The background of the cover is a light beige color with a repeating pattern of stylized biological cells. Some cells are depicted as blue spheres with a yellow nucleus, while others are more complex, showing red and green components. The cells are scattered across the entire page.

UA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR

*Efecto de las células
estromales mesenquimales sobre el
injerto hematopoyético en modelos
experimentales de trasplante
autólogo*

*María Fernández García
Madrid 2015*



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

***Efecto de las células estromales
mesenquimales sobre el injerto
hematopoyético en modelos
experimentales de trasplante autólogo***

Memoria presentada por MARÍA FERNÁNDEZ GARCÍA licenciada en Biología, para optar al grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directores de Tesis

María Luisa Lamana Luzuriaga

Rosa María Yañez González

Madrid, 2015

CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGÉTICAS, MEDIO AMBIENTALES Y TECNOLÓGICAS (CIEMAT)
– CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS EN RED DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER) –
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (IIS – FJD)

María Luisa Lamana Luzuriaga, investigadora titular de la División de terapias innovadoras del Sistema hematopoyético del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas y **Rosa María Yañez González**, investigadora post doctoral de la misma unidad, certifican que la memoria adjunta titulada Efecto de las células estromales mesenquimales sobre el injerto hematopoyético en modelos experimentales de trasplante autólogo ha sido realizada por María Fernández García bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

María Luisa Lamana Luzuriaga

Rosa María Yañez González

El trabajo de investigación descrito en esta memoria ha sido realizado en la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) y, el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y la Unidad Mixta de Terapias Avanzadas CIEMAT/Instituto de Investigación Sanitaria - Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

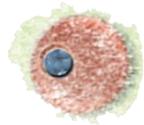
Para su ejecución, el trabajo de investigación realizado ha contado con la colaboración de los siguientes Programas de Investigación:

- Séptimo Programa Marco de la Comisión Europea (Proyecto PERSIST; Ref 222878).
- Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos SAF 2012-39834).
- Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (RETICS-RD06/0010/0015; RD12/0019/0023).
- Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (Proyecto CellCAM; Ref S2012/BMD-2420).
- Instituto de salud Carlos III (Proyectos PS09/01026 y PI13/01954).
- Programa de transferencia de tecnología en el campo de la terapia génica de la Fundación Botín.

María Fernández García ha disfrutado de un contrato de investigador en formación del Ciberer y de un contrato asociado al proyecto “Terapia celular y génica dirigida en Anemia de Fanconi: un paso adelante” (Target) (SAF2012-39834).

A la memoria de mi padre.

A mi madre y a mi hermana.



Agradecimientos

Pues bien, ha llegado el momento de agradecer, el dar las gracias porque esta tesis sin apoyos, no hubiese sido posible. Probablemente uno de los momentos más difíciles para mí en la escritura de esta tesis. Los que bien me conocéis, sabéis que expresar lo que siento no es uno de mis fuertes.

No hay otra forma de empezar estos agradecimientos que dando las gracias a mis directoras de tesis. Maruja y Rosa, Rosa y Maru. Gracias por haber confiado en mí siempre. Por el apoyo y los ánimos. Por las reuniones llenas de risas. Por haber sido mis mayores defensoras. Porque no sólo habéis sido mis directoras de tesis, sino que también habéis sido en parte mis madres cuidándome en todo momento y no he podido tener mayor suerte. Maru, mil gracias por enseñarme todos los trucos para transformar una presentación monótona, en una presentación grandiosa. Por las clases de trasplantes, que creo que he conseguido interiorizar. Por enseñarme a detectar el doble espacio en un párrafo a simple vista (aunque no he conseguido ganarte) y que hay cosas que se pueden decir con 3 palabras en vez de con 6. Por ser la relaciones públicas de este grupo y, sobre todo, por enseñarme que hay que luchar por aquello en lo que crees. Rosa, mi otro 50% en el día a día. Gracias por haberme dejado aprender a tu lado todas las técnicas del mundo mundial. Por el apoyo y el freno en las ideas locas que han pasado por mi cabeza. Por la inmensa paciencia que tuviste hasta que metí la mano en la jaula. Mil gracias por las conversaciones sobre todo y sobre nada en el animalario, en la cabina y donde se prestase y sobre todo por los momentos de confesión y ánimos. Ha sido un honor y un orgullo haber podido aprender a vuestro lado, sois dos científicas grandiosas y lo que es mejor, dos personas de gran corazón.

A otra persona a la que tengo mucho que agradecer es al jefe. Juan, mil gracias por darme una oportunidad sin conocerme, por dejarme demostrar cómo era y confiar en mí para conseguir terminar este proyecto. Eres uno de los grandes (y no es peloteo) y ha sido un verdadero honor haber podido trabajar en tu equipo.

A Miriam y a Miguel P, los otros dos integrantes del “*MSC team*” en los últimos años. Miriam gracias por todo el apoyo, las largas horas en cultivos con miles de tubos siempre preparados, por tu optimismo y por tus sabios consejos. Miguel, otro de mis compañeros de fatigas en el labo. Gracias por los madrugones para llegar a primera hora al animalario, por las risas en cultivos, por el apoyo en todo momento y por haberme dejado enseñarte un poquito de ciencia.

A todos los que en algún momento habéis participado en esta aventura, aunque ya no estéis en el laboratorio. A Alberto, Parra y Laura P, compañeros de experimentos durante la primera etapa de la tesis. A David por sus sabios consejos. Pero especialmente a Paula B, que no sólo me

ayudó científicamente transmitiéndome todos los trucos en el animalario sino que además se convirtió en mi amiga y espero que se mantenga por mucho tiempo.

A mis co-doctorandos, Bego, Fati, Diego, MJ y Victoria que habéis dejado de ser mis compañeros para ser mis amigos. Empezaré por mis “Maris”, Bego y Fati, gracias por los abrazos sin motivo, las risas, los momentos de locura y las meriendas sanas y las llenas de azúcar. Bego, quien nos iba a decir que a pesar de haber compartido carrera y viaje de Ecuador, no nos íbamos a conocer conscientemente y hacernos amigas hasta que coincidimos en el laboratorio. Gracias por ser mi LSK (el momento friki no podía faltar), por tu dulzura, por tus mensajes de ánimo, por los viajes y todos los momentos compartidos. Aunque a veces lo dudas eres una gran científica y me has hecho este camino mucho más fácil con tus consejos y tus empujones cuando los he necesitado. Fati, la persona que me acogió con los brazos abiertos cuando entré en el labo mostrándome toda tu dulzura. No lo has tenido fácil en este proceso, pero no has dejado nunca de luchar defendiendo siempre tus ideas a capa y espada, lo que es una gran virtud. Diego, nuestro diablillo, mi otro 50% del “*mutual support*”. En el terreno científico ha sido un placer haber trabajado contigo y aprender a tu lado, además fuiste mi gran salvador del ataque del ratón. En el personal, gracias por haberme dejado ser tu amiga, por tus historias divertidas y entrañables, por enseñarme a apreciar el mundo del vino y la gastronomía y porque aunque ahora estés lejos, me sigas haciendo reír con tus aventuras. MJ, la “Marquesa delfín de Tetuán”, eres un torbellino de energía. Gracias por las conversaciones de camino a casa, por esas morcillas tan ricas que me han dado media vida, por los ánimos y las risas. En algún momento me tendrás que enseñar el truco para mantener toda esa energía a lo largo del día. Vic, la princesa del glamour y el estilo del labo. Has luchado por tus sueños y ya los tienes encaminados. Gracias por esas comidas de desconexión en las que se podía hablar de cualquier cosa, menos de ciencia. Por los consejos, por el apoyo y por ser la máxima admiradora de mi mesa (si la vieses ahora no estarías nada orgullosa ;)). Gracias a todos por haber compartido juntos esta aventura con todos sus altibajos y sus locuras y sobre todo por vuestro apoyo constante.

A Rebeca y Omaira, culpables en parte de que todo haya salido bien. Gracias por las miles de horas que os he hecho pasar en el *sorter*. Especialmente a Rebe, que no sólo me ha ayudado con los análisis de citometría, sino que se ha convertido en mi amiga. Gracias por el apoyo, por los consejos y por las regañinas para que reaccionase. Por dejarme compartir con Iván y contigo un poquito de vuestra familia, porque las risas de Hugo han sido revitalizantes en momentos claves.

A nuestros antecesores, Javi, Rocío, Elenita, Sandra, Zita, Álvaro y María peque. Con algunos he podido compartir más tiempo que con otros, pero todos me disteis la bienvenida en el labo y me

hicisteis la adaptación más sencilla. Gracias por los consejos y por poner siempre una sonrisa ante las preguntas de novata. María peque y Javi, quizás con los que más tiempo he compartido, ya sea de camino a casa o como compañero de viaje en París, gracias por preocuparos siempre por mí y darme sabios consejos.

A la savia nueva del laboratorio, Fran, Sergio, Cristina, Sara y Carlos. Habéis traído nuevos aires al laboratorio. Gracias por haber compartido y en esto también está incluida Victoria (epiteliana), cañas, clases de baile y momentos de desconexión. Virginia, no nos ha dado tiempo a compartir mucho pero todos tenéis mucho potencial y ahora os toca seguir adelante con el legado que hemos ido dejando.

A Paula, Jaco y Marina. Gracias por aguantar con paciencia mis ratos en vuestro despachito. Paula, has sido mi “enciclopedia de Fanconi” durante toda la tesis. Gracias por recibir siempre todas las preguntas con una sonrisa, por los momentos dulces de “vamos que casi lo tienes” y por el apoyo que siempre me has transmitido. Jaco, creo que no podré volver a decir *However* sin pensar en ti, has convertido cada ensayo de presentación en un momento divertido. Marina, compañera de MSCs, nunca olvidaré aquel día en el que me dejaste claro que aunque María Fernández García haya muchas en el mundo, yo soy la única en el laboratorio.

A los “baticuevos”, Elena, Susana, María grande, Óscar y Mercedes. Vosotros también habéis tenido una paciencia infinita con todas mis visitas llenas de dudas a vuestro despacho y las miles de consultas, que siempre habéis respondido de la mejor manera. Especialmente tengo que agradecer a Elena, la otra componente del “*mutual support*”, gracias por dejarme aprender un poquito a tu lado, a ti te debo las super-transducciones que hemos conseguido entre otras muchas cosas.

A los co-jefes, Jose Carlos y Guille. JC gracias por ayudarnos a conseguir esas fotos tan bonitas de las LSK y las MSC, por el apoyo y por los momentos distendidos fuera del labo. Guille, eres el alma de este laboratorio. Gracias por la ayuda con el papeleo, por el apoyo, por los momentos de poyata compartidos, por los 30 de diciembre y por conseguir sacar un momento gracioso en cualquier situación.

A Mariluz, Isra, Raquel, Lara, Laura C, Miguel y Montse, gracias por la ayudarme siempre que os he necesitado y por el apoyo en los momentos bajos. Especialmente a Montse, mi vecina de atrás, mi consejera en temas administrativos, gracias por cuidarme desde el primer día.

No me puedo olvidar de Aurora, Sole, Mamen y Sergio, no tengo dedos en las manos para contar cuantas veces me habéis salvado de quedarme colgada en mitad de un experimento. Un

apartado especial tengo que hacer a Aurora, compañera de fatigas en la EOI, por tus consejos, tus abrazos y todo tu apoyo.

A Jesús, Edilia y Miguel Ángel por vuestra ayuda en el animalario. Por supuesto a María José, Freddy, Rocío y Rosita por surtirnos siempre de todo lo que hemos necesitado y mantenernos todo ordenado.

A todos los estudiantes que habéis ido pasando por el laboratorio, Estrella, Andrés, Raquel, José, Javi, Isa y Clara por los *coffee time* llenos de risas, los consultorios amorosos y los momentos compartidos. Clara, la reina de la bomba de humo, luchaste por conseguir lo que querías y creo que vas a ser una gran profesora. Gracias por convertirte en mi amiga y por todo el apoyo que me has dado y me sigues dando. A los más nuevos, Carlos y Yari, no me ha dado tiempo a compartir con vosotros mucho tiempo, pero sólo os puedo decir que habéis venido a un gran laboratorio.

Todos sois no sólo unos científicos increíbles, sino unas personas de gran corazón. Si siempre he tenido que agradecer a todos el haber formado parte de esta tesis de una forma u otra, no tengo palabras suficientes para daros las gracias especialmente por haber estado a mi lado en el último año, probablemente el año más duro de mi vida. Sólo puedo decir que he sido una gran afortunada de caer en este laboratorio.

Y antes de dejar el mundo científico, tengo que agradecer que se me ocurriese iniciar esta aventura, a aquellos que me disteis mi primera oportunidad de tomar contacto con la ciencia. A Iñaki, Cris, Susana y MJ por abrirme las puertas y enseñarme lo bonito que puede ser el mundo de la ciencia.

Pero como no todo ha sido ciencia en este camino, también tengo que dar las gracias a mi gente, a todos los que habéis escuchado mis discursos científicos con una sonrisa. En este apartado tengo que empezar dando las gracias a Marga, a mi tía Marga, la diseñadora de la portada de esta tesis. Mil gracias por tu paciencia con todas mis solicitudes *tiquismiquis* y por haber dado con la portada perfecta para esta tesis.

A mis niñas, Elena, Vanessa, Bea y María. Elena, has sido mi apoyo incondicional desde el minuto uno en el que decidí dar la vuelta a mi vida y no te puedes imaginar lo importante que has sido en muchos momentos. Vane, la culpable de que tomase la decisión que tenía que tomar. Al igual que Elena has estado siempre ahí para todo lo que he necesitado y para animarme a seguir adelante. Bea, eres pura dulzura, gracias por todos los momentos de risas y los no tan divertidos haciéndome ver que estabas ahí. María, culpable en parte de que haya conseguido este sueño.

Has sido mi amiga desde el primer minuto que pisé la facultad, apoyándome y aconsejándome. Eres una luchadora y una inspiración para seguir adelante con una sonrisa, a pesar de los problemas.

A mis niños del cole Marta, Julio y Diego, después de 25 años viviendo juntos miles de aventuras, habéis estado a mi lado en todo momento. Marta, el trabajo ha puesto km de distancia entre nosotras, pero eso no ha evitado que me hayas apoyado y aconsejado en este proceso. Julio, no sólo tengo que darte las gracias por hacerme reír siempre con tus historias locas, sino que además has puesto tu granito de arena en esta tesis. Diego, mi hermano postizo mayor, podemos pasar meses sin hablar y seguir teniendo la misma confianza del primer día, gracias por el apoyo y contar siempre conmigo. No me puedo olvidar de Maricarmen hija, Maricarmen madre y Diego padre, por estar siempre apoyándonos en todo y de Juan, ese profesor del cole que todo el mundo debería tener, que siempre se ha preocupado por mí y aún hoy sigue nuestros pasos.

A mis chicos, Alberto, Álvaro y Miguel, que siempre me habéis demostrado que sois mis amigos y estáis en los momentos importantes. Gracias por los momentos de risas, los viajes y las clases de baile que me han servido para desconectar y disfrutar.

A todos los amigos que eran amigos antes de que naciese. A Osvaldo, María Jesús, Merche, Julián, Trini, Nalin, Ana, Paquita, Gabriel, Marta, Graciano, Mercedes, Javier y por supuesto a los pequeños, a los del grupo “cocidito”, Elvira, Elena, Irene, Carlos, Marie, Carola, Miguel, Javi, Teresa y Luis. Mil gracias por estar siempre a nuestro lado, en los buenos momentos y en los malos, por las comidas, cenas y viajes que no puedo recordar sin una sonrisa en la cara, por el apoyo y por cuidarnos tan bien siempre.

A mi familia, a mi familia genial que siempre está a mi lado empujando para que siga adelante y demostrando todo su cariño. A mis abuelas Mariluz y Vito que siempre me muestran lo orgullosas que están de mí, presumiendo de su nieta “la bióloga”. A mis abuelos Teodoro y Paco, que aunque no han podido vivir conmigo este momento, algo me han debido transmitir junto con mis abuelas para que tomase este camino. A mis tíos y tías, Raquel, Amador, Pili, Beto, Marga, Carlos, Vivi, María y Goyo por el apoyo, los buenos consejos y el cariño en el día a día. Si me lo permitís, tengo que hacer un apartadito para mi tita madrina, Raquel, con la que he compartido siempre un vínculo especial y que no ha dejado de estar a mi lado ni un solo día cuando más la he necesitado. Y por supuesto a mis primos, Javi, Marco y Diana con los que tan buenos momentos he compartido.

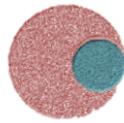
Y por último pero no menos importante, sino todo lo contrario, a mis padres y a mi hermana. Irene, te ha tocado una hermana plomiza, que le vamos a hacer. Gracias por estar siempre a mi lado, por ser mi consejera, confesora y apoyo, por aguantar mis momentos de locura y mis tonterías. No puedo estar más orgullosa de ti, de tu espíritu aventurero y de tu lucha por conseguir tus sueños. A Mariluz y Paco, a mamá y a papá, por no dejar que caiga nunca, por animarme siempre a seguir adelante, por hacer que salga el sol los días de lluvia y por enseñarnos que hay que luchar por los sueños que uno tiene. Mami, eres la fuerza de esta familia, siempre lo he pensado, pero más en los últimos meses. Gracias por escucharme siempre y darme los mejores consejos, por abrirme los ojos, por los abrazos, por aquel “estudia lo que quieras, que serás lo que te dejen”, por no dejarme tirar la toalla en busca de este sueño, por el día a día, en fin, por ser mi apoyo más incondicional en esta vida. Papi, empezamos esta aventura juntos pero la vida no nos ha dejado terminarla juntos, te me has ido cuando por fin alcanzábamos la meta, pero sé que de alguna manera estás a mi lado. Gracias por transmitirme ese gran espíritu de lucha, por enseñarnos que al mal tiempo buena cara, por tu paciencia, por tu sonrisa permanente, por tu optimismo y por tu apoyo constante. Todo el mundo dice que soy como tú en muchas cosas y eso para mí es el mayor de los cumplidos. No puedo estar más orgullosa y afortunada de los padres que tengo.

GRACIAS A TODOS DE VERDAD POR ESTAR A MI LADO.

*Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.*

Un esfuerzo total es una victoria completa.

