.
30. Mayani H, Lansdorp PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood* 1994; **83**: 2410-2417.
31. Moore MAS. *Ex vivo* expansion and gene therapy using cord blood CD34+ cells. *J Hematol* 1993; **2** : 221-229.
32. Gluckman E, Devergie A, Bourdeau-Esperou H *et al.* Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; **32**: 423-429.
33. Broxmeyer HE, Srivastava A, Lu L *et al.* Cord blood transplantation: An update. *Exp Hematol* 1994; **22**: 677-683.
34. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD *et al.* 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.

35. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M *et al.* Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995; **346**:214-219.
36. Van Zant G, Rummel S, Koller MR *et al.* Expansion in bioreactors of human hematopoietic progenitor populations from cord blood and mobilized peripheral blood. *Blood Cells* 1994;**20**:482-491.
37. Xiao M, Broxmeyer HE, Horie M *et al.* Extensive proliferative capacity of single isolated CD34+ human cord blood cells in suspension culture. *Blood Cells* 1994; **20**:455-467.
38. Moore MAS, Hoskins I. Ex vivo expansion of cord blood derived stem cells and progenitors. *Blood Cells* 1994; **20**:468-481.
39. Van Epps DE, Bender J, Lee W *et al.* Harvesting, characterization and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral, and cord blood. *Blood Cells* 1994;**20**:411-423.
40. Koller MR, Bradley MS, Palsson BO. Growth factor consumption and production in perfusion cultures of human bone marrow correlates with specific cell production. *Exp Hematol* 1995; **23**:1275-1283.
41. Mayani H, Little M-T, Dragowska W *et al.* Differential effects of the hematopoietic inhibitors MIP-1<sup>a</sup>, TGF-b, and TNF-a, on cytokine-induced proliferation of subpopulations of CD34+ cells purified from cord blood and fetal liver. *Exp Hematol* 1995; **23**:422-427.
42. Spooncer E, Dexter TM. Transplantation of long term cultured bone marrow cells. *Transplantation* 1995; **35**:624- 628.

43. Chang J, Morgenstern G, Deakin D *et al.* Reconstitution of haemopoietic system with autologous marrow taken during relapse of acute myeloblastic leukaemia and grown in long-term culture. *Lancet* 1986; **1**:194-199.
44. Barnett MJ, Eaves CJ, Phillips GL *et al.* Successful autografting in chronic myeloid leukaemia after maintenance of marrow in culture. *Bone Marrow Transplan* 1989; **4**:345-349.
45. Silver SM, Adams PT, Hutchinson RJ *et al.* Phase 1 evaluation of ex vivo expanded hematopoietic cells produced by perfusion culture in autologous bone marrow transplantation (ABMT). *Blood* 1993(abstr, suppl 1); **82**:297 a.
46. Bender JG, Zimmerman T, Lee WJ *et al.* Large scale selection and expansion of CD34+ cells in PIXY321: Phase 1 / 2 clinical studies. *J Hematol* 1995; **4**:237-244.
47. Brugger W, Heimfeld S, Berenson Rj *et al.* Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 1995; **333**:283-287.
48. Schrader JW, Clark-Lewis I, Crapper RM *et al.* The panspecific hemopoietin interleukin-3: Physiology and pathology. In *Lymphokines 15; Interleukin 3: The Panspecific Hemopoietin* ( ed. J.W. Schrader ), Academic Press, San Diego, CA, 1988; pp. 281-311
49. Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C *et al.* Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; **87**:2376-2385.