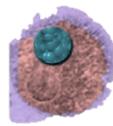
Gandhi



Resumen/Abstract

Distintos estudios han mostrado que las células estromales mesenquimales (MSCs) facilitan el injerto hematopoyético en trasplantes xenogénicos y alogénicos, habiéndose sugerido que tal efecto está mediado por los efectos inmunosupresores de estas células. En este trabajo se ha estudiado el efecto de las MSCs sobre el injerto de células madre hematopoyéticas (CMHs) en un contexto autólogo utilizando un modelo de ratón. Así, se ha demostrado que la co-infusión de MSCs derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs) con un número reducido de progenitores hematopoyéticos con fenotipo linaje⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺ (LSK) mejora el injerto hematopoyético tanto a corto como a largo plazo en receptores acondicionados con una dosis submieloablative de radiación. Este efecto fue dependiente de la dosis de MSCs y asociado a un aumento del *homing* de las células LSK a la médula ósea de los receptores. Además, se ha demostrado que el efecto beneficioso de las MSCs sobre el injerto hematopoyético era dependiente de la co-infusión simultánea de las Ad-MSCs con las células LSK. Este resultado y la observación de que las células LSK interactúan rápidamente con las MSCs, sugieren que el efecto de las MSCs sobre el injerto hematopoyético requiere el contacto directo entre las células LSK y las Ad-MSCs. Con el fin de aproximarnos a un modelo de relevancia clínica, se realizaron experimentos en los que se trasplantaron células LSK de donantes sanos (WT) en ratones receptores con anemia de Fanconi A (*Fanca*^{-/-}). En estos experimentos, la infusión de dosis bajas de células LSK WT (1.500) en ratones *Fanca*^{-/-} se asoció a un 30% de fallo de injerto. Sin embargo, la co-infusión del mismo número de células LSK con 6x10⁵ Ad-MSCs generó injertos significativos en todos los receptores. Por otra parte, la infusión de 1.500 o 3.000 LSK *Fanca*^{-/-} en receptores *Fanca*^{-/-}, se asoció a un 80% de fallo de injerto, siendo necesario infundir al menos 5.000 células LSK para reducir este fallo hasta el 30%. Posteriormente, se realizaron experimentos similares infundiendo entre 1.500 y 10.000 células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas genéticamente con un vector lentiviral terapéutico portador del gen *FANCA*, en receptores *Fanca*^{-/-} acondicionados con 5 Gy. En estos experimentos, hasta el 80% de los receptores tuvieron fallos de injerto con las dosis más bajas de células LSK y alrededor del 30% con las dosis más elevadas. Llamativamente, la co-infusión de MSCs junto con las células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas facilitó el injerto de todos los receptores trasplantados. Estos resultados demuestran el potencial de las células Ad-MSCs para mejorar el injerto en un modelo relevante de terapia génica con riesgo de fallo de injerto.

Different studies have proposed that mesenchymal stromal cells (MSCs) enhance the hematopoietic engraftment in xenogeneic and allogeneic HSC transplants. This effect is probably mediated by their immunosuppressive properties. In this work, the MSCs facilitating effect on HSC engraftment in an autologous context has been addressed, using a mouse transplantation model. We have demonstrated that the co-infusion of adipose tissue derived MSC (Ad-MSCs) with low numbers of HSCs with lineage⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺ phenotype (LSK cells) significantly improved both short- and long-term hematopoietic engraftment in recipients conditioned with submyeloablative irradiation (5Gy). This improvement was Ad-MSCs dose-dependent and associated to an increased homing of the LSK cells to the recipient's bone marrow. Additionally, it was found that the increased HSC engraftment mediated by Ad-MSCs was dependent on the simultaneous co-infusion of LSK with Ad-MSCs. This result, and the observation that LSK cells rapidly interacted with MSCs, strongly suggest that the reported engraftment effects of MSCs require the direct contact of LSK and Ad-MSCs. With the aim of approaching to a clinically relevant model, similar experiments were conducted transplanting healthy donors' LSK cells (WT-LSK) into Fanconi anemia A (*Fanca*^{-/-}) recipient mice. In these experiments, the infusion of low numbers of WT LSK cells (1,500) into *Fanca*^{-/-} recipients resulted in 30% of graft failure. However, when the same number of WT LSK cells was co-infused together with 6.10⁵ Ad-MSCs, all the transplanted animals showed significant hematopoietic engraftments. On the other hand, the infusion of 1,500 or 3,000 *Fanca*^{-/-} LSK cells in *Fanca*^{-/-} recipients resulted in 80% of engraftment failure, and it was necessary to infuse 5,000 or 10,000 to reduce the engraftment failure to 30%. Later, similar experiments were performed transplanting 1,500 to 10,000 gene corrected LSK cells transduced with a therapeutic lentiviral vector that codifies for *FANCA*, into 5 Gy irradiated *Fanca*^{-/-} recipients. In these experiments up to 80% of the recipients showed graft failure when the lowest doses of LSK cells were infused, and around 30% of graft failure was observed in the recipients transplanted with the highest doses of corrected LSK cells. Strikingly, Ad-MSCs co-infusion together with corrected *Fanca*^{-/-} LSK cells resulted in the engraftment of all the recipients. Taken together, our results demonstrate the hematopoietic facilitating engraftment potential of Ad-MSCs in a clinically relevant model of hematopoietic gene therapy with a high risk of engraftment failure.



Índice

Abreviaturas.....	1
Introducción	9
1.- Células estromales mesenquimales.....	11
1.1.- Propiedades de las MSCs.	11
1.2.- Aplicación de las MSCs en estudios pre-clínicos y clínicos.	12
1.3.-MSCs e injerto hematopoyético.	13
2.- El sistema hematopoyético.....	15
2.1.- Organización del sistema hematopoyético.....	15
2.2.- Las Células Madre Hematopoyéticas de ratón.	17
2.3.- Nicho hematopoyético.....	18
2.4.- Tráfico celular en el nicho hematopoyético.	19
3.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	20
3.1.- Tipos de trasplante.....	21
3.1.1.- Trasplantes autólogos.....	21
3.1.2.- Trasplantes singénicos.	21
3.1.3.- Trasplantes alogénicos.....	21
3.1.4.- Trasplantes xenogénicos.....	22
3.2.- Acondicionamiento.	22
3.3.- Fuentes de obtención de las células madre hematopoyéticas.....	23
4.- La Anemia de Fanconi.	23
4.1.- La ruta de Fanconi.....	23
4.2.- Manifestación fenotípica de las células de AF y diagnóstico.....	25
4.3.- Manifestación clínica de Anemia de Fanconi.....	25
4.4.- Terapias utilizadas en el tratamiento de la Anemia de Fanconi.	26
4.4.1.- Terapias actuales.....	26
4.4.2.-Nuevas terapias para el tratamiento de la Anemia de Fanconi.....	27
4.4.2.1.- Terapia génica en Anemia de Fanconi.	27

4.4.2.2- Vectores lentivirales para la terapia génica de la Anemia de Fanconi.	28
4.5.- Modelo de ratón para la anemia de Fanconi.....	29
Objetivos	31
Materiales y Métodos	35
1.- Experimentación animal.	37
1.1.- Cepas empleadas.	37
2.- Células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs).....	38
2.1.- Obtención y cultivo de las Ad-MSCs.	38
2.2.- Caracterización y diferenciación de las Ad-MSCs.	39
2.2.1.- Análisis del inmunofenotipo.	39
2.2.2.- Capacidad de diferenciación.....	39
3.- Purificación de células madre hematopoyéticas con fenotipo LSK.	40
4.- Transducción de células LSK de ratones <i>Fanca</i> ^{-/-}	40
5.- Caracterización de las células LSK de ratones <i>Fanca</i> ^{-/-}	41
5.1.- Análisis de ciclo celular.	41
5.2.- Análisis de progenitores hematopoyéticos.....	42
5.3.- Análisis de expresión de moléculas de adhesión y migración.	43
6.- Ensayos clonogénicos.....	44
7.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos.....	44
7.1.- Trasplantes seriados de progenitores hematopoyéticos en ratones B6D2F1.	44
7.2.- Análisis de quimerismo por citometría de flujo en receptores B6D2F1.	45
7.3.- Análisis del quimerismo por PCR cuantitativa (qPCR) en receptores FVB- WT/ <i>Fanca</i> ^{-/-}	46
7.4.- Evaluación del número de copias del vector en ratones <i>Fanca</i> ^{-/-}	47
8.- Ensayos de biodistribución.	48
9.- Ensayos de interacción LSK-Ad-MSCs <i>in vitro</i>	49
10.- Análisis estadístico.	50
Resultados.....	51

1.- Caracterización de las células mesenquimales.	53
1.1.- Capacidad de diferenciación de las Ad-MSCs.	53
1.2.- Inmunofenotipo de las Ad-MSCs.	53
2.- Desarrollo de un modelo de trasplante congénico en receptores B6D2F1.	54
2.1.- Obtención y caracterización de progenitores hematopoyéticos.	54
2.1.1.- Purificación de células Linaje ⁻ , Sca-1 ⁺ , c-Kit ⁺ (células LSK).	54
2.1.2.- Potencial clonogénico de las células LSK.	55
2.2.- Modelo de trasplante congénico en receptores B6D2F1.	56
2.2.1.- Efecto de la dosis de radiación sobre el injerto de células LSK.	56
2.2.2.- Efecto de la dosis de células LSK sobre el injerto hematopoyético.	57
3.-Efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético en trasplantes congénicos de receptores B6D2F1 con acondicionamiento submieloablatoivo.	58
3.1. Las Ad-MSCs mejoran el injerto de células LSK en receptores congénicos.	59
3.1.1.- Impacto de las Ad-MSC sobre el injerto hematopoyético en receptores con acondicionamiento submieloablatoivo.	59
3.1.2.- Efecto de la dosis de Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético.	60
3.1.3.- Efecto de la co-infusión de células LSK y Ad-MSCs sobre el injerto de progenitores de repoblación hematológica a largo plazo.	62
3.2.- El <i>homing</i> de las células LSK en la médula ósea aumenta con su co-infusión con Ad-MSCs.	64
3.3.- La co-infusión simultánea de las Ad-MSCs junto con las células LSK es imprescindible para la mejora del injerto hematopoyético.	66
3.3.1.- Consecuencias del fraccionamiento de la dosis de Ad-MSCs en el injerto hematopoyético.	66
3.3.2.- Efecto de la ruta de administración de las Ad-MSCs y las células LSK.	68
3.4.- Las células LSK interaccionan de forma directa con las Ad-MSCs.	69
4.- Efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético en trasplantes singénicos con alto riesgo de fallo de injerto.	71
4.1.-Purificación y caracterización de células LSK <i>Fancc</i> ^{-/-}	71

4.1.1.- Purificación de células LSK <i>Fanca</i> ^{-/-} y WT.	71
4.1.2.- Capacidad clonogénica de células LSK de donantes <i>Fanca</i> ^{-/-} y WT.	73
4.1.3.- Análisis del ciclo celular de células LSK de ratones <i>Fanca</i> ^{-/-} y WT.	74
4.1.4.- Caracterización de las subpoblaciones en células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} y en células LSK-WT.	75
4.1.5.- Estudio de la expresión de células adhesión y migración en células LSK de ratones <i>Fanca</i> ^{-/-} y WT.	76
4.2.- Caracterización del injerto hematopoyético de células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} y de células LSK-WT en receptores <i>Fanca</i> ^{-/-} y WT.	77
4.2.1.- Capacidad de injerto de células LSK-WT en receptores WT.	77
4.2.2.- Capacidad de injerto de células LSK-WT en receptores <i>Fanca</i> ^{-/-}	78
4.2.3.- Capacidad de injerto de células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} en receptores WT.	79
4.2.4.- Capacidad de injerto de células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} en receptores <i>Fanca</i> ^{-/-}	80
4.2.5.- Biodistribución de las células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} y LSK-WT en receptores <i>Fanca</i> ^{-/-}	82
4.3.- Las Ad-MSCs evitan el fallo de injerto hematopoyético de células singénicas LSK-WT en receptores <i>Fanca</i> ^{-/-} con acondicionamiento submieloablatoivo.	82
5.- Análisis del efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto de células LSK <i>Fanca</i> ^{-/-} corregidas mediante transferencia génica en trasplantes singénicos en ratones <i>Fanca</i> ^{-/-}	84
5.1.- Transducción y caracterización de células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} corregidas.	84
5.1.1.- Capacidad clonogénica y sensibilidad a MMC de las células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} corregidas.	84
5.1.2.- Estudio del ciclo celular de células LSK <i>Fanca</i> ^{-/-} corregidas.	85
5.2.- Caracterización de la capacidad de injerto de células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} corregidas.	86
5.2.1.- Capacidad de injerto de diferentes dosis de células LSK <i>Fanca</i> ^{-/-} corregidas en receptores <i>Fanca</i> ^{-/-}	86
5.2.2.- Capacidad de injerto de células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} transducidas y sin transducir en receptores singénicos <i>Fanca</i> ^{-/-}	90
5.3.- Las Ad-MSCs evitan el fallo del injerto hematopoyético de células LSK- <i>Fanca</i> ^{-/-} corregidas con el vector PGK-FANCA-wPRE* en receptores <i>Fanca</i> ^{-/-}	92
Discusión	97

1.- Las Ad-MSCs mejoran el injerto de células LSK en receptores congénicos.	99
2.- Las Ad-MSCs evitan el fallo de injerto asociado al trasplante de dosis limitantes de CMHs <i>Fancc</i> ^{-/-} corregidas genéticamente en receptores singénicos.	105
Conclusiones	113
Bibliografía	117



Abreviaturas

A

Ad-MSCs	Células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (<i>Adipose derived mesenchymal stromal cells</i>)
ADNc	AND complementario
AF	Anemia de Fanconi

B

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-inodilil fosfato
BFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides (Burst Forming Unit-Erythroid)

C

Cdc42	Proteína de ciclo celular 42
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
CFU-F	Unidad formadora de colonias de fibroblastos
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulocíticas y macrofágicas
CFU-Meg	Unidad formadora de colonias megacariocíticas
CFU-S	Unidad formadora de colonias de esplenocitos
CMHs	Células madre hematopoyéticas
CMHs-LT	Células madre hematopoyética con capacidad de repoblación a largo plazo
CMHs-ST	Células madre hematopoyéticas con capacidad de repoblación a corto plazo
Ct	Del inglés <i>Cycle threshold values</i>
CXCL12	Ligando 12 del motivo C-X-C

CXCR4 Receptor de la quimioquina C-X-C tipo 4

D

DEB Diepoxibutano

DID 2-[5-(3,3-dimetil-1-octadecil-1,3-dihidro-2H-indol-2-ilideno)penta-1,3-dien-1-yl]-3,3-dimetil-1-octadecil-3H-indolium perclorato.

DMEM Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

E

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

eGFP Proteína verde fluorescente (*enhance green fluorescent protein*)

EICH Enfermedad injerto contra huésped.

F

FANCA Gen humano de la Anemia de Fanconi-A

Fanca Gen de ratón de la Anemia de Fanconi-A

Fanca^{-/-} Correg Células con ausencia del gen de ratón de la Anemia de Fanconi-A corregidas genéticamente con el vector PGK-FANCA-wPRE*.

FITC Isocianato de fluoresceína

FIt-3 FMS- tirosina quinasa 3 (*fms-like tyrosine kinase-3*)

FMO Fallo de médula ósea

G

GMP Buenas prácticas de fabricación (*Good manufacturing practices*)

Gy Gray

H

HLA Anticuerpo leucocitario humano

I

ICAM-1 Molécula de adhesión intercelular 1

IDO Indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN γ Interferón γ

IL-11 Interleuquina 11

IL-6 Interleuquina 6

IP Intraperitoneal

ISCT Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society of Cell Therapy*)

IV Intravenoso

L

LFA-1 Antígeno 1 asociado a función linfocitaria

Lin⁻ Linaje negativo

LSK Linaje negativo Sca-1 positivo c-Kit positivo

LT Largo plazo (*long term*)

LTR Repetición terminal larga

M

MMC Mitomicina C

MO	Médula ósea
MOI	Multiplicidad de infección
MPP	Progenitores multipotentes
MSCs	Células estromales mesenquimales

N

NBT	Nitroazul de tetrazolio
-----	-------------------------

P

PBE	PBS con seroalbúmina bovina y EDTA
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PE	Ficoeritrina
PE-Cy5	Tandem ficoeritrina-cianina 5
PE-Cy7	Tandem ficoeritrina-cianina 7
PGK	Fosfoglicerato quinasa

Q

qPCR	Reacción cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real
------	---

S

Sca-1	Antígeno 1 de célula madre (<i>Stem cell antigen 1</i>)
SCF	Del inglés <i>Stem cell factor</i>
SP	Sangre periférica
ST	Corto plazo (<i>short term</i>)

T

TGF- β Factor de crecimiento transformante beta 1

TNF α Factor de necrosis tumoral alfa

U

UT Unidades de transducción

V

VCAM-1 Molécula vascular de adhesión celular 1

VCN Número de copias del vector (*vector copy number*)

VLA-4 Del inglés *very late antigen 4*

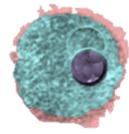
W

wPRE* Secuencia de estabilización post-trascricional del hepatovirus de marmota mutada.

WT *Wild type*

GLOSARIO:

Al escribir este trabajo, he intentado en la medida de lo posible evitar la utilización de palabras en inglés. Sin embargo, he decidido utilizar los términos *homing*, *forward*, *reverse* y *wild type* en inglés por ser los de utilización más extendida y de comprensión más sencilla.



Introducción

1.- Células estromales mesenquimales.

Las células estromales mesenquimales (MSCs) fueron descritas por primera vez por Friedenstein y colaboradores (70) como una población heterogénea de células madre multipotentes, con distinta capacidad de proliferación y diferenciación. Son células adherentes, de aspecto fibroblastoide, capaces de generar lo que estos autores denominaron unidades formadoras de fibroblastos (CFU-F) (189).

Clásicamente, las MSCs han sido aisladas de la médula ósea (MO), donde representan entre el 0,01-0,001% de la celularidad total. Además de la MO, las MSCs también han sido aisladas de otros tejidos como el tejido adiposo (Ad-MSCs) (270), la placenta (163), la pulpa dental (87) y tejidos fetales como el hígado, el bazo y el cordón umbilical (101). Entre todos estos tejidos, es de destacar el tejido adiposo como fuente de MSCs, al tratarse de un tejido abundante y de fácil acceso en las liposucciones, del que pueden obtenerse un alto número de estas células (Ad-MSCs). A pesar de que las Ad-MSCs han sido menos estudiadas que las aisladas de médula ósea, se ha comprobado que ambas poblaciones comparten el mismo fenotipo y todas sus propiedades funcionales (191, 262).

Las MSCs no tienen un marcador de superficie específico que las defina. Con el fin de unificar la terminología de las MSCs, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) recomienda el uso del término “Células Estromales Mesenquimales”, para referirse al acrónimo MSCs. Además, basa su caracterización en el crecimiento en adherencia, capacidad de diferenciación hacia tejido óseo, cartilaginoso y adiposo, la expresión de los marcadores CD73, CD90, CD105 y la no expresión de los marcadores CD34, CD45, CD11b, CD14, CD19 y HLA-DR (53).

1.1.- Propiedades de las MSCs.

Las MSCs tienen propiedades inmunológicas únicas. No son inmunogénicas, pues no generan una respuesta inmune por parte de linfocitos T alogénicos, lo que permite la utilización de MSC en contextos alogénicos y xenogénicos (59, 174). Además, las MSCs tienen importantes propiedades inmunosupresoras a través de la secreción de factores solubles, entre los que se encuentra la prostaglandina E2, TGF- β o la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), pero también a través del contacto célula-célula. De esta manera, las MSCs modulan la función de las principales poblaciones del sistema inmune, como las células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y células NK (126, 158, 239, 263).

Por otro lado, las MSCs son capaces de diferenciarse *in vitro* hacia distintos tejidos de origen mesodérmico, como el tejido óseo, tejido adiposo, tejido cartilaginoso, tejido muscular y tendón (67, 189, 266), así como a células de origen no mesodérmico, como hepatocitos, miocitos o células del sistema nervioso (98, 194, 258).

Estas células también poseen importantes propiedades para el mantenimiento del microambiente hematopoyético. Así, las MSC participan de forma dinámica en el desarrollo del microambiente medular, secretando componentes implicados en la organización de la matriz extracelular, como el colágeno o la fibronectina y gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento, como IL-6, IL-11, FLT-3 o SCF, importantes para el mantenimiento y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas (38, 189).

1.2.- Aplicación de las MSCs en estudios pre-clínicos y clínicos.

Las numerosas propiedades que presentan las MSCs las han convertido en una herramienta interesante para el tratamiento de varias patologías. Su capacidad de diferenciación hacia tejidos de origen mesodérmico y no mesodérmico las convierten en una alternativa para aplicaciones terapéuticas en el campo de la medicina regenerativa (94, 99, 180, 253), incluyendo enfermedades cardíacas (166), osteoarticulares (253), neuronales (135) y pulmonares (221), entre otras.

En distintos estudios se ha observado que las MSCs administradas de forma sistémica tienen capacidad de migrar hacia sitios de daño en respuesta a distintas quimioquinas. Éstas se unen a sus respectivos receptores expresados en la membrana de las MSCs (218, 269), participando en la recuperación del tejido dañado (135). De forma similar a las células del sistema inmune, las MSCs pueden extravasarse desde el torrente sanguíneo como consecuencia de la expresión de moléculas de adhesión en su superficie, como la P-selectina y la molécula vascular de adhesión celular VCAM-1(204) y así poder alcanzar el tejido diana en el que ejercer su función.

Las aplicaciones más frecuentemente utilizadas por parte de las MSCs derivan de sus propiedades inmunosupresoras. Así, numerosos estudios han utilizado MSCs para el tratamiento de la complicación más frecuente y severa de los trasplantes alogénicos de progenitores hematopoyéticos, la enfermedad del Injerto contra el Huésped (EICH) (14, 127). Además, también se ha demostrado que las MSCs son capaces de prevenir la EICH en modelos experimentales de trasplante alogénico en ratón (137, 224, 262). Asimismo, las propiedades inmunosupresoras de las MSCs también han sido aplicadas para el tratamiento de numerosas

enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple (39, 105), la enfermedad de Crohn (75, 131) o la artritis reumatoide (226, 255).

Una de las limitaciones del uso clínico de las MSCs deriva del pequeño número de células que se aíslan de los tejidos, siendo necesaria su expansión *ex vivo* para obtener el número de células que sean eficaces en su uso terapéutico. Los distintos estudios realizados sobre la bioseguridad de las MSCs han mostrado que estas células son seguras para uso clínico. En la actualidad, según el portal www.clinicaltrials.gov, hay registrados más de 4.000 protocolos clínicos en los que se están utilizando MSCs para el tratamiento de un amplio número de enfermedades. En ninguno de los protocolos clínicos realizados hasta ahora, que suman miles de pacientes, se ha detectado ningún caso de tumorigénesis derivadas del uso de MSC, ni ningún efecto adverso derivado de la infusión de estas células (20, 86, 114, 125, 128). Tras algunas investigaciones iniciales, las mismas observaciones se han constatado en los estudios preclínicos realizados en modelos animales (184, 262).

1.3.-MSCs e injerto hematopoyético.

En los últimos años distintos estudios experimentales han analizado el papel de las MSCs en la mejora del injerto hematopoyético. Algunos de estos estudios se han realizado en modelos de trasplante xenogénico de células CD34⁺ y MSCs humanas en ratones inmunodeficientes NOD/SCID. Estos ratones fueron acondicionados de forma submieloablative y trasplantados con progenitores hematopoyéticos humanos CD34⁺, con o sin la adición de MSC, éstas de procedencia tanto alogénica como singénica, administradas por vía intravenosa o intrafemoral (6, 32, 113, 178, 184). Estos estudios demostraron que las MSC son capaces de mejorar de forma significativa el injerto de las células madre hematopoyéticas (CMHs), siendo este efecto dosis dependiente (6, 113, 184). No se apreciaron diferencias entre el uso de MSCs autólogas o alogénicas respecto a las CMHs (6). Además, en el estudio de Carrancio y colaboradores (32) se observó que la co-infusión de ambos tipos celulares por vía intravenosa o por vía intrafemoral mejoraba significativamente el injerto hematopoyético, no habiendo diferencias entre la co-infusión de las CMHs y las MSCs juntas por vía intravenosa o juntas por vía intrafemoral. Sin embargo, en la mayor parte de estos trabajos, se observó que el efecto más evidente de las MSC sobre el injerto se producía cuando el número de CMHs infundidas era reducido (6, 178, 184).

Por otro lado, Li y colaboradores (137) realizaron un estudio en el que ratones BALB-C fueron trasplantados con células mononucleadas de cordón umbilical alogénicas de ratón C57/BL, con o

sin la adición de MSCs de MO de los mismos ratones. En este estudio, observaron que la co-infusión de MSCs junto con CMHs alogénicas, una vez más, mejoraba de forma significativa el injerto hematopoyético.

También se ha comprobado el papel beneficioso de las MSCs en el trasplante hematopoyético en un estudio realizado en primates por Masuda y colaboradores (152). En él, se estudió el efecto de las MSC en el injerto de CMHs autólogas cuando ambas poblaciones eran inyectadas por vía intrafemoral, detectándose mejoras en el injerto comparado con CMH inyectadas sin MSCs.

Acerca del efecto de las MSC sobre el injerto de CMHs en humanos se han publicado varios estudios de ensayos clínicos, todos en el contexto de trasplantes alogénicos. Las MSCs fueron utilizadas porque en estos trasplantes se preveía un riesgo de fallo de injerto, como consecuencia de causas variadas, como una identidad incompleta en el grado de histocompatibilidad entre el donante y el receptor (HLA no idénticos o haploidénticos) o de la patología de base del paciente, como la anemia aplásica. Así, se investigó la eficacia de MSCs alogénicas en 14 pacientes pediátricos sometidos a trasplantes haploidénticos para el tratamiento de distintas patologías hematológicas malignas y no malignas, como inmunodeficiencias (13). En este estudio, llevado a cabo por Ball y colaboradores, se observó que la infusión de MSCs evitaba el fallo de injerto y aceleraba la recuperación linfocitaria, comparado con un grupo histórico control de características similares. Otro estudio fue llevado a cabo por Le Blanc y colaboradores (130), en el que siete pacientes adultos, con patologías hematológicas o inmunodeficiencias, fueron co-trasplantados con MSCs y CMHs de sangre periférica de donantes familiares y no familiares, con grados variables de identidad HLA. La co-infusión de ambos tipos celulares se llevó a cabo con el objeto de prevenir el fallo de injerto, que es más frecuente en este tipo de trasplantes. En particular, este grupo incluía a tres pacientes re-trasplantados por haber tenido un rechazo de injerto previo. En este estudio, la co-infusión de las MSCs evitó el fallo de injerto en los tres pacientes re-trasplantados y produjo un injerto estable en los cuatro pacientes restantes, independientemente del grado de compatibilidad y de la relación familiar entre donantes y receptores.

En determinadas patologías, como la anemia aplásica severa, es más frecuente el fallo de injerto, a pesar de que los donantes sean HLA-idénticos y familiares (217). Así, en dos pacientes pediátricos con anemia aplásica severa, que habían sufrido fallos de injerto en trasplantes previos, se observó que la co-infusión de MSC junto con las CMHs producía un injerto hematopoyético completo, a pesar de que las CMHs infundidas provenían de los mismos

donantes que previamente no habían injertado (64). Este efecto se vio remarcado por otro estudio llevado a cabo por Wu y colaboradores (259) en 21 pacientes con anemia aplásica severa, en los que el co-trasplante de CMHs haploidénticas y MSCs produjo un injerto estable en todos los pacientes.

Finalmente, hay casos publicados en los que las MSCs fueron infundidas en etapas muy posteriores a trasplante de CMHs alogénicas. Así, dos pacientes que presentaban aplasia roja tras trasplantes de donantes con grupo sanguíneo ABO incompatibles, recibieron infusiones de sólo MSCs alrededor de seis meses después del trasplante, obteniéndose una rápida y estable recuperación de la eritropoyesis (65).

Los resultados obtenidos, tanto en los ensayos clínicos como en los experimentales realizados en distintos modelos animales, parecen indicar que la infusión de MSCs podría ser beneficioso en aquellos trasplantes alogénicos en los que existen factores de riesgo de fallo de injerto.

En los estudios descritos anteriormente realizados en trasplantes alogénicos, es muy posible que los efectos inmunosupresores de las MSC tuviesen un papel importante en la prevención del fallo del injerto, bien al suprimir una respuesta frente a antígenos alogénicos, o bien al modular mecanismos inmunes implicados en la etiología de la enfermedad.

Sin embargo, los estudios realizados en trasplantes autólogos son escasos y poco concluyentes. Así, se estudió el efecto de MSC autólogas en trasplantes autólogos de CMH para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. Los autores concluyeron que la co-infusión de MSCs estaba asociada a una rápida recuperación de las plaquetas, aunque estos resultados no eran concluyentes ante la ausencia un grupo control sin MSCs(116, 125).

2.- El sistema hematopoyético.

2.1.- Organización del sistema hematopoyético.

El sistema hematopoyético es un sistema altamente jerarquizado, con estructura piramidal, en el que a partir de una pequeña proporción de células madre hematopoyéticas, se generan todas las células maduras que forman parte de la sangre. Las células progenitoras hematopoyéticas se agrupan en dos líneas de diferenciación: una que incluye a los progenitores eritroides, mieloides y megacariocíticos y otra línea linfoide, compuesta por los progenitores de células T, células B, células NK y células dendríticas.

Las CMHs son las células más primitivas o indiferenciadas que mantienen al sistema hematopoyético. Se caracterizan por ser células multipotentes, con una baja tasa de proliferación y una alta capacidad de auto-renovación. Estas células se mantienen durante toda la vida del individuo, manteniendo su hematopoyesis(169).

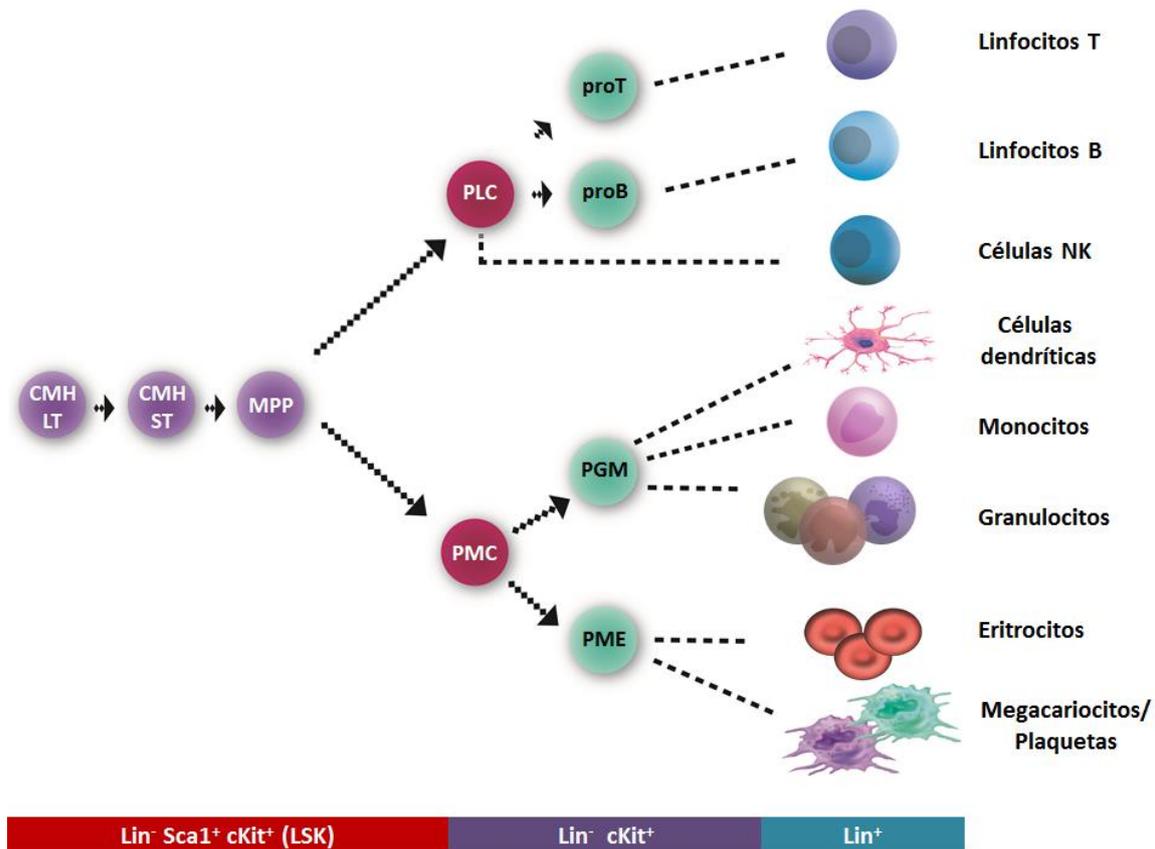


Figura 1: Organización jerárquica del sistema hematopoyético en ratón. Modificado de Doulatov et al(55).

En el siguiente escalón se encuentran los progenitores hematopoyéticos comprometidos. A pesar de que estas células son morfológicamente iguales a las CMHs, los progenitores hematopoyéticos tienen una tasa de proliferación mayor que las CMHs y una limitada capacidad de auto-renovación. La potencialidad de estas células es más limitada, siendo su progenie homogénea (161).

Los progenitores hematopoyéticos comprometidos estimulados con factores solubles específicos tienen la capacidad de formar *in vitro* colonias de células con una morfología característica:

- Progenitores eritroides primitivos, definidos como unidades formadoras de colonias eritroides o BFU-E (del inglés *Burst Forming Unit-Erythroid*) (84).
- Precusores gránulo-macrofágicos, definidos como unidades formadoras de colonias granulocíticas y macrofágicas o CFU-GM (del inglés *Colony Forming Unit-Granulocytic and Macrophagic*) (24, 190).
- Precusores megacariocíticos, definidos como unidades formadoras de colonias megacariocíticas o CFU-Meg (del inglés *Colony Forming Unit-Megakaryocytic*) (154, 162, 172).

Finalmente se encuentra el escalón más amplio, el cual incluye a las células hematopoyéticas maduras de todos los linajes. Estas células poseen una morfología característica y una baja o nula capacidad de proliferación y auto-renovación. Cada tipo celular posee distintas funciones propias de linaje, como la defensa inmune, el transporte de oxígeno o la coagulación.

Todo este proceso está altamente regulado y es dependiente de factores exógenos liberados de forma endocrina o paracrina (factores de crecimiento hematopoyético o citoquinas) así como de factores intrínsecos de las propias CMHs (factores de transcripción y modificaciones epigenéticas). Las interacciones célula-célula con distintos componentes del nicho hematopoyético, así como sustancias neuroendocrinas liberadas por las terminaciones nerviosas que inervan la MO, también influyen en la regulación del sistema hematopoyético (16, 23).

2.2.- Las Células Madre Hematopoyéticas de ratón.

Las CMHs representan menos del 1% de la celularidad total de la MO (169, 257). En ratón fueron inicialmente identificadas en base a su capacidad para formar colonias en el bazo de ratones irradiados letalmente (CFU-S). Sin embargo, los ensayos más aceptados para definir a estas células como CMHs son los ensayos de reconstitución hematopoyética de receptores a largo plazo. En estos ensayos, se comprueba la capacidad de las CMHs para reconstituir todos los linajes hematopoyéticos tras un trasplante hematopoyético en receptores letalmente irradiados (95, 257). El método más extendido para detectar las CMH injertadas es el empleo de ratones con variaciones en el marcador panleucocitario Ly-5 (CD45), con sus dos variantes alélicas: Ly-5.1 y Ly-5.2 (CD45.1 y CD45.2, respectivamente), que pueden ser fácilmente reconocidas por anticuerpos monoclonales específicos (124, 150, 243).

En ratón, la caracterización fenotípica de las CMHs ha mostrado que estas células carecen de los marcadores de linaje (eritroide, monocíticos, granulocíticos o linfoides), siendo por tanto

denominados Linaje⁻ (Lin⁻). Las células Lin⁻ que expresan altos niveles de los marcadores Ly6A (*Stem-cell antigen 1*, Sca-1) y c-Kit, son denominadas células LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺) y son consideradas como las verdaderas CMHs, que representan entre el 0,5% y el 1% de la celularidad total de la MO (169).

A su vez, las LSK pueden ser subdivididas en 3 subpoblaciones de grado creciente de maduración y diferenciación (112, 195, 264):

- CMHs-*long-term* (LT): tienen capacidad de repoblación a largo plazo y presentan el fenotipo Lin⁻, Sca1⁺, c-Kit⁺, Flk2⁻, CD34⁻.
- CMHs-*short-term* (ST): tienen capacidad de repoblación a corto plazo y presentan el fenotipo Lin⁻, Sca1⁺, c-Kit⁺, Flk2⁻, CD34⁺.
- Progenitores multipotentes (MPP): presentan el fenotipo Lin⁻, Sca1⁺, c-Kit⁺, Flk2⁺, CD34⁺.

Las CMHs de mayor capacidad de injerto tras un trasplante son aquellas que se encuentran en un estado quiescente y metabólicamente inactivas (219, 240). Se ha observado que las CMHs en fase S/G₂/M del ciclo celular tienen una capacidad de injerto inferior comparada con aquellas que se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo (68). Se ha demostrado que este injerto defectuoso podría deberse a una reducción en los receptores de adhesión (17).

2.3.- Nicho hematopoyético.

Un nicho de células madre puede ser definido como la estructura en la que residen las células madre y en la que son mantenidas sus principales propiedades, como la multipotencialidad, auto-renovación y quiescencia (40, 209). Uno de los nichos más estudiados es el nicho hematopoyético, localizado en la médula ósea. Este microambiente medular fue definido por primera vez por Schofield (209), quien propuso que existía un nicho de células especializadas en la MO, que están físicamente asociadas con las CMHs y que emiten señales específicas que intervienen en el mantenimiento y regulación de su función.

El origen de los componentes de este nicho son tanto de origen hematopoyético (osteoclastos, macrófagos y neutrófilos) como no hematopoyético (células mesenquimales, osteoblastos, células endoteliales y células gliales) (209). Todos ellos están regulados por estímulos fisiológicos, como la enervación simpática, ritmos circadianos o señales hormonales (27). Distintos estudios han demostrado que las células derivadas del linaje óseo (células mesenquimales, condrocitos, osteoblastos y osteocitos) son un componente esencial del nicho

hematopoyético al producir numerosos factores implicados en la regulación de las CMHs (26, 228, 249).

En la MO se han descrito dos nichos hematopoyéticos: el endosteal y el perivascular. El nicho endosteal contiene la mayoría de las CMHs inactivas, sirviendo como nicho de almacenamiento de células quiescentes con capacidad de auto-renovación (267), que darán lugar a las MPP por divisiones asimétricas (97).

Por otro lado, el nicho perivascular contiene células endoteliales que expresan citoquinas como CXCL12 (SDF1) y moléculas de adhesión como la E-selectina o VCAM-1, importantes para la movilización, *homing* e injerto de las CMHs (10, 192). Además de las células endoteliales, en la región perivascular del nicho se ha descrito la presencia de MSCs y de una población de células estromales heterogénea, caracterizada por tener una alta expresión de CXCL12, cerca de las cuales las CMHs trasplantadas anidan preferencialmente (52, 83, 160).

A pesar de que el nicho endosteal y el nicho perivascular parecen tener distintas funciones, hay estudios que sugieren que ambos nichos cooperan para regular la auto-renovación y quiescencia de las CMHs, así como el mantenimiento de la homeostasis (257).