50. Iscove NN, Shaw AR, and Keller G. Net increase of pluripotential hematopoietic precursors in suspension culture in response to IL-1 and IL-3. *J Immunol* 1989; **142**: 2332-2337
51. Williams D E, Eisenman J, Baird A *et al.* Identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell* 1990; **63**:167-174.
52. Crapper RM, Clark-Lewis I, and Schrader JW. The *in vivo* functions and properties of persisting cell-stimulating factor. *Immunology* 1984a ; **53**:33-42.
53. Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC *et al.* Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1987; **84**: 9035-9039.
54. Ogawa M. IL6 and haematopoietic stem cells. *Res Immunol* 1992; **143**: 749-751.
55. Okada M, Suzuki C, Takatsuki F *et al.* *In vitro* expansion of the murine pluripotent hemopoietic stem cell population in response to interleukin 3 and interleukin 6. Application to bone marrow transplantation. *Transplantation* 1989a ;**48**: 495-498.
56. Ishibashi T, Kimura H, Uchida T *et al.* Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989a ; **86**: 5953-5957.
57. Lotem J, Shabo Y, and Sachs L. Regulation of megakaryocyte development by interleukin-6. *Blood* 1989; **74**: 1545-1551.
58. Revel M. Growth regulatory functions of IL6 and antitumour effects. *Res. Immunol* 1992; **143**: 769-773.

59. Bernad A, Kopf M, Kulbacki R *et al.* Interleukin-6 is required *in vivo* for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* 1994;**1**:725-731.
60. Sieff CA, Emerson SG, Donahue R E *et al.* Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor: a multilineage hematopoietin. *Science* 1985; **230**: 1171-1173.
61. Ruef C, and Coleman DL. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev. Infect. Dis.* 1990; **12**: 41-62.
62. Lindemann A, Riedel D, Oster W *et al.* Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces interleukin-1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol.* 1988;**140**: 837-839.
63. Morrissey PJ, Bressler L, Park LS *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen presenting cells. *J Immunol.* 1987;**139** : 1113-1119.
64. Witmer-Pack MD, Olivier W, Valinsky J *et al.* Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 1987; **166** :1484-1498.
65. Santoli D, Clark SC, Kreider BL *et al.* Amplification of IL-2-driven T cell proliferation by recombinant human IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 1988; **141**: 519-526.

66. Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1991; **77**: 1131-1145.
67. Bussolini F, Ming Wang J, Defilippi P *et al.* Granulocyte and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* 1989; **337**: 471-473.
68. Ulich TR, del Castillo J, Yi ES *et al.* Hematological effects of stem cell factor in vivo and in vitro in rodents. *Blood* 1991b; **78** : 645-650.
69. Bernstein ID, Andrews RG, and Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin – cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin – cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991; **77**: 2316-2321.
70. McNiece IK, Langley KE, and Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol* 1991a; **19**: 226-231.
71. Bernad A, Varas F, Gallego JM *et al.* Ex vivo expansion and selection of retrovirally transduced bone marrow: an efficient methodology for gene-transfer to murine lympho-haemopoietic stem cells. *Br J Haematol* 1997; **87** (1): 6-17.
72. Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW *et al.* A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991; **65**: 1143-1152.

73. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E *et al.* Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/ monocytic precursors. *Blood* 1995; **86**: 1661-1670.
74. Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, and Eaves CJ. Differential cytokine effects on primitive (CD34+ CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med* 1996; **183**: 2551-2558.
75. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA *et al.* Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 1995; **3**: 147-161.
76. Freedman AR, Zhu H, Levine JD *et al.* Generation of human T lymphocytes from bone marrow CD34+ cells *in vitro*. *Nature Med* 1996; **2**: 46-51.
77. Wasserman R, Li Y-S, and Hardy RR. Differential expression of the Blk and Ret tyrosine kinases during B lineage development is dependent on Ig rearrangement. *J Immunol* 1995; **155**: 644-651.
78. Ray RJ, Paige CJ, Furlonger C *et al.* Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 1504-1510.
79. Namikawa R, Muench MO, de Vries JE and Roncarolo M-G. The FLK2/FLT3 ligand synergizes with interleukin-7 in promoting stromal-cell-independent expansion and differentiation of human fetal pro-B cells *in vitro*. *Blood* 1996; **87**: 1881-1890.