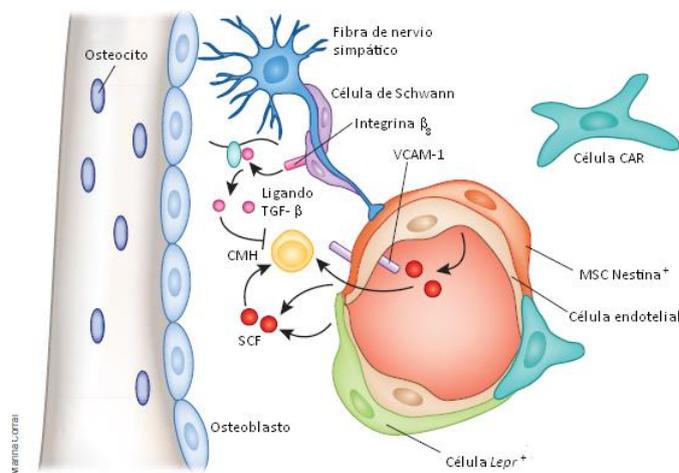


Figura 2: Modelo de nicho hematopoyético. Modificado de Kunisaki et al (120).

2.4.- Tráfico celular en el nicho hematopoyético.

Aunque la mayoría de las CMHs en el ratón adulto están localizadas en la MO, estas células presentan una gran movilidad. En respuesta a señales específicas, las CMHs pueden salir y retornar al nicho hematopoyético en procesos conocidos como movilización y *homing*

respectivamente. Estos procesos comprenden una compleja combinación de migración, adhesión, proteólisis y señalización entre las CMHs y el nicho hematopoyético (30, 122, 183).

El *homing* es el proceso por el cual las CMHs trasplantadas son atraídas hacia la MO, interactuando con los vasos de la MO y migrando al espacio extravascular, a través de una migración trans-endotelial (153, 220). En este proceso participan numerosas moléculas de adhesión y de quimiotaxis. Se ha demostrado que existe una interacción (*rolling*) inicial con el endotelio de la MO a través de las glicoproteína CD44 y la P-selectina, así como una interacción entre la integrina VLA4 y su receptor VCAM1 (11, 208, 247). Además, la interacción entre el receptor CXCR4 expresado por las CMHs y la quimioquina CXCL12 de la MO es crítica en el *homing* (1, 11, 225).

Tras el *homing*, se produce el anidamiento e injerto de las células trasplantadas. Este proceso incluye la migración de las CMHs a los nichos específicos de las MO donde se anclarán y residirán (60). Una vez que las CMHs se han alojado en la MO, son requeridas para generar las células maduras de la sangre y repoblar a los receptores, produciéndose así el injerto, detectable en la sangre periférica (96).

Un factor crucial implicado en la migración, retención y movilización de las CMHs durante la homeostasis o tras un daño, es la vía CXCL12/CXCR4 (123, 176). Los efectos biológicos de CXCL12 están mediados por su capacidad para inducir motilidad, quimiotaxis y adhesión en las CMHs.

3.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

El trasplante de progenitores hematopoyéticos o de CMHs es el tratamiento de elección para numerosas patologías onco-hematológicas y para otras patologías no malignas. Consiste en la infusión de progenitores hematopoyéticos para reconstituir o reemplazar el sistema hematopoyético endógeno (230, 231). Este procedimiento habitualmente incluye un tratamiento de acondicionamiento con dosis variables de quimio y/o radioterapia, seguido de la infusión de CMHs. Lo más frecuente es que las CMHs sean infundidas por vía intravenosa 24h tras la finalización del acondicionamiento (62).

3.1.- Tipos de trasplante.

Dependiendo del donante se pueden distinguir diferentes tipos de trasplante hematopoyético: autólogo, singénico, alogénico y xenogénico (5, 188).

3.1.1.- Trasplantes autólogos.

Es el que se realiza con CMHs del propio paciente, obtenidas en un momento oportuno de la enfermedad. Las células se conservan, habitualmente criopreservadas y posteriormente son re-infundidas al propio paciente tras la administración de un acondicionamiento (62).

3.1.2.- Trasplantes singénicos.

Es aquel en el que donante y receptor son gemelos homocigotos, entre los que no existen por lo tanto diferencias genéticas ni inmunológicas, al ser HLA-idénticos.

En ratón, no hay diferencia entre los trasplantes autólogos y singénicos, ambos con donantes/receptores de la misma cepa, H2 idénticos. Una variante de estos trasplantes es el trasplante congénico, en el que sólo existe una variación genética del antígeno panleucocitario CD45, con sus variantes CD45.1 (Ly 5.1) y CD45.2 (Ly 5.2) (261). Los injertos de piel de donantes CD45.1 no son rechazados por receptores CD45.2, por lo que el modelo CD45.1/CD45.2 es uno de los más utilizados para detectar injertos de CMHs entre donantes/receptores de la misma cepa (227, 241).

3.1.3.- Trasplantes alogénicos.

Es aquel que se realiza entre individuos de una misma especie. Sus principales complicaciones son la enfermedad injerto con huésped (EICH) y las infecciones, ambas con un porcentaje elevado de morbi-mortalidad para los receptores (62).

Los donantes alogénicos pueden ser familiares o no familiares. Lo ideal es que el donante sea familiar y HLA compatible, con el mayor grado de identidad en los antígenos HLA. En este tipo de trasplantes las células infundidas son sanas y el riesgo de recaída es menor, pero está restringido a la disponibilidad de un donante (62). En España menos del 25% de los pacientes cuenta con un donante familiar HLA-compatible o HLA-idéntico.

En ratón, este tipo de trasplantes se realiza entre donante/receptor de distinta cepa; es decir, con disparidad en los antígenos del complejo de histocompatibilidad H2 de los ratones.

3.1.4.- Trasplantes xenogénicos.

Consiste en el trasplante de células, tejido u órganos de una especie a otra, es decir que donante y receptor pertenecen a distintas especies (234). En los estudios de trasplante de CMHs, el modelo más frecuentemente utilizado se basa en la infusión de estas células en ratones inmunodeficientes que poseen un microambiente permisivo para el injerto de CMHs de otra especie, permitiendo analizar así su proliferación y capacidad pluripotente (90).

3.2.- Acondicionamiento.

Como se ha mencionado anteriormente, antes de recibir un trasplante de CMHs, los pacientes oncohematológicos suelen recibir un acondicionamiento con quimio/radioterapia. Este acondicionamiento sirve para erradicar la enfermedad de base en los pacientes, pero también para preparar el nicho hematopoyético para la recepción y anidamiento de las células trasplantadas (230, 232). En los trasplantes alogénicos, además, el acondicionamiento tiene el objetivo de disminuir la capacidad de respuesta inmune del receptor, evitando así rechazo del injerto de las CMHs infundidas (62).

En función de su intensidad, existen tres tipos de acondicionamiento:

- Mieloablativo: la dosis de radiación y/o quimioterapia produce una pancitopenia irreversible, que no permite la recuperación endógena de la hematopoyesis, por lo que es letal para el paciente en el caso de no recibir un rescate con CMHs (12).
- Intensidad reducida: la dosis de radiación o de quimioterapia es más reducida que la letal. Causa citopenia y produce una aplasia muy prolongada seguida de una lenta recuperación hematopoyética endógena, que suele requerir de un trasplante de CMHs para la supervivencia del paciente (12).
- No mieloablativo: consiste en dosis muy reducidas de quimio y/o radioterapia, que causa citopenia pero no requiere de un trasplante de CMHs pues siempre se produce una reconstitución endógena no muy demorada (12).

FANCL (155), FANCM (157), FANCN (193), FANCO (244), FANCP (222), FANCO (22), FANCR o RAD51 (254) FANCS (207) y FANCT (248)). Los genes suelen designarse como “FANC” seguido de la letra correspondiente al grupo de complementación.

A pesar de que la función de los genes implicados en AF no se conoce totalmente, se ha descrito que actúan de forma conjunta en la ruta de reparación del ADN que se activa durante la replicación de las células o en respuesta a modificaciones químicas en la doble hélice de ADN, principalmente entrecruzamientos del ADN (134). Los fallos en la función de los genes implicados en esta ruta aumentan la inestabilidad génica (44, 168, 242).

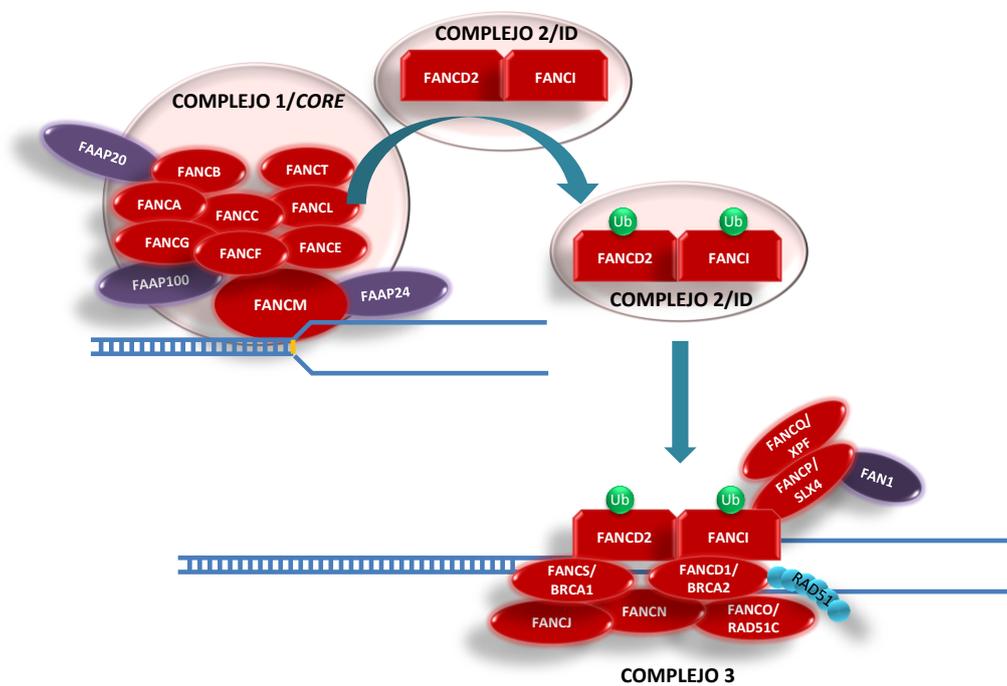


Figura 4: Esquema simplificado de la ruta de Fanconi/BRCA.

Se han identificado tres complejos de proteínas implicados en la ruta de AF. Tras el daño al ADN o tras la replicación, el complejo I o *core* formado por nueve proteínas FANC reconoce la lesión en el ADN (107, 248) e induce a la activación vía monoubiquitinización del complejo ID formado por 2 proteínas FANC (74, 216). El complejo ID activado se une a la cromatina y recluta al complejo III formado por 8 proteínas FANC (115, 118, 140, 144, 207, 215). Finalmente, la ruta vuelve a su estado inactivo al retirar los grupos ubiquitina del complejo ID (177).

4.2.- Manifestación fenotípica de las células de AF y diagnóstico.

Las células de los pacientes con AF tienen una elevada inestabilidad cromosómica, lo que se emplea como prueba diagnóstica mediante la exposición de células primarias a agentes entrecruzantes del ADN, como diepoxibutano (DEB) o mitomicina-C (MMC). Las células de los pacientes tratadas con DEB o MMC presentan una parada en las fases G₂/M del ciclo celular, así como una reducida viabilidad, además de roturas y anomalías cromosómicas. (9, 35, 119, 210, 211).

Otras características de las células de pacientes con AF son la hipersensibilidad a concentraciones ambientales de oxígeno, lo que las lleva a tener un crecimiento *ex vivo* deficiente y una baja capacidad clonogénica (103, 206). También muestran una reducción en el tamaño de los telómeros, lo que correlaciona con la detección de un aumento de 10 veces en fusiones terminales de cromosomas, comparado con el de células normales (29, 132).

Asimismo, los cultivos de células de los pacientes con AF presentan una alta sensibilidad a las citoquinas pro-apoptóticas TNF α e IFN γ , lo que produciría un incremento en la apoptosis de las CMHs, llevando a un agotamiento progresivo de estas células en la MO. Además, la sobreexpresión de ciertos metabolitos endógenos, como los acetaldehídos, podrían inducir alteraciones químicas en el ADN, que contribuirían al fallo medular (56, 72, 100, 203). Finalmente, se han descrito defectos en la adhesión y anidamiento celular asociados a una desregulación de la actividad de Cdc42 (268).

4.3.- Manifestación clínica de Anemia de Fanconi.

A pesar de la heterogeneidad genética en los pacientes con AF, todos ellos comparten un fenotipo común, presentando malformaciones congénitas, fallo de MO y predisposición al cáncer. Las malformaciones congénitas se pueden manifestar en forma de baja estatura, cabeza y ojos pequeños, polidactilia, anomalías en el dedo pulgar y en el brazo, hipo o hiperpigmentación (manchas café con leche), además de anomalías estructurales en el corazón, riñón y otros órganos (45, 235).

La AF pertenece a un grupo de síndromes de fallo de médula ósea (FMO), los cuales se caracterizan por la incapacidad de la MO para producir un número adecuado de células sanguíneas circulantes y generan una alta mortalidad en los pacientes que la padecen. Este fenómeno se manifiesta en el 80% de los casos siendo el principal signo de la enfermedad y la causa primaria de mortalidad, situándose la supervivencia de los pacientes en alrededor de los

30 años (3, 8). En el 75% de los casos, el FMO se manifiesta durante la primera década de la vida. Entre los 5 y 10 años de edad se manifiesta una pancitopenia y neutropenia, que se asocia con un incremento en el riesgo de infecciones. Finalmente, estas disfunciones hematológicas pueden desembocar en un fallo severo de MO, que tiene una tasa de incidencia del 5% por año a partir de los 10 años de edad (4, 121, 201).

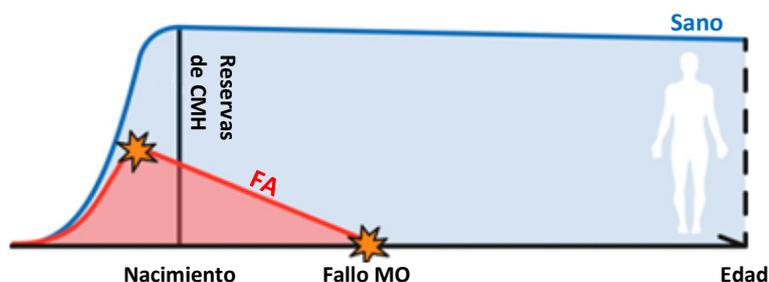


Figura 5: Esquema representativo del descenso progresivo de CMHs que lleva al desarrollo de un fallo de MO. Modificado de Garaycochea y Patel (72).

Por último, los pacientes con AF presentan una alta predisposición al cáncer. Así, a los 40 años de edad el 33% de los pacientes presentan leucemia mieloide aguda o síndrome mielodisplásico. Además de los desórdenes hematológicos descritos, estos pacientes tienen un riesgo más elevado de desarrollar tumores sólidos, como el carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello, piel, esófago y el cáncer vulvar en las mujeres (4, 37, 201).

4.4.- Terapias utilizadas en el tratamiento de la Anemia de Fanconi.

A pesar de que la AF es una enfermedad sistémica, la mayor parte de las terapias de estos pacientes están centradas en el tratamiento del fallo de médula, que es la principal causa de muerte. Junto a ello, es importante la prevención y tratamiento de tumores a lo largo de la vida del paciente con AF.

4.4.1.- Terapias actuales.

Los tratamientos para disminuir el fallo de médula son principalmente paliativos, teniendo como objetivo estimular la producción de células del sistema hematopoyético. Estos tratamientos suelen consistir en la administración de andrógenos, que estimulan la eritropoyesis y las transfusiones de sangre, que mejoran el estado general del paciente.

El trasplante alogénico de CMHs es el único tratamiento curativo para los pacientes con AF, influyendo la relación donante-receptor en el éxito del trasplante. Cuando el donante es un familiar HLA compatible/idéntico al receptor, la supervivencia de los pacientes es superior al 75% (76, 149, 186). Sin embargo, cuando las CMHs provienen de un donante no-familiar, la supervivencia se reduce de forma significativa (76, 89, 251). En los pacientes con AF, todas las complicaciones asociadas a los trasplantes alogénicos son más severas que en otras patologías, aumentadas por un mayor índice de fallo de injertos, además de una mayor incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH) y de infecciones oportunistas (148, 251).

Un problema añadido en el tratamiento de los pacientes de AF es la mayor toxicidad relacionada con el acondicionamiento, pues son extremadamente sensibles a la quimioterapia y la radioterapia de los mismos. Así, el acondicionamiento podría acelerar el desarrollo de neoplasias secundarias, en particular carcinomas escamosos de cabeza y cuello (57, 202).

4.4.2.-Nuevas terapias para el tratamiento de la Anemia de Fanconi.

El reducido número de donantes histocompatibles sanos para realizar trasplantes alogénicos, ha llevado a alternativas tales como el trasplante alogénico de CMHs de hermanos seleccionados genéticamente, la utilización de nuevas terapias farmacológicas, como el uso de anti-TNF α (85, 246) y la terapia génica.

4.4.2.1.- Terapia génica en Anemia de Fanconi.

En algunos pacientes se han detectado mutaciones espontáneas que han revertido la mutación original en algún progenitor de la MO, denominándoles pacientes mosaico (33). En ellos existe una ventaja proliferativa de los progenitores revertidos, que impulsa a la selección y amplificación del clon generado (88). Este hecho sustenta la idea de que la corrección del defecto génico en un pequeño número de CMHs podría extenderse a toda la hematopoyesis generada por las CMHs corregidas mediante técnicas de terapia génica. Por lo tanto, el trasplante autólogo de CMHs corregidas, podría suponer una alternativa terapéutica eficaz para pacientes con AF (91, 108, 138).

La terapia génica se define como una modalidad terapéutica mediante la cual se inserta, se elimina o se sustituye un determinado gen en células, para corregir un defecto genético o para dotar las células de una nueva función. Las terapias *ex vivo* nos permiten manipular las células *in vitro* para su corrección génica y administrárselas posteriormente al paciente (106, 164).

En la década de los 90 se llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos de terapia génica, uno en pacientes de AF con mutaciones en *FANCC* (139) y otro en pacientes de AF con mutaciones en *FANCA* (108). En estos ensayos, a pesar de que inicialmente se detectaron células corregidas en la sangre periférica de los pacientes, no se produjo un injerto de forma estable (108, 138, 139).

Actualmente según el portal www.clinicaltrials.gov, hay registrados más de 70 ensayos clínicos en anemia de Fanconi, de los cuales dos son de terapia génica con vectores retrovirales y trasplantes autólogos de las células corregidas.

Uno de esos ensayos clínicos es el coordinado por la división de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético del CIEMAT, el ensayo clínico FANCOLEN, para el tratamiento de pacientes con AF del grupo de complementación A. En este ensayo clínico, los pacientes serán trasplantados con células autólogas transducidas con un vector lentiviral portador del gen *FANCA*.

4.4.2.2- Vectores lentivirales para la terapia génica de la Anemia de Fanconi.

Los vectores utilizados para la transferencia génica pueden ser vectores virales (integrativos y no integrativos) o no virales (no integrativos), siendo los vectores virales integrativos los más eficaces y los más utilizados para la transducción de CMHs, ya que permiten la transmisión de los transgenes a la progenie de las CMHs transducidas.

Los vectores lentivirales, que conforman un género importante dentro de la familia *Retroviridae*, son los vectores más comúnmente utilizados actualmente en terapia génica de CMHs (2, 25, 173, 196). El vector más utilizado de este género es el derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), que infecta tanto a células en división como en estado quiescente (250). Son más seguros, pues tienen menos riesgo de producir oncogénesis insercional al no tener preferencia por integrarse en el sitio de inicio de la transcripción (167, 205).

En el año 2010 nuestro grupo presentó a la Agencia Europea del Medicamento el vector lentiviral PGK-*FANCA*-wPRE^{MUT} diseñado para la corrección genética de células de pacientes con AF del grupo de complementación A (79). Tras su aprobación como Medicamento Huérfano por la Comisión Europea (EU/3/10/822) (61), este vector fue propuesto como herramienta para la terapia génica en pacientes con mutaciones en el gen *FANCA* (236).

El vector PGK-*FANCA*-wPRE^{MUT} contiene en 5' y 3' las secuencias LTR (*Long Terminal Repeat*) del virus VIH-1 mutadas, que dejan de ser funcionales tras la integración. A continuación se

encuentra una señal de empaquetamiento o Ψ (Psi) y la secuencia promotora del gen humano PGK (*Phosphoglycerate Kinase*), promotor interno fisiológico que dirige la expresión ubicua y moderada del gen que se coloque en 5'. Tras el promotor, se halla el ADNc que codifica la proteína humana de la AF del grupo de complementación A (gen *FANCA*) y la secuencia mutada $wPRE^{MUT}$ (*Woodchuck Hepatitis Virus post-transcriptional regulatory element*) del virus de la hepatitis de la marmota, para aumentar la estabilidad de los ARNm, aumentando la cantidad de proteína generada por el transcrito (79).

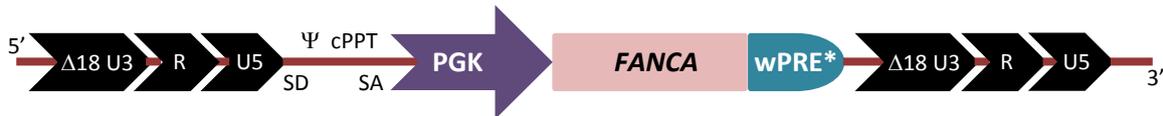


Figura 6: Esquema del vector PGK-*FANCA*- $wPRE^{MUT}$.

4.5.- Modelo de ratón para la anemia de Fanconi.

Los modelos de ratón representan una herramienta imprescindible para estudiar tanto los mecanismos implicados en el desarrollo de las patologías, como para desarrollar nuevas terapias. En la AF se han desarrollado diversos modelos animales deficientes en alguno de los genes implicados en la ruta de AF, lo que ha permitido avanzar en el campo de la investigación básica y preclínica de la enfermedad. El gen *FANCA* es el gen mutado en alrededor del 80% de los pacientes con AF españoles (33), por lo que el modelo de ratón deficiente en este gen es una buena herramienta para estudiar la enfermedad y testar tratamientos para estos pacientes.

En este trabajo hemos utilizado un modelo de ratón *Fanca*^{-/-} desarrollado por Cheng y colaboradores (42) en el año 2000. En él, los exones del 4 al 7 del gen *Fanca* fueron reemplazados por un marcador *LacZ-Neo*. Este modelo de ratón presenta un fenotipo atenuado en comparación con lo observado en los pacientes. Los estudios realizados en nuestro laboratorio sobre el fenotipo hematológico de estos ratones han demostrado que los progenitores de MO presentan una alta sensibilidad a MMC, así como al estrés producido por el cultivo *ex vivo* (42, 200). Sin embargo, a diferencia de los pacientes, las alteraciones observadas no suponen el desarrollo de una anemia aplásica ni presentan alteraciones óseas al nacimiento. Los estudios han mostrado que el fenotipo de estos ratones puede ser rescatado por la expresión de ADNc del gen humano *FANCA*, por lo que este modelo de ratón supone una herramienta importante para ensayar futuros protocolos de terapia génica (200).

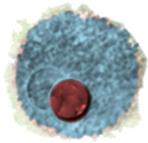


Objetivos

Diferentes estudios pre-clínicos han demostrado que la co-infusión de células estromales mesenquimales (MSCs) con células madre hematopoyéticas (CMHs) mejoran el injerto hematopoyético en ratones inmunodeficientes. Por otra parte, en estudios clínicos en pacientes sometidos a trasplante hematopoyético alogénico con riesgo de fallo de injerto, se ha observado que el co-trasplante de CMHs con MSCs también disminuye dicho fallo de injerto. A pesar de estos resultados, se desconoce si el efecto beneficioso de las MSCs sobre el injerto observado en los trasplantes alogénicos se limita a las propiedades inmunosupresoras de las MSCs o si existen otros mecanismos implicados. Para verificar esta posibilidad, en este trabajo se ha investigado si el efecto beneficioso de las MSCs sobre el injerto de CMHs se reproduce en modelos de trasplante autólogo en donde se dispone de un número reducido de CMHs o con riesgo de fallo de injerto.

Con esta finalidad, en esta Tesis Doctoral se han propuesto los siguientes objetivos:

- **1.-** Analizar el impacto de las MSCs sobre el injerto hematopoyético en un modelo de trasplante autólogo realizado en condiciones limitantes para el injerto. Para ello se han realizado trasplantes de un número reducido de CMHs en receptores acondicionados con dosis submieloablativas de radiación.
- **2.-** Identificar los mecanismos implicados en la posible mejora del injerto hematopoyético mediado por la co-infusión de las MSCs junto con las CMHs.
- **3.-** Estudiar el efecto de las MSCs sobre el injerto hematopoyético en un modelo de terapia génica de relevancia clínica en ratones con anemia de Fanconi del subtipo A.



Materiales y Métodos

1.- Experimentación animal.

Todos los procedimientos animales fueron llevados a cabo siguiendo la legislación nacional y europea (RD 53/2013 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para la protección y el uso de animales de experimentación científica, la Ley 6/2013 para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio y la Directiva Europea 2010/63/UE para la protección de animales de laboratorio).

La cría y mantenimiento de los animales se llevó a cabo en el Servicio del Animalario del CIEMAT (número de registro ES280790000183). Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros Hepa, humedad relativa de $55 \pm 15\%$ y temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con ciclos de luz/oscuridad de 12h, alimentación *ad libitum* con pienso UAR A04 (UAR, Villemoisson-sur-Orge, Francia) y de bebida agua irradiada con luz ultravioleta con, al menos, 4 partes por millón de cloro residual libre. El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinelas, de acuerdo con los procedimientos recomendados por la SECAL (Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio), así como las de su equivalente europeo FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) y de acuerdo a los principios éticos y de bioseguridad de nuestro centro.

Asimismo, todos los procedimientos de irradiación siguieron los criterios y normas de Protección Radiológica que recoge la legislación vigente (Reglamento sobre Instalaciones Nucleares y Radiactivas Real Decreto 1836/1999 de 3 de Diciembre; Reglamento sobre Protección Sanitaria contra Radiaciones Ionizantes Real Decreto 783/2001 de 6 de Julio).

1.1.- Cepas empleadas.

Las parejas reproductoras originales de cada cepa fueron obtenidas de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, MA, EEUU). En el primer bloque de experimentos se utilizaron ratones (*Mus musculus*) B6D2F1 y ratones B6D2F1-Ptprc (P3D2F1). En el segundo bloque de experimentos se utilizaron ratones FVB/NJ y ratones FVB-*Fanca* ^{$\Delta\text{E4-E7.Ins.LacZNeo}$} (referidos como *Fanca*^{-/-}), todos ellos de 10-12 semanas (Tabla 1).

Cepa	Sexo	H2	CD45	Fanca $\Delta E4-E7$	Donante/ Receptor	Obtención Ad-MSC
B6D2F1	♀	b/d	CD45.2/CD45.2	-	Receptor	+
P3D2F1	♀	b/d	CD45.1/CD45.2	-	Donante	-
FVB	♀	q/q	CD45.1/CD45.1	-	Receptor	+
	♂				Donante	
FVB- <i>Fanca</i> ^{-/-}	♀	q/q	CD45.1/CD45.1	+	Receptor	-
	♂				Donante	

Tabla 1: Características de las cepas de ratón utilizadas en los experimentos.

El modelo de ratón utilizado como modelo de AF (FVB-*Fanca* ^{$\Delta E4-E7$.Ins.LacZNeo}) fue desarrollado por Cheng y colaboradores (42). Los fundadores de la colonia presente en el Servicio de Animalario del CIEMAT fueron obtenidos del Dr. Fre Arwert, del Departamento de Genética Clínica y Genética Humana de la Free University, Ámsterdam (Holanda).

2.- Células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs).

2.1.- Obtención y cultivo de las Ad-MSCs.

Se sacrificaron ratones hembra B6D2F1 y FVB por inhalación de CO₂ y se extrajo el tejido adiposo del epiplón. Las muestras se disgregaron con ayuda de un bisturí y se digirieron con 1mg colagenasa A (Roche Diagnostics, Alemania) por cada 0,5 g de tejido en 1mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL, EEUU) durante 4h a 37°C y 5% CO₂. Al cabo de 4h, las células se filtraron por un filtro de nylon de 0,40 μ m (BD Bioscience, EEUU), se centrifugaron 10 minutos a 1400 r.p.m. a temperatura ambiente y se resuspendieron en medio MesenCult (StemCell Technologies, Canadá) suplementado con *Mesenchymal Mouse Supplements* (StemCell Technologies), 0,5% antibiótico (penicilina/estreptomicina, Gibco BRL) y 1% L-Glutamina 200mM (Gibco BRL). Las células se sembraron a una concentración de $1,6 \times 10^5$ cel/cm² en frascos de cultivo para su adhesión a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. Al cabo de 24h se lavaron y se resuspendieron en medio MesenCult suplementado.

Al alcanzar una confluencia del 75-80%, las Ad-MSCs se despegaron con Tripsina/EDTA 0,05% (Sigma-Aldrich, EEUU) durante 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Se añadió medio Mesencult completo y se centrifugó 10 minutos a 1400 r.p.m. a temperatura ambiente. Las Ad-MSCs se sembraron a una concentración de 4x10³ cel/cm². El medio de cultivo suplementado se cambió 2 veces por semana.

2.2.- Caracterización y diferenciación de las Ad-MSCs.

2.2.1.- Análisis del inmunofenotipo.

Las Ad-MSCs se despegaron con Tripsina-EDTA 0,05%, se centrifugaron 10 minutos a 1400 r.p.m. y se resuspendieron en PBA (PBS 1x con 0,1% albúmina de suero bovina (BSA, Fraction V; Sigma) y con 0,02% NaN₃). Se incubaron alícuotas de 10⁵ células con los anticuerpos monoclonales CD29, CD34, CD44, CD45.1, CD45.2, CD73, CD80, CD90.1, CD90.2, CD105, CD106, CD144, CD166 y Sca-1 (BD Pharmingen), durante 20 minutos a 4°C. Las células marcadas se lavaron dos veces con PBA y se resuspendieron en 10 µg/ml DAPI/PBA (Boehringer, Alemania) para excluir las células no viables. Para el análisis del inmunofenotipo se utilizó un citómetro de flujo Fortessa (BD Bioscience, EEUU) y los datos resultantes se analizaron mediante el software Flowjo (Flowjo LLC, EEUU).

2.2.2.- Capacidad de diferenciación.

Se sembraron 6x10⁴ Ad-MSCs en placas de 35mm (Nunc, EEUU) y se añadió medio de diferenciación compuesto por α-MEM (Gibco) suplementado con 10% de suero Hyclone (Thermo Scientific, EEUU), 200 mM L-Glutamina, 0,5% antibiótico, suplementado con 1µM dexametasona, 5 µg/ml insulina y 4,5 g/L glucosa (todos de Sigma-Aldrich). Cada 3 días se cambió el medio de diferenciación y a los 21 días de cultivo, se valoró la presencia de gotas lipídicas teñidas con *Oil Red O* (Sigma-Aldrich).

Para determinar la capacidad de diferenciación de las Ad-MSCs a tejido óseo, se sembraron 6x10⁴ células en placas de 35mm y se añadió medio de diferenciación compuesto por α-MEM suplementado con 10nM dexametasona, 10 mM β-glicerolfosfato y 50 mg/ml ascorbato-2-fosfato (todos de Sigma-Aldrich). Se cambió el medio cada 3 días y el día 14 del cultivo se valoró la presencia de fosfatasa alcalina mediante la tinción con *Fast BCIP/NBT* (Sigma-Aldrich).

3.- Purificación de células madre hematopoyéticas con fenotipo LSK.

Se sacrificaron ratones donantes (hembras P3D2F1, machos FVB-WT o machos *Fanca*^{-/-}) en una cámara de CO₂. Se extrajeron los fémures y las tibias y se obtuvo la médula ósea perfundiendo los huesos con 1 ml de medio DMEM sin suero, utilizando jeringas de 1 ml con agujas de 0,5 x 16 mm. La suspensión celular se incubó con solución de lisis (CINH₄ + CO₃HK 1M + EDTA 0,5M) (Merck, EEUU) durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con PBE (PBS 1x + 0,5 % BSA + 5 mM de EDTA) y se contaron en cámara de *Neubauer* con azul tripán (Sigma-Aldrich). Para obtener una población pura de células con fenotipo linaje negativo, Sca-1 positivo, c-Kit positivo (LSK) se procedió a su separación celular por citometría de flujo. Para ello se marcaron las células con anticuerpos contra los marcadores de linaje Ly-6G (Gr-1), CD45R (B220), CD-3, CD11b y Ter-119 conjugados con isocianato de fluoresceína (FITC), con el anticuerpo Sca-1 conjugado con ficoeritrina (PE) y el anticuerpo c-Kit conjugado con el tándem ficoeritrina-cianina 7 (PE-Cy7) (todos ellos de BD Bioscience Pharmigen, EEUU), durante 20 minutos. Tras el lavado de las células con PBE, se resuspendieron en PBE y se procedió a la separación de la población LSK, mediante el equipo de citometría de flujo BD Influx (BD Bioscience) (Figura 7).

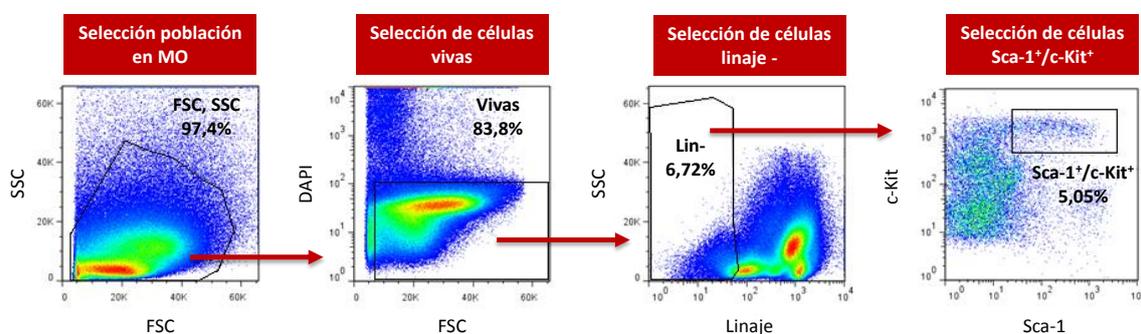


Figura 7: Ejemplo representativo de la estrategia seguida para la separación celular.

4.- Transducción de células LSK de ratones *Fanca*^{-/-}.

La transducción de células LSK se llevó a cabo empleando el sobrenadante del vector lentiviral (LV)-PGK-FANCA-wPRE^{MUT} diseñado para el protocolo clínico Fancolen, producido por la compañía Genethon (París, Francia), con un título de 2×10^8 UT/ml.

Para realizar la transducción de las células LSK-*Fanca*^{-/-}, éstas se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 cel/ml en medio StemSpan (StemCell Technologies) conteniendo las citoquinas mSCF (50 ng/ml), hTPO (20 ng/ml), hFlt3 (25 ng/ml), hIL-3 (10 ng/ml) e hIL-6 (25 ng/ml) (Eurobiosciences, Alemania). Se dispensaron 40.000 células en cada pocillo de una placa

p96 de pocillos de fondo redondo y se añadió el sobrenadante lentiviral a una MOI 200. En todos los casos, la transducción de las células se llevó a cabo en placas tratadas previamente con Retronectina® (Takara) ($2\mu\text{g}/\text{cm}^2$) durante 4h a temperatura ambiente y las células fueron incubadas con el sobrenadante lentiviral a 37°C durante toda la noche.

Como control de transducción se utilizó el sobrenadante lentiviral del vector PGK-eGFP-wPRE^{MUT} producido previamente en el laboratorio aplicando las mismas condiciones de transducción que las utilizadas con el sobrenadante LV-PGK-FANCA-wPRE^{MUT}. Como control negativo se sometió a células LSK *Fanca*^{-/-} a las mismas condiciones de cultivo que las células transducidas, sustituyendo el volumen del sobrenadante infeccioso por medio StemSpan.

Una vez finalizada la transducción, las células se lavaron, se contaron y se resuspendieron en PBS para su posterior infusión.

5.- Caracterización de las células LSK de ratones *Fanca*^{-/-}.

5.1.- Análisis de ciclo celular.

Se sacrificaron ratones *Fanca*^{-/-} y FVB-WT, se extrajo su MO y se realizó una inmunoselección de células linaje negativo con el kit comercial de depleción inmunomagnética *Lineage cell depletion kit mouse* (Miltenyi Biotec, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un millón de células Lin⁻ se resuspendieron en 1 ml de una solución de unión a Hoechst (HEPES 20mM, glucosa 5,5mM y 10% Hyclone) y se tiñeron para ADN y ARN utilizando Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) y Pironina Y (Sigma Aldrich) durante 45 min a 37°C . Posteriormente fueron teñidas para el fenotipo LSK con los anticuerpos monoclonales de linaje hematopoyético conjugados con FITC, con el anticuerpo Sca-1 conjugado con el tándem APC-cianina 7 (APC-Cy7) (Biolegend, EEUU) y el anticuerpo c-Kit conjugado con el tándem ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5) (eBioscience, EEUU). Las células fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el equipo BD Influx. Para el análisis de las distintas poblaciones del ciclo celular, se siguió la estrategia reflejada en la Figura 8.

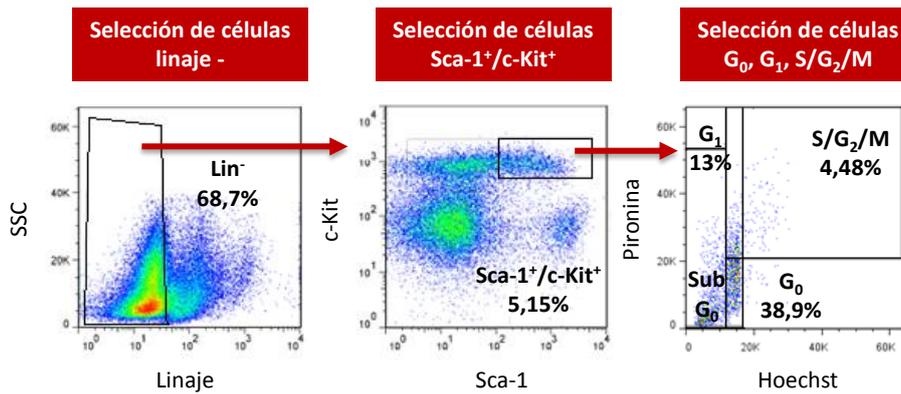


Figura 8: Ejemplo representativo de la estrategia seguida para la selección de las poblaciones G₀, G₁ y S/G₂/M.

En otro grupo de experimentos, se evaluó el ciclo celular de células LSK *Fancc^{-/-}* transducidas con el vector LV-PGK-FANCA-wPRE^{MUT}, de células LSK-*Fancc^{-/-}* y de células LSK-WT. Todas las células LSK fueron mantenidas en cultivo a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad durante la noche. Al día siguiente, 20.000 células de cada tipo fueron resuspendidas en 1 ml de una solución de unión a Hoechst (HEPES 20mM, glucosa 5,5mM y 10% de suero) y teñidas para ADN y ARN siguiendo el mismo protocolo que con las células en fresco.