80. Yamamoto S. Mechanism of the development of thrombocytosis due to bleeding. *Acta Haematol Jpn* 1957; **20**: 163-168.
81. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythemic sera. *Acta Haematol* 1985; **20**: 350-359.
82. Kuter D J, Beeler D L, Rosenberg R D. The purification of megapoietin: A physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11104-11109.
83. De Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD *et al.* Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994; **369**: 533-538.
84. Gurney AL, Carver-moore K, de Sauvage FJ, and Moore MW. Thrombocytopenia in *c-mpl*-deficient mice. *Science* 1994; **265**: 1445-1451.
85. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N *et al.* c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 1994; **369**: 571-577.
86. Wendling F, Penciolelli JF, Charon M, Tambourin P. Factor independent erythropoietic progenitor cells in leukemia induced by the myeloproliferative leukemia virus. *Blood* 1993; **73**: 1395-1400.
87. Methia N, Louache F, Vainchenker W, Wendling F. Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene *c-mpl* specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood* 1993; **82**: 1395-1399.
88. Kobayashi M, Laver JH, Kato T *et al.* Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood* 1996; **88**: 429-436.

89. Borge OJ, Ramsfjell V, Cui L, Jacobsen S E-W. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34+ CD38- bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* 1997; **90**: 2282-2292.
90. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; **301**: 527-532.
91. Nolta JA, Hanley MB, Kohn DB. Sustained human hematopoiesis in immunodeficient mice by cotransplantation of marrow stroma expressing human interleukin-3: Analysis of gene transduction of long-lived progenitors. *Blood* 1994; **83**: 3041-3046.
92. McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H *et al*. The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 1988; **241**: 1632-1637.
93. Namikawa R, Weilbaecher KN, Kaneshima H *et al*. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. *J Exp Med* 1990; **172**: 1055-1059.
94. Kyoizumi S, Baum CM, Kaneshima H *et al*. Implantation and maintenance of functional human bone marrow in SCID-hu mice. *Blood* 1992; **79**: 1704-1707.
95. Bock TA, Orlic D, Dunbar CE *et al*. Improved engraftment of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice carrying human cytokine transgenes. *J Exp Med* 1995; **182**: 2037-2041.

96. Shultz LD, Schweitzer PA, Chistianson SW *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 1995; **154**: 180-185.
97. Greiner DL, Shultz LD, Yates J *et al.* 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**: 888-891.
98. Hesselton RM, Greiner DL, Mordes JP *et al.* 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** 974-979.
99. Cashman JD, Lapidot T, Wang JC *et al.* Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood* 1997; **89**: 4307-4311.
100. Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL *et al.* 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**: 15-20.
101. Laver J, Traycoff CM, Abdelmageed A *et al.* Effects of CD34+ selection and T cell immunodepletion on cord blood hematopoietic progenitors. Relevance to stem cell transplantation. *Exp Hematol* 1995; **23**: 1492-1496.
102. Humeau L, Chabannon C, Bardin F *et al.* Cytokine exposure alters the haematopoietic potential of mibised human blood CD34+ progenitors, as evaluated with engraftment in SCID/hu mice. *Br J Haematol* 1996; **93**: 336a.

103. Bhatia M, Bonnet D, Kapp U *et al.* Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture. *J Exp Med* 1997; **186**: 619-624.
104. Güenechea G, Segovia JC, Albella B *et al.* Delayed engraftment of Nonobese Diabetic/Severe combined Immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34+ cord blood cells. *Blood* 1999; **93**: 1097-1105.
105. Bonnet D, Bhatia M, Wang JCY *et al.* Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplantation* 1999; **23**: 203-209.
106. Van der Loo J C M, Hanenberg H, Cooper R J *et al.* Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency (NOD/SCID) Mouse as a Model System to Study the Engraftment and Mobilization of Human Peripheral Blood Stem Cells. *Blood* 1998; **7**: 2556-2570.
107. Wang J, Doedens M, Dick J. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 1997; **89**: 3919-3924.