5.2.- Análisis de progenitores hematopoyéticos.

Se estudiaron los progenitores hematopoyéticos a largo plazo (LT del inglés *long term*), a corto plazo (ST del inglés *short term*) y los progenitores multipotentes (MPP del inglés *multipotent progenitors*). Para ello, se extrajeron fémures y tibias de ratones *Fancc^{-/-}* y FVB-WT, se perfundieron y se marcaron 500.000 células de MO con anticuerpos monoclonales para el fenotipo LSK durante 20 min a 4°C. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales de linaje hematopoyético conjugados con biotina (BD Bioscience Pharmigen) y como anticuerpo secundario el anti biotina BV650 (Molecular Probes), el anticuerpo Sca-1 conjugado con APC-Cy7, el anticuerpo c-Kit conjugado con PE-Cy7, el anticuerpo CD34 conjugado con FITC (eBioscience) y el anticuerpo Flk2 (CD135) conjugado con PE (BD Bioscience Pharmigen). Las células fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el equipo BD Fortessa siguiendo la estrategia reflejada en la Figura 9 para el análisis de las distintas poblaciones.

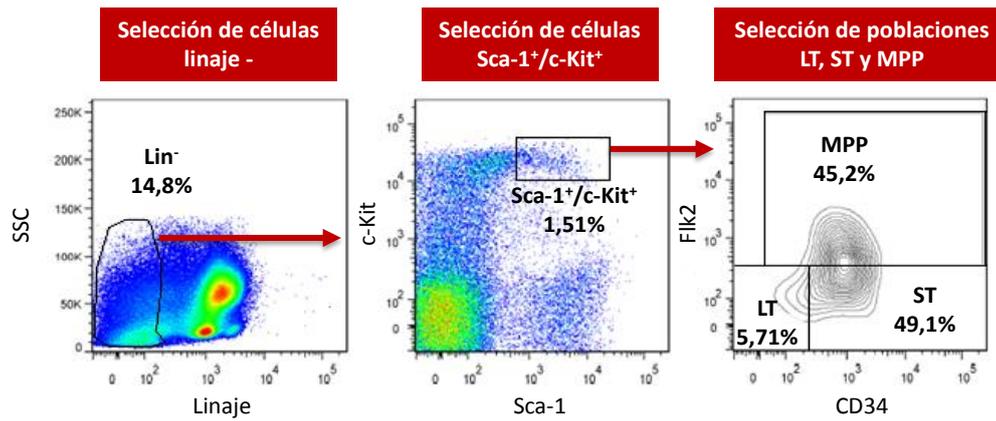


Figura 9: Ejemplo representativo de la estrategia seguida para la selección de las poblaciones LT, ST y MPP.

5.3.- Análisis de expresión de moléculas de adhesión y migración.

Se estudió la expresión de las moléculas de adhesión (VCAM-1/VLA-4 e ICAM-1/LFA-1) y de migración (CXCR4) implicadas en el anidamiento de las células LSK en la MO. Para ello, se sacrificaron ratones *Fanca*^{-/-} y ratones FVB-WT y se extrajo su MO. Se marcaron 500.000 células de cada tipo con anticuerpos monoclonales para el fenotipo LSK con los anticuerpos monoclonales de linaje hematopoyético conjugados con biotina y como anticuerpo secundario el anti biotina BV650, con el anticuerpo Sca-1 conjugado con el tándem APC-Cy7 y el anticuerpo c-Kit conjugado con el tándem PE-Cy7 durante 20 min a 4°C. Además, se marcaron las células con los anticuerpos de adhesión y migración que se muestran en la Tabla 2. Las células fueron analizadas por citometría de flujo utilizando el equipo BD Fortessa.

Molécula	Anticuerpo	Casa comercial
VCAM-1	CD106-APC	BioLegend
VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$)	CD49d-PE	BD Pharmigen
	CD29-FITC	BD Pharmigen
ICAM-1	CD54-APC	BioLegend
LFA-1 ($\alpha L\beta 2$)	CD11a-PE-Cy7	BD Pharmigen
	CD18-FITC	BD Pharmigen
CXCR4	CD184-PE	eBioscience

Tabla 2: Anticuerpos de adhesión y migración utilizados para valorar su expresión en células LSK y MO.

6.- Ensayos clonogénicos.

Se cuantificaron los progenitores hematopoyéticos en función de su capacidad para formar colonias en metilcelulosa (Células Formadoras de Colonias, CFCs). Para ello, se sembraron 150 células LSK por ml de metilcelulosa (MethoCult GF M3534, StemCell Technologies Inc.) en placas de 35mm (Corning, EEUU). Las células se cultivaron a 37°C al 5% de CO₂ y 90% de humedad durante 7 días, tras los cuales se cuantificó el número total de colonias por microscopía óptica (Nikon, Alemania), considerando una colonia como una agrupación de 50 células o más. Para calcular la eficacia de formación de CFCs, se dividió el número colonias obtenidas entre el número total de células sembradas. Los resultados se expresaron en forma de porcentaje.

En los ensayos con células LSK *Fancc*^{-/-} transducidas, los ensayos clonogénicos se realizaron en presencia o ausencia de MMC a distintas concentraciones (0, 3, 10, 30 y 100 nM) durante 7 días a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, tras los cuales se cuantificó el número total de colonias en cada concentración de mitomicina-C por microscopía óptica. Como control negativo, se sembraron células sin transducir en las mismas condiciones.

7.- Trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Ratones receptores (B6D2F1, FVB-WT o *Fancc*^{-/-}) fueron irradiados de forma submieloablativa el día -1 con diferentes intensidades de acondicionamiento (7 Gy, 5 Gy o 3 Gy) en un equipo de rayos-X MG324 (Philips, Hamburgo, Alemania), a 300kV y 10mA, con una dosis de 1,03 Gy/min. Los trasplantes se realizaron el día 0 con un número variable de células LSK procedentes de los ratones donantes (P3D2F1, FVB-WT o *Fancc*^{-/-}). Junto con las células LSK, en algunos grupos se infundió un número variable de células Ad-MSCs en un volumen final de 300µl. El efecto de la irradiación sobre la hematopoyesis de los receptores se verificó mediante grupos control que recibieron la irradiación pero no la infusión de progenitores hematopoyéticos

7.1.- Trasplantes seriados de progenitores hematopoyéticos en ratones B6D2F1.

Para comprobar la capacidad de repoblación de las células LSK infundidas en los receptores primarios B6D2F1, se llevaron a cabo trasplantes seriados. Los receptores primarios fueron irradiados con una dosis submieloblaviva de 5 Gy el día -1 y trasplantados el día 0 con 1.500 células LSK P3D2F1 con o sin 600.000 Ad-MSC B6D2F1. A las 24 semanas tras el trasplante,

los receptores fueron sacrificados y se extrajo su MO. Los receptores secundarios B6D2F1 fueron acondicionados con una dosis mieloablata de 11 Gy (dividida en dos dosis de 5,5 y 5,5 Gy separadas 24h) y trasplantados con 2×10^6 de células de la MO procedente de los receptores primarios que habían recibido LSK o LSK-Ad-MSCs. Doce semanas después del trasplante, los receptores secundarios B6D2F1 fueron sacrificados y se siguió el mismo protocolo que en los trasplantes secundarios para la realización de los trasplantes terciarios (Figura 10).

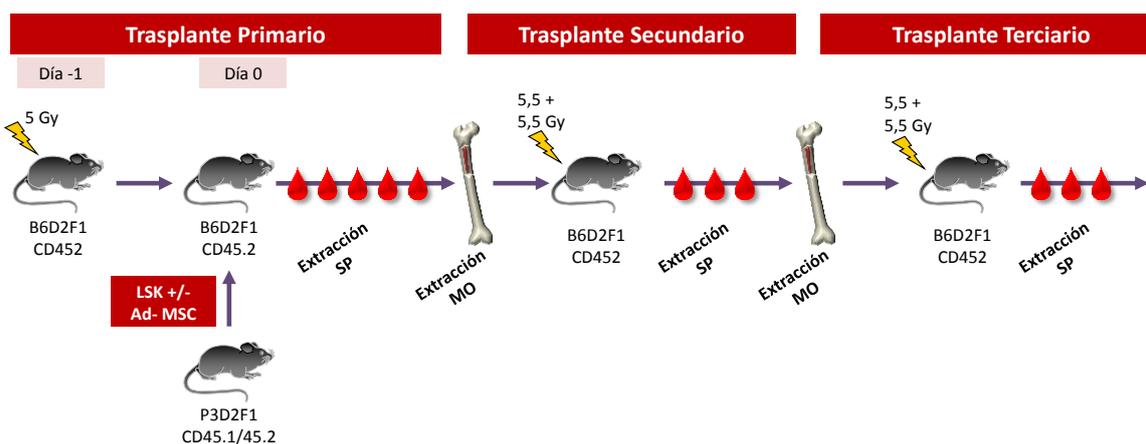


Figura 10: Esquema del protocolo seguido para la realización de los trasplantes seriados.

7.2.- Análisis de quimerismo por citometría de flujo en receptores B6D2F1.

Para la evaluación del quimerismo, se extrajeron 200 μ l de sangre de la vena lateral de la cola de los ratones en las semanas 4, 8, 12, 16 y 24 tras el trasplante. La sangre se mezcló con 20 μ l de anticoagulante EDTA (0,5M pH=8) en el momento de la extracción.

El porcentaje de injerto hematopoyético de células de donantes P3D2F1 (CD45.1/CD45.2) en los receptores B6D2F1 (CD45.2) se evaluó mediante análisis por citometría de flujo de muestras de sangre periférica obtenidas tras el trasplante. Las muestras se marcaron con el anticuerpo CD45.2 conjugado con FITC y con el anticuerpo CD45.1 conjugado con PE (BD Bioscience Pharmingen). La viabilidad fue evaluada resuspendiendo las células en 10 μ g/ml DAPI/PBA. El injerto hematopoyético se determinó por el porcentaje de células CD45.1/ CD45.2 frente a la reconstitución endógena (CD45.2) valorado por citometría de flujo y analizado por el soporte informático FlowJo.

7.3.- Análisis del quimerismo por PCR cuantitativa (qPCR) en receptores FVB-WT/*Fanca*^{-/-}.

La reconstitución hematopoyética a partir de células del donante macho *Fanca*^{-/-} o FVB-WT en receptores hembra *Fanca*^{-/-} o FVB-WT, se valoró por PCR cuantitativa (qPCR) en las semana 4,8 y 12 después del trasplante. A las 16 semanas se sacrificaron las receptoras y se extrajo la SP, MO, bazo y timo. Las muestras fueron lisadas y se extrajo el ADN genómico empleando el kit comercial *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel, Alemania). Para conocer la concentración de ADN eluido, las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría (NanoDrop®) y ajustadas a una concentración de 10ng/μl.

Se añadieron 4 μl del ADN eluido sobre una mezcla de PCR Taqman (*Universal PCR Master Mix*, Roche) con cebadores (Grupo Taper, Alcobendas, España) y sonda (Sigma-Aldrich) específicos para las secuencias del gen masculino *Sry* y o para el gen de la β -actina de ratón (Tabla 3). Para extrapolar los valores se incluyeron varios puntos de una curva de ADN genómico de células de MO de ratones macho/hembra (desde 0% macho a 100% macho), extraída en las mismas condiciones que las muestras a analizar. La qPCR fue realizada en una máquina Rotor-Gene 6 (Corbet, Australia). Para la amplificación se siguió un protocolo de 95°C (10 min) seguido de 40 ciclos de 95°C (30 seg) y 58°C (30 seg).

Amplicón	pb	Cebadores/Sonda	Fluoróforo	Secuencia 5' → 3'
Sry	140	Cebador <i>Sry Forward</i>		TGTCAGCCCTACAGCCACA
		Cebador <i>Sry Reverse</i>		CCTCTCACCACGGGACCAC
		Sonda <i>Sry</i>	6-FAM	ACAATTGTCTAGAGAGAGCATGGAGGGCCA
β -actina	131	Cebador β actina <i>Forward</i>		ACGCCAGGTCATCACTATTG
		Cebador β actina <i>Reverse</i>		ACTATGGCCTCAGGAGTTTTGTCA
		Sonda β actina	Joe	AACGAGCGGTTCCGATGCCCT

Tabla 3: Cebadores y sondas para el análisis de quimerismo por qPCR.

El porcentaje de injerto de células del macho (donante) en la receptora hembra fue calculado en base al método $\Delta\Delta Ct$ (141) (*delta delta cycle threshold value*), el cual proporciona un valor sobre la expresión del gen relativa y normalizada. Estos cálculos se realizan a través de la normalización del gen de interés con un gen de referencia endógeno, cuya expresión se considera que no varía entre las distintas muestras.

Para la expresión del gen *Sry*, las muestras fueron normalizadas con los niveles de expresión del gen de referencia β -*actina*, lo que dio como resultado el valor ΔCt .

$$\Delta Ct = Ct \beta\text{-actina} - Ct Sry$$

Este valor fue exponencialmente transformado ($2^{\Delta Ct}$) y extrapolado a una ecuación de la recta obtenida de los datos de la curva de ADN genómico. Como resultado se obtuvo el porcentaje de células de macho presentes en la receptora hembra y por tanto el porcentaje de injerto.

7.4.- Evaluación del número de copias del vector en ratones *Fanca*^{-/-}.

El número de copias del vector (VCN del inglés *vector copy number*) indica el número de copias provirales integradas por cada célula transducida. Este parámetro se valoró tanto en las colonias resultantes de los ensayos clonogénicos de supervivencia de MMC de células *Fanca*^{-/-} transducidas con el vector LV-PGK-FANCA-wPRE^{MUT}, como en los órganos (SP, MO, Bazo y Timo) de los ratones receptores de estas células transducidas.

Para la obtención del ADN genómico se utilizaron las colonias procedentes de los ensayos clonogénico, a las que se añadió 20 μ l/muestra de una solución de lisis (Tris HCl 0,3 mM, CaCl₂ 0,6 mM, 1,5% Glicerol, 0.675% Tween20 y Proteinasa K 0,3 μ g/ μ l). Las muestras se incubaron durante 30 min a 65°C, 10 min a 90°C y 10 min a 4°C. Por otro lado, para la obtención del ADN genómico de los órganos analizados se utilizó el kit comercial *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel).

El genoma proviral y el genoma celular fueron amplificados y cuantificados por qPCR con una mezcla de PCR TaqMAN con cebadores (Grupo Taper) y sondas (Sigma-Aldrich) específicos para los genes *Psi* y *Titina* (Tabla 4). La secuencia empaquetadora *Psi* fue utilizada para cuantificar el genoma viral mientras que el gen *Titina* fue utilizado para cuantificar el genoma del ratón en las células transducidas.

La qPCR fue realizada en una máquina Rotor-Gene 6 (Corbet, Australia). Para la amplificación se siguió un protocolo de 95°C (10 min) seguido de 50 ciclos de 95°C (30 seg) y 58°C (30 seg).

Amplicón	pb	Cebadores/Sonda	Fluoróforo	Secuencia 5'→3'
Psi	130	Cebador Psi F		CAGGACTCGGCTTGCTGAAG
		Cebador Psi R		TCCCCGCTTAATACTGACG
		Sonda Psi	6-FAM	CGCACGGCAAGAGGCGAGG
Titina	123	Cebador Titina F		AAAACGAGCAGTGACGTGAGC
		Cebador Titina R		TTCAGTCATGCTGCTAGCGC
		Sonda Titina	Texas-Red	TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC

Tabla 4: Cebadores y sondas para el análisis de VCN por qPCR.

Para la cuantificación del genoma viral y celular se interpoló el valor Ct de las muestras en una ecuación de la recta resultante de los valores Ct obtenidos de una curva con diluciones 1:10 de un plásmido (pRRL.PGK.eGFP/Titina), que contiene un número conocido de copias de ambas secuencias. El número de células correspondiente al número de copias de *Titina* calculado se determinó asumiendo que cada célula contiene dos copias de *Titina*. Finalmente el VCN se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$VCN = \frac{\text{número de copias provirales}}{\left(\frac{\text{número de copia de Titina}}{2}\right)}$$

8.- Ensayos de biodistribución.

Células LSK P3D2F1, FVB-WT o *Fanca*^{-/-} fueron teñidas con el colorante vital DiD (Molecular Probes, EEUU) y las Ad-MSCs B6D2F1 con el colorante vital CFSE (del inglés *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Life Technologies, EEUU) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Tras la tinción, 10.000 LSK fueron infundidas con o sin 6x10⁵ Ad-MSCs por vía intravenosa en receptores B6D2F1 o *Fanca*^{-/-} irradiados con una dosis submieloablative de radiación de 5 Gy.

A las 2h, 4h y 24h tras el trasplante, los ratones fueron sacrificados y se les extrajo los pulmones, bazo, fémur, tibia y sangre total por punción intracardiaca para analizar por citometría de flujo el porcentaje de células LSK-DID⁺ presentes en los órganos. Para ello, los pulmones y los bazos fueron disgregados y lisados con la solución tampón comercial *Red Blood Cell Lysing Buffer* (Sigma). La MO se obtuvo por perfusión las 2 tibias y los 2 fémures y se lisó la solución celular

con una solución de lisis de CINH_4 (0,155 mM CINH_4 , 0,01 mM KHCO_3 , 10^{-4} mM EDTA) durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La sangre periférica fue lisada 2 veces durante 10 min a temperatura ambiente y oscuridad con la misma solución de lisis que la MO. Las células fueron resuspendidas en 300 μl de una solución PBE/DAPI (1:1000) y posteriormente, las muestras fueron valoradas por citometría de flujo en un citómetro Fortessa (BD). La eficiencia de *homing* de las células fue expresado como el porcentaje de células DiD^+ dividido entre el número total de células LSK-Ad-MSCs infundidas. En los análisis en la MO, se asumió que ambos fémures y tibias representan el 25% de la celularidad total de la MO (21).

9.- Ensayos de interacción LSK-Ad-MSCs *in vitro*.

Se tiñeron 1.500 células LSK P3D2F1 con el colorante vital DID y 600.000 Ad-MSCs B6D2F1 fueron teñidas con CFSE siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Las células fueron incubadas juntas en un volumen final de 300 μl durante 10 minutos y se valoró por citometría de flujo la presencia de dobletes $\text{DiD}^+\text{CFSE}^+$, correspondiente a la población LSK-Ad-MSCs con el equipo BDFortessa (Figura 11).

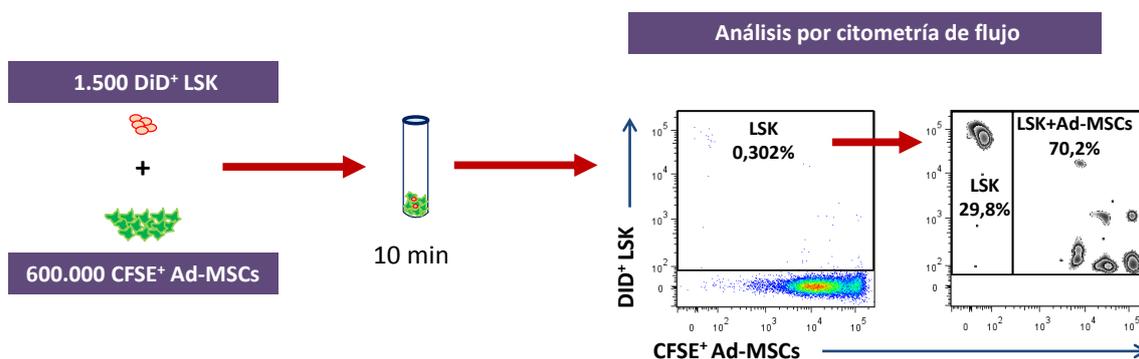


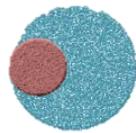
Figura 11: Esquema del protocolo seguido para el análisis de interacción LSK-Ad-MSC.

En otros experimentos, 1.500 células LSK fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal Sca-1-PE (BD Bioscience Pharmigen) y 600.000 Ad-MSC fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal CD29-FITC (BD Bioscience Pharmigen) durante 20 min a 4°C. Posteriormente se lavaron las células con PBE y se incubaron juntas durante 10 min. La solución celular fue analizada usando un citómetro ImageStream100 (Amnis Corp, USA) y se tomaron imágenes de las células utilizando una cámara digital de 6 canales. Cada imagen se descompuso en 6 sub-imágenes, correspondientes a los 6 colores captados por el citómetro.

10.- Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, CA, EEUU). Los datos descriptivos se presentan como media \pm desviación estándar (SD) en los ensayos *in vitro* y como la media más menos el error estándar de la media (SEM) en los ensayos *in vivo*.

Se comprobó la distribución Gaussiana de las muestras a través del test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. En los casos en los que las muestras no demostraron una distribución normal, las comparaciones entre las diferentes condiciones se realizaron utilizando un análisis de Kruskal-Wallis con un test *post-hoc* de Dunn y un análisis ANOVA con un test *post-hoc* de Tukey en los casos en los que las muestras demostraron normalidad. En las muestras en las que no fue posible la realización de un análisis ANOVA al haber sólo dos grupos que comparar, se realizó un t test para muestras pareadas de dos colas cuando se demostró una distribución normal de las muestras y un test de Mann-Whitney en las muestras que no demostraron una distribución normal. Las significancias se expresaron como $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***).



Resultados

1.- Caracterización de las células mesenquimales.

Las MSCs derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs) de ratones B6D2F1 y de ratones FVB se obtuvieron y se expandieron según lo descrito en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos. Las Ad-MSCs crecieron en adherencia y presentaron el aspecto fibroblastoide característico, como puede observarse en la Figura 12 A. Según las recomendaciones de la ISCT, para su identificación se valoró la capacidad de diferenciación a tejido óseo y adiposo y se realizó un análisis del inmunofenotipo.

1.1.- Capacidad de diferenciación de las Ad-MSCs.

Se comprobó que las Ad-MSCs de ratón presentaban capacidad de diferenciación a tejido óseo valorada por la presencia de fosfatasa alcalina teñida con *Fast BCP/NBT* (Figura 12 B) y a tejido adiposo, evidenciado por la presencia de gotas lipídicas teñidas por *Oil Red O* (Figura 12 C).

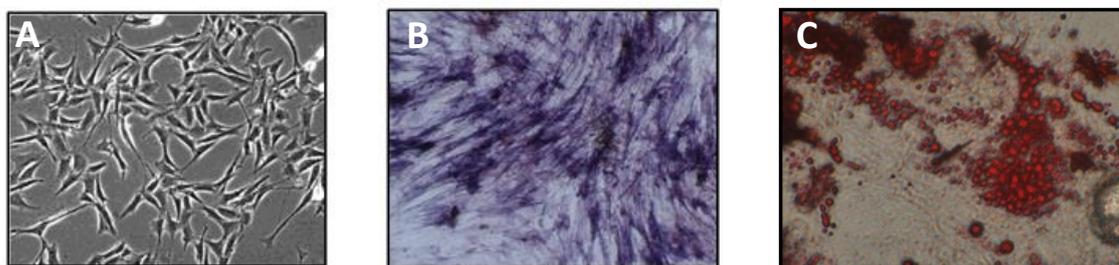


Figura 12: Morfología y diferenciación de las Ad-MSCs. (A) Morfología fibroblastoide. **(B)** Diferenciación a tejido óseo (depósitos de fosfatasa alcalina). **(C)** Diferenciación a tejido adiposo (gotas lipídicas teñidas con *Oil Red*).

1.2.- Inmunofenotipo de las Ad-MSCs.

Las MSCs no tienen un marcador específico, por lo que la caracterización inmunofenotípica de las Ad-MSCs de los ratones B6D2F1 y FVB se realizó utilizando un amplio panel de marcadores de superficie. El análisis por citometría de flujo mostró que tanto las MSCs derivadas del tejido adiposo de ratones B6D2F1 (Figura 13 A) como de ratones FVB (Figura 13 B) eran positivas para los marcadores de superficie CD29, CD44, CD73, CD90.2, CD105, CD106, CD144 y CD166 y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y CD80.

La expresión del marcador Sca-1 fue variable, mostrando una baja expresión en las Ad-MSCs de ratones B6D2F1 y de alrededor del 41% en las Ad-MSCs de ratones FVB.

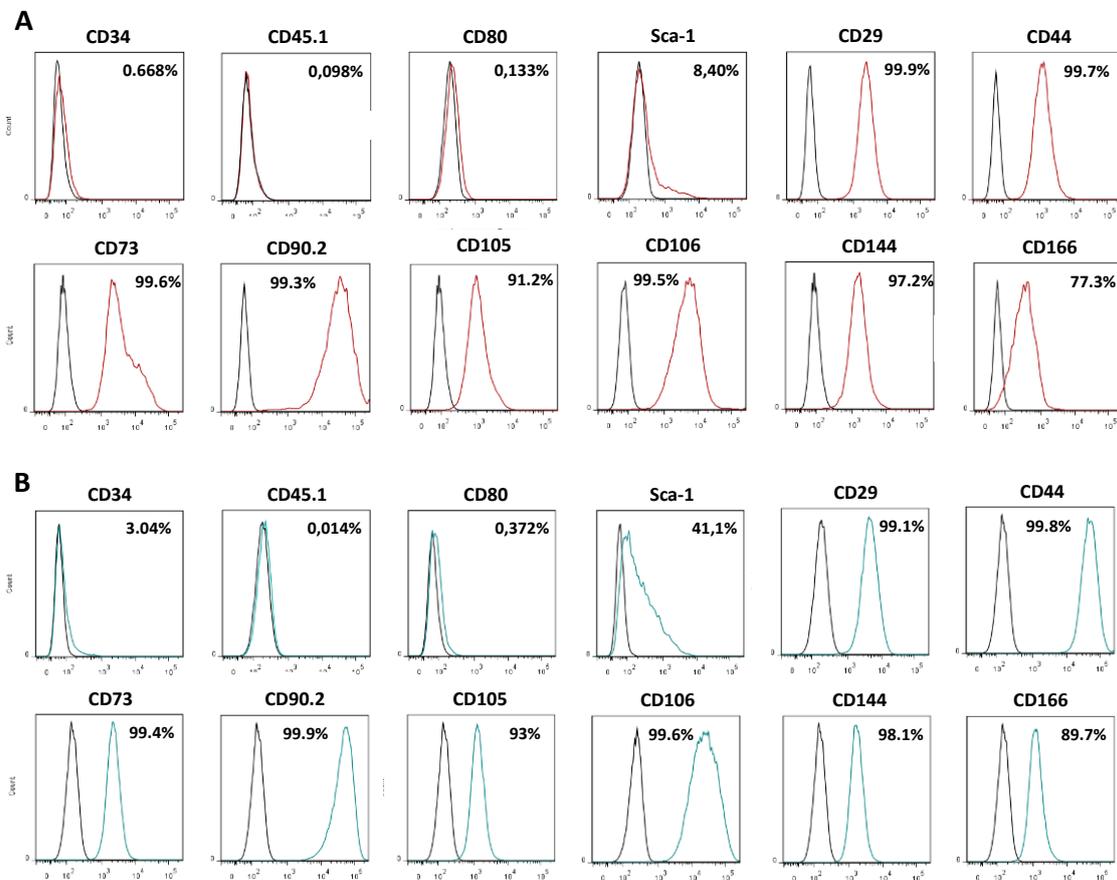


Figura 13: Inmunofenotipo de las MSCs de ratón derivadas de tejido adiposo. **(A)** Ad-MSCs de ratones B6D2F1. **(B)** Ad-MSCs de ratones FVB.

2.- Desarrollo de un modelo de trasplante congénico en receptores B6D2F1.

2.1.- Obtención y caracterización de progenitores hematopoyéticos.

2.1.1- Purificación de células Linaje⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺ (células LSK).

Los progenitores hematopoyéticos de ratón presentan un inmunofenotipo linaje negativo, Sca-1 positivo y c-Kit positivo (LSK). Para obtener células LSK de donantes P3D2F1, las células de MO fueron marcadas con anticuerpos monoclonales, analizadas y purificadas mediante selección por citometría de flujo, como se indica en el apartado 3 de Materiales y Métodos. Los análisis mostraron que el $9,06 \pm 3,06\%$ de las células totales de MO eran linaje negativo y que de ellas, el

$4,84 \pm 1,95\%$ eran Sca-1⁺ c-Kit⁺ (Figura 14 A), representando las células LSK de media el $0,41 \pm 0,16\%$ del total de las células de la médula ósea.

Tras la selección de las células LSK por citometría de flujo, la pureza de las células Lin⁻ fue del $90,12 \pm 8,57\%$ y del $94,34 \pm 5,14\%$ en las células Sca-1⁺ c-Kit⁺ (Figura 14 B), obteniendo una pureza final en las células LSK del $85,15 \pm 10,31\%$ de media.

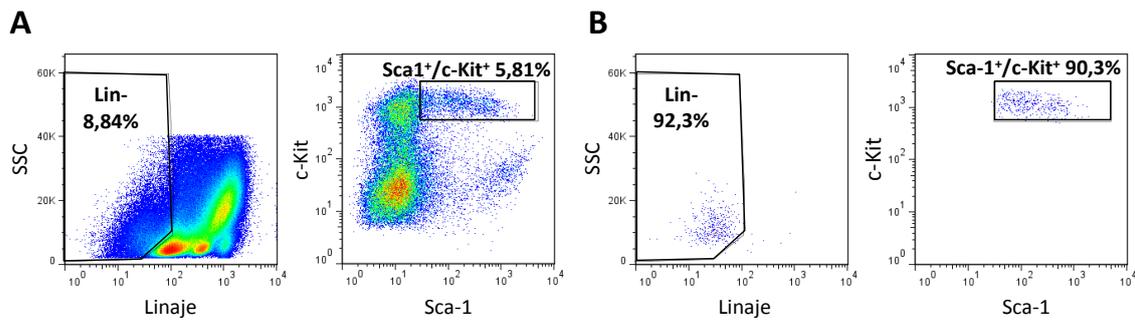


Figura 14: Análisis por citometría de flujo de la población LSK. **(A)** Análisis representativo de la selección por citometría de flujo de las poblaciones Lin⁻ y LSK en la MO de donantes P3D2F1. **(B)** Análisis representativo de la pureza de las poblaciones de Lin⁻ y LSK.

2.1.2.- Potencial clonogénico de las células LSK.

Para comprobar la capacidad clonogénica de las células LSK de donantes P3D2F1 tras su purificación, se realizaron ensayos de formación de colonias en metilcelulosa y se cuantificaron a los 7 días (Figura 15). Se obtuvo una media de $47,44 \pm 14,38$ colonias por cada 150 células LSK sembradas, siendo la eficacia de formación de colonias del $31,62 \pm 9,59\%$.

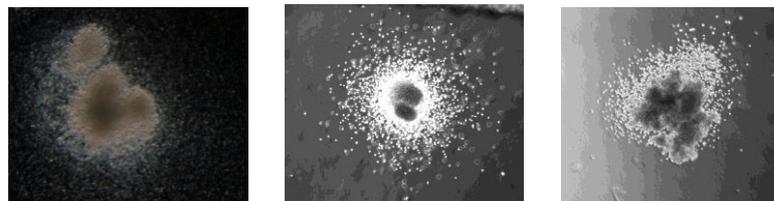


Figura 15: Ejemplos representativos de colonias formadas a partir de células LSK de donantes P3D2F1.

2.2.- Modelo de trasplante congénico en receptores B6D2F1.

2.2.1.- Efecto de la dosis de radiación sobre el injerto de células LSK.

En primer lugar, se identificó la dosis óptima de radiación submieloablativa que favoreciera un injerto limitado de una dosis baja de células LSK, en un contexto congénico. Para ello, receptores B6D2F1 fueron acondicionados con tres dosis de radiación: 3 Gy, 5 Gy o 7 Gy. Un día después de la radiación, los receptores B6D2F1 fueron trasplantados con 1.500 células LSK de donantes P3D2F1, descritas en la bibliografía como un número limitante de CMHs en ratones acondicionados de forma mieloablativa (104). En las semanas 4, 8 y 12 después del trasplante, la sangre periférica de los receptores fue analizada por citometría de flujo para conocer los niveles de quimerismo del donante frente a la hematopoyesis residual endógena del receptor. Para ello, se determinó el porcentaje de células del donante que expresaban el marcador panleucocitario CD45.1⁺/CD45.2⁺ frente a la hematopoyesis endógena del receptor que sólo expresaba el marcador CD45.2 (Figura 16 A).

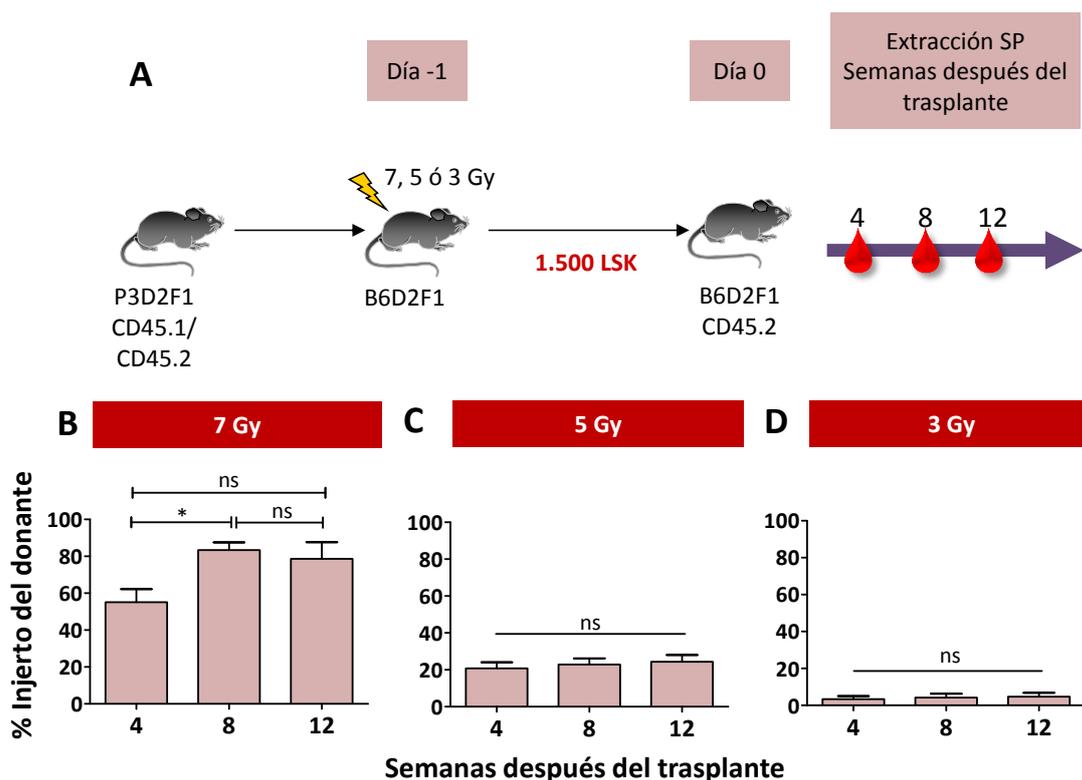


Figura 16: Análisis del quimerismo por citometría de flujo del donante P3D2F1 en receptores B6D2F1 acondicionados con una dosis decreciente de radiación. (A) Modelo experimental del trasplante congénico de células LSK. Niveles de injerto hematopoyético del donante en receptores acondicionados con (B) 7 Gy, (C) 5 Gy o (D) 3 Gy.

Los análisis en sangre periférica mostraron que los receptores irradiados con 7 Gy tenían un porcentaje de injerto del donante del $55,14 \pm 7,06\%$ en la semana 4 después del trasplante y que éste aumentaba significativamente hasta el $83,41 \pm 4,15\%$ en la semana 8 y hasta un $78,65 \pm 8,96\%$ en la semana 12 (Figura 16 B).

Por otro lado, el grupo de ratones acondicionados con 5 Gy de radiación mostró un injerto del $20,78 \pm 3,31\%$ en la semana 4 después del trasplante, el cual se mantenía estable, mostrando un quimerismo del $24,39 \pm 3,68\%$ en la semana 12 (Figura 16 C).

Sin embargo, los ratones acondicionados con 3 Gy mostraron injertos muy bajos, llegando a tener un porcentaje máximo de quimerismo del $4,72 \pm 2,04\%$ en la semana 12 después del trasplante (Figura 16 D).

Los resultados obtenidos indicaban que la dosis de radiación de 5 Gy constituía una dosis submieloablativa de acondicionamiento idónea para un modelo de trasplante congénico en el que obtener un injerto hematopoyético bajo pero detectable.

2.2.2- Efecto de la dosis de células LSK sobre el injerto hematopoyético.

A continuación se quiso confirmar si 1.500 células LSK era el mínimo número de progenitores hematopoyéticos con los que se obtenían niveles de injerto bajos y detectable en trasplantes congénicos con acondicionamiento submieloablativo. Para ello se realizaron trasplantes con cantidades decrecientes de LSK en receptoras B6D2F1 acondicionadas con 5 Gy. Así, los receptores fueron trasplantados con 1.500, 1.000, 500 y 100 células LSK de donantes P3D2F1, siguiendo el esquema descrito en el apartado 7 de Materiales y Métodos. Se estudió el nivel de quimerismo por citometría de flujo en las semanas 4, 8 y 12 después del trasplante.

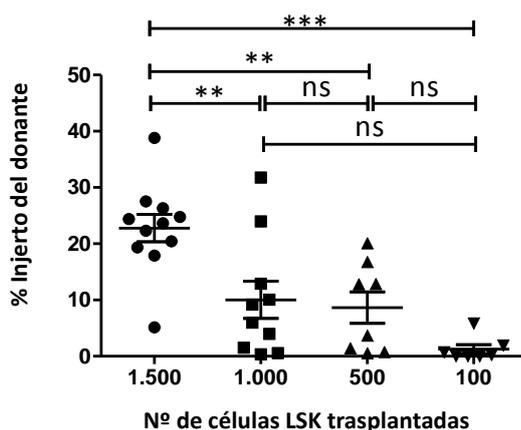


Figura 17: Análisis del quimerismo por citometría de flujo en receptores B6D2F1 trasplantados con números decrecientes de células LSK de donantes P3D2F1 en la semana 12 después del trasplante.

Todos los receptores trasplantados con 1.500 células LSK mantuvieron el injerto con un quimerismo moderado del $22,78 \pm 2,44\%$ en la semana 12 después del trasplante (Figura 17). La infusión de 1.000 células LSK o cantidades inferiores mostraron niveles de quimerismo significativamente inferiores y en todos los grupos se detectaron fallos de injerto en algunos de los ratones trasplantados.

En vista de los resultados obtenidos, se decidió utilizar una dosis de radiación submieloablative de 5 Gy y una dosis de 1500 células LSK, en el modelo de trasplante congénico.