108. Luens K, Travis M, Chen B *et al* . Thrombopoietin, kit ligand and flk2/flt3 ligand together induce increases numbers of primitive hematopoietic progenitors from human CD34+Thy-1+Lin- cells with preserved ability to engraft SCID-hu bone. *Blood* 1998; **91**: 1206-1215.
109. Petzer AL, Hogge DE, Lansdorp PM *et al*. Self-renewal of human hematopoietic cells (long-term culture-initiating-cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 1470-1478.
110. Traycoff C, Kosak S, Grigsby S, Srour E. Evaluation of ex vivo expansion potential of cord blood and bone marrow hematopoietic progenitor cells using cell tracking and limiting dilution analysis. *Blood* 1995; **85**: 2059-2068.
111. Yonemura Y, Ku H, Hirayama F *et al*. Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4040-4044.
112. Lu M, Zhang N, Maruyama M *et al*. Retrovirus-mediated gene expresión in hematopoietic cells correlates inversely with groth factor stimulation. *Human Gen Ther* 1996; **7**: 2263-2271.
113. Young JC, Bruno E, Luens KM *et al*. Thrombopoietin stimulates megakaryocytopoiesis and expansion of primitive CD34+ progenitor cells from single CD34+ Thy-1+Lin- primitive progenitor cells. *Blood* 1996; **88**: 1619-1631
114. McKenna HJ, de Vries P, Brasel K *et al*. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; **86**: 3413-3420.

115. Tanaka R, Katayama N, Oishi K *et al.* Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitor cells by growth factors. *Blood* 1995; **86**: 73-79.
116. Oishi K, Katayama N, Itoh R *et al.* Accelerated cell-cycling progenitors by the flt3 ligand that is modulated by transforming growth factor- $\beta$ . *Blood* 1996; **87**: 1718-1727.
117. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H *et al.* Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: Implications for gene therapy. *Nature Med* 1996; **2**: 1329-1336.
118. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; **81**: 2844-2853.
119. Traycoff CM, Cornetta K, Yoder MC *et al.* Ex vivo expansion of murine Hematopoietic progenitor cell generates classes of expanded cells possessing different levels of bone marrow repopulating potential. *Exp Hematol* 1996; **24**: 299-306.
120. Traycoff CM, Orazi A, Ladd AC *et al.* Proliferation-induced decline of primitive hematopoietic cell activity is coupled with an increase in apoptosis of ex vivo expanded CD34+ cells. *Exp Hematol* 1998; **26**: 53-62.
121. Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* 1999; **94**: 2161-2168.

122. Szilvassy S, Bass M, Van Zant G, Grymes B. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by ex vivo expansion. *Blood* 1999; **93**: 1557-1566.
123. Orschell-Traycoff CM, Hiatt K, Dagher R *et al.* Homing and engraftment potential of Sca-1+Lin- cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle. *Blood* 2000; **96**: 1380-1387.
124. Bryder D, Jacobsen S. Interleukin 3 supports expansion of long-term multilineage activity after multiple stem cell divisions in vitro. *Blood* 2000; **96**: 1748-1755.
125. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 9836-9841.
126. Piacibello W, Sanavio F, Severino A *et al.* Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: Evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999; **93**: 3736-3749.
127. Reiffers J, Cailliot C, Dazey B *et al.* Abrogation of postmyeloablative chemotherapy neutropenia by ex vivo-expanded autologous CD34-positive cells [ letter ]. *Lancet* 1999; **354**: 1092-1093.
128. Paquette R, Dergham S, Karpf E *et al.* Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitors cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. *Blood* 2000; **96**: 2385-2390.

129. McNiece I, Jones R, Bearman S *et al.* Ex vivo expanded peripheral blood progenitor cells provide rapid neutrophil recovery after high-dose chemotherapy in patients with breast cancer. *Blood* 2000; **96**: 3001-3007.