3.-Efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético en trasplantes congénicos de receptores B6D2F1 con acondicionamiento submieloablative.

Una vez establecido el modelo de trasplante congénico, estudiamos si la infusión de Ad-MSCs tendría algún impacto sobre el injerto de este número limitado de LSK del donante.

3.1. Las Ad-MSCs mejoran el injerto de células LSK en receptores congénicos.

3.1.1.- Impacto de las Ad-MSC sobre el injerto hematopoyético en receptores con acondicionamiento submieloablatoivo.

Receptores B6D2F1 irradiados con dosis de radiación de 7 Gy, 5 Gy o 3 Gy fueron trasplantados con 1.500 células LSK de donantes P3D2F1, con o sin 10^6 Ad-MSCs B6D2F1, ambos tipos celulares co-infundidos por vía intravenosa (Figura 18 A). En las semanas 4, 8 y 12 después del trasplante se analizó el nivel de quimerismo en SP por citometría de flujo.

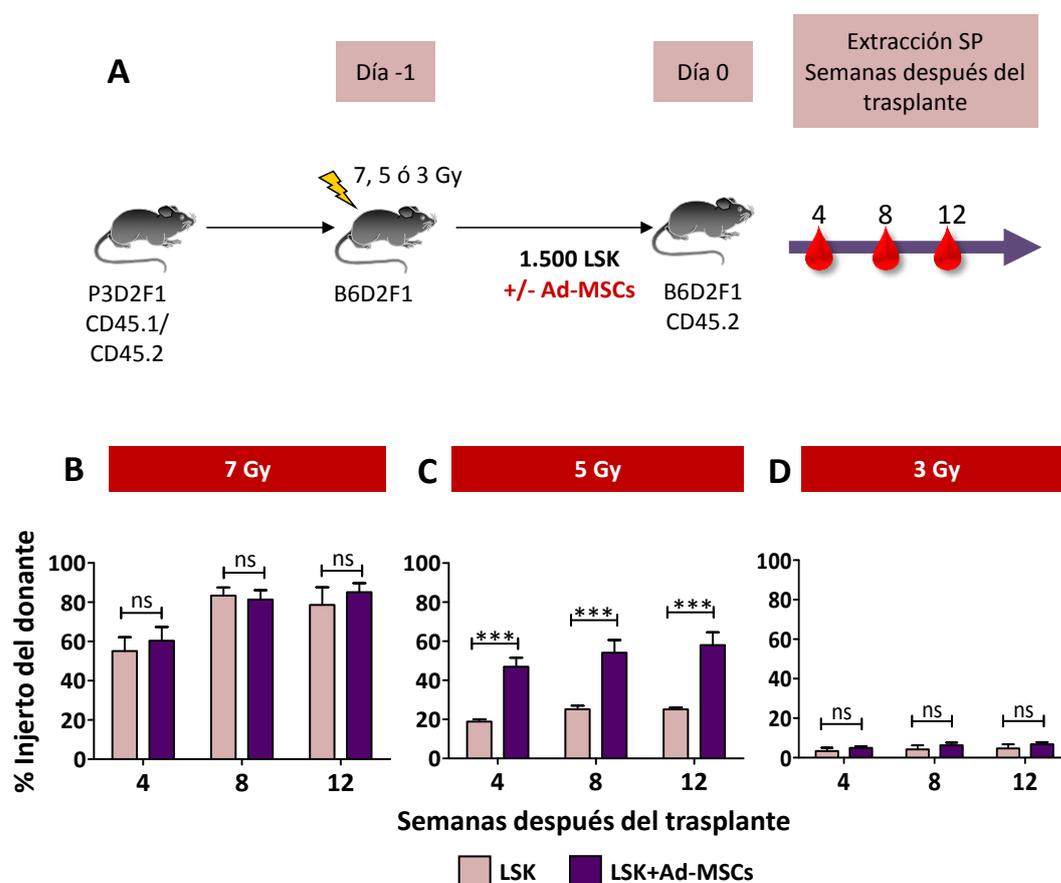


Figura 18: Efecto de las Ad-MSCs sobre el quimerismo en receptores B6D2F1 con acondicionamiento submieloablatoivo (A) Modelo experimental de trasplante congénico de 1.500 células LSK P3D2F1 con o sin la co-infusión de Ad-MSCs. Niveles de injerto hematopoyético en receptores B6D2F1 acondicionados con (B) 7 Gy, (C) 5 Gy o (D) 3 Gy.

Así, 4 semanas después del trasplante el injerto fue del $42,70 \pm 3,92\%$ en los receptores trasplantados con células LSK y co-infundidos con 10^6 Ad-MSCs, comparado con $18,87 \pm 1,14\%$ en el grupo que sólo recibió células LSK. Estos injertos aumentaron hasta el $48,26 \pm 3,94\%$ frente

al $25,24 \pm 1,79\%$ a las 8 semanas y hasta el $51,88 \pm 3,62\%$ frente al $25,13 \pm 0,87\%$ a las 12 semanas después del trasplante (Figura 18 C). Es decir que, el análisis del quimerismo por citometría de flujo de los receptores acondicionados con 5 Gy mostró que la co-infusión de Ad-MSCs junto con 1.500 células LSK mejoró de forma muy significativa el injerto hematopoyético del donante durante las 12 semanas de seguimiento.

Sin embargo, en los ratones acondicionados con 7 Gy, la co-infusión de Ad-MSCs no varió de forma significativa el injerto hematopoyético, observándose niveles de quimerismo muy elevados a todos los tiempos analizados, con injertos del $85,13 \pm 4,71\%$ en el grupo co-infundido con Ad-MSC frente al $78,65 \pm 8,96\%$ del grupo que sólo recibió LSK en la semana 12 después del trasplante (Figura 18 B).

Tampoco se detectaron diferencias significativas en los injertos de receptores acondicionados con la dosis más baja de 3 Gy, en los que la infusión de Ad-MSCs no mejoró el bajo injerto detectado a todos los tiempos post-trasplante, llegándose a un máximo del $6,77 \pm 1,17\%$ a las 12 semanas con la co-infusión de Ad-MSCs frente al $4,72 \pm 2,04\%$ sin Ad-MSCs (Figura 18 D).

Estos resultados indicaban que la co-infusión de Ad-MSCs mejoraban significativamente el injerto de un número limitado de células LSK congénicas en receptores acondicionados con una dosis submieloablative de radiación de 5 Gy.

3.1.2- Efecto de la dosis de Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético.

Para conocer si el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto de células LSK era dependiente de la dosis de Ad-MSCs, se realizaron trasplantes infundiendo 1.500 células LSK junto con un número creciente de Ad-MSCs (de 2×10^5 hasta 10^6) en receptores B6D2F1 acondicionados con 5 Gy. Se analizó la SP por citometría de flujo en las semanas 4, 8 y 12 después del trasplante.

El análisis del quimerismo realizado en la semana 4 después del trasplante detectó que la dosis mínima de Ad-MSCs que causaban un efecto beneficioso significativo sobre el injerto de células del donante, era de 400.000 Ad-MSCs, no observándose ningún efecto sobre el quimerismo hematopoyético con las dosis inferiores. Esta mejora aumentaba hasta $2,34 \pm 0,18$ veces al incrementar la dosis de Ad-MSCs ($600.000-10^6$) comparada con el grupo control que sólo recibió células LSK (Figura 19 A).

En la semana 8, la dosis mínima de Ad-MSCs con la que se detectaba un aumento significativo de $1,43 \pm 0,08$ veces era de 600.000 Ad-MSCs (Figura 19 A y B) y en la semana 12 era necesario

infundir al menos 10^6 Ad-MSCs para observar una diferencias en la mejora de $2,15 \pm 0,25$ veces (Figura 19 A y C).

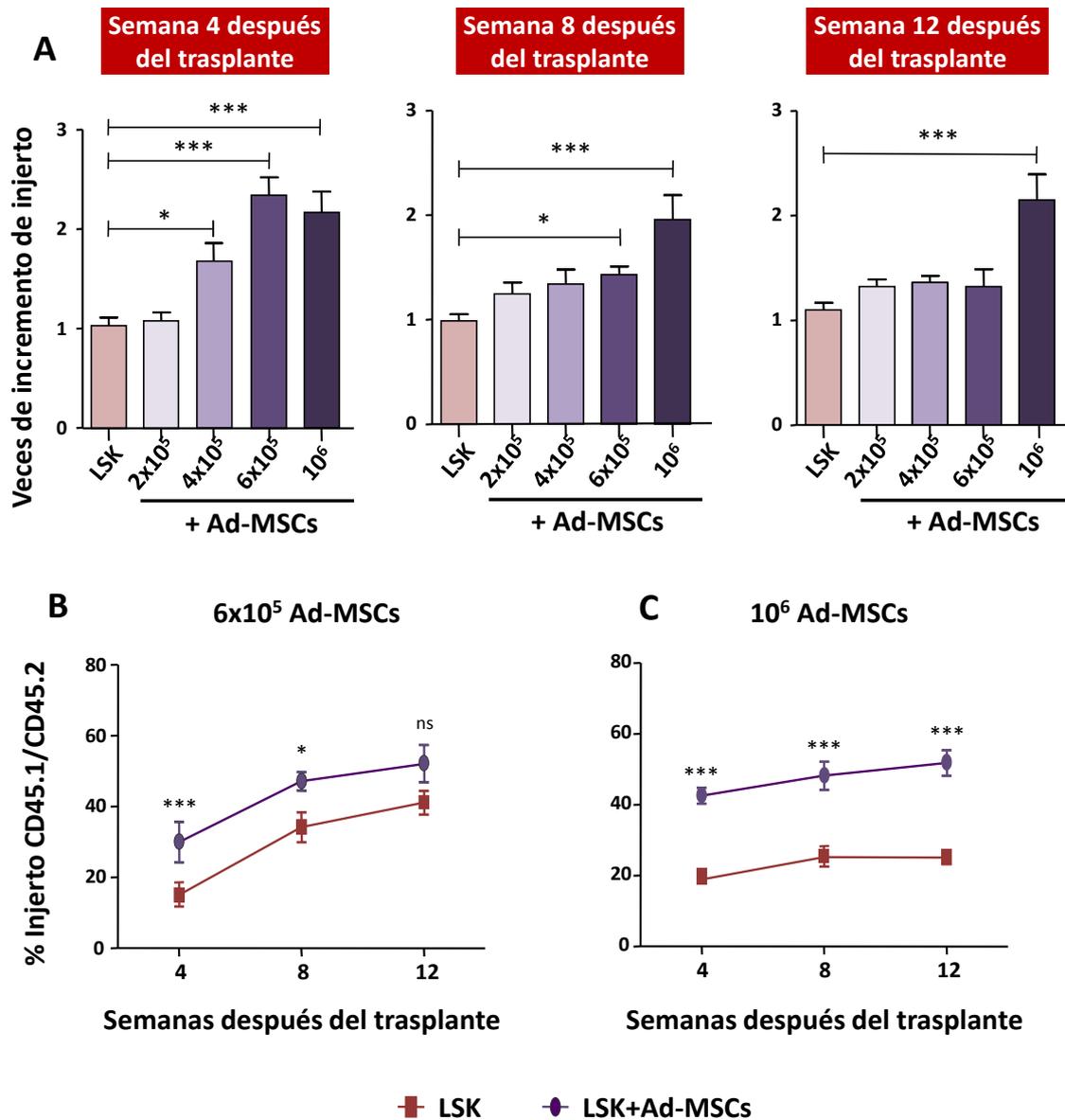


Figura 19: Análisis del quimerismo por citometría de flujo en receptores B6D2F1 trasplantadas con 1.500 células LSK de donantes P3D2F1 y un número creciente de Ad-MSCs. **(A)** Niveles de injerto hematopoyético del donante en la SP de receptores irradiados con 5 Gy, representado en veces de incremento. Evolución del injerto hematopoyético en los receptores co-trasplantados con LSK y **(B)** 600.000 Ad-MSCs o **(C)** 10^6 Ad-MSCs.

Estos datos indicaban un claro efecto sobre el injerto hematopoyético dependiente de la dosis de Ad-MSCs. De estos experimentos, dosis relativamente bajas de Ad-MSCs (400.000 o 600.000) aceleran el injerto de las LSK trasplantadas a tiempos tempranos después del trasplante, mientras que se necesitan cantidades más elevadas (10^6) para mantener una mejora prolongada del injerto después del trasplante.

3.1.3.- Efecto de la co-infusión de células LSK y Ad-MSCs sobre el injerto de progenitores de repoblación hematológica a largo plazo.

Para determinar si el efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético era solo a corto plazo o también sobre las CMH con capacidad de repoblación hematológica a largo plazo, se realizaron trasplantes hematopoyéticos seriados.

Al igual que en los experimentos anteriores, los receptores irradiados con una dosis submieloablativa de 5 Gy fueron trasplantados con 1.500 LSK con o sin la co-infusión de 600.000 Ad-MSCs. Al igual que se observó en los resultados anteriores, la co-infusión intravenosa de células LSK con Ad-MSCs mejoró significativamente el porcentaje de injerto del donante en los receptores primarios (Figura 20 A). A pesar de que esta mejora no fue significativa a partir de la semana 12 después del trasplante, los injertos del grupo LSK+Ad-MSCs siempre fueron superiores a los del grupo que sólo recibió LSK ($55,35 \pm 5,73\%$ vs $43,27 \pm 8,82\%$, respectivamente, en la semana 24 después del trasplante).

Después de seis meses, los receptores primarios fueron sacrificados y se obtuvo la MO de ambos grupos de estudio. El porcentaje de injerto de los donantes en el *pool* de MO de los respectivos grupos de estudio fue superior en los receptores co-infundidos con Ad-MSCs, siendo del 40%, frente al 26,5% en el grupo sin Ad-MSCs (Figura 20 B).

Las células de MO fueron trasplantadas en receptores secundarios acondicionados con una dosis de radiación mieloablativa de 5,5 + 5,5 Gy. El injerto de los donantes, analizado en la SP, fue significativamente mayor ($p < 0,001$ a 4 semanas y $p < 0,01$ a 8 semanas) en aquellos grupos trasplantados con la MO del grupo primario LSK+Ad-MSCs (Figura 20 A). De forma similar, los receptores secundarios fueron sacrificados a las 12 semanas después del trasplante y su MO mostró un quimerismo superior en el grupo que había recibido células LSK+Ad-MSCs (21,2%) frente al que sólo había recibido células LSK (14,3%) (Figura 20 C).

También en la SP de los receptores terciarios, el injerto del donante fue significativamente mayor en los receptores trasplantados con MO del grupo LSK+Ad-MSCs ($p < 0,05$ en las semanas 4 y 8 y $p < 0,01$ en la semana 12) (Figura 20 A).

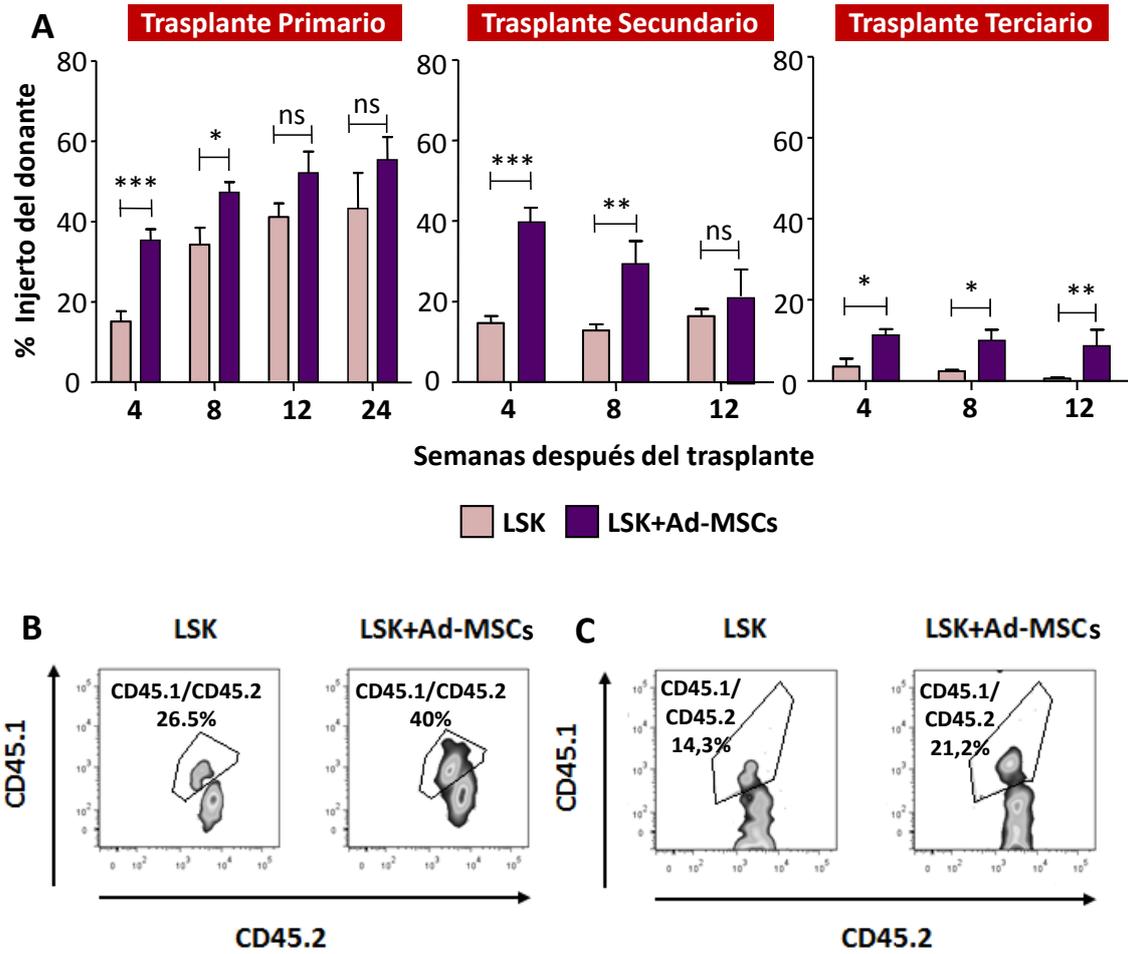


Figura 20: Efecto de las Ad-MSCs sobre el quimerismo a largo plazo en receptores B6D2F1. **(A)** Análisis del injerto hematopoyético del donante P3D2F1 en SP por citometría de flujo en receptores primarios, secundario y terciarios. **(B)** Niveles de injerto del donante en la MO de receptores primarios a las 24 semanas después del trasplante. **(C)** Niveles de injerto en la MO de receptores secundarios a las 12 semanas después del trasplante.

Estos resultados indicaban que la co-infusión de Ad-MSCs no sólo aumentaba el injerto de células LSK responsables de la reconstitución hematológica a corto plazo, sino que también aumentaba la cantidad de progenitores hematopoyéticos injertados responsables del mantenimiento a largo plazo de la hematopoyesis.

3.2.- El *homing* de las células LSK en la médula ósea aumenta con su co-infusión con Ad-MSCs.

Con el fin de conocer si el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético era debido al *homing* de un número mayor de las células LSK hacia la MO de los receptores, se infundieron por vía intravenosa 10.000 células LSK teñidas con el colorante vital DID, con o sin 600.000 Ad-MSCs. A las 2, 4 y 24 horas tras el trasplante, los receptores fueron sacrificados y se valoró por citometría de flujo la presencia de células LSK-DID⁺ en la MO, sangre periférica, bazo y pulmones de los ratones.

El análisis de la MO a las 2, 4 y 24 horas después del trasplante (Figura 21 A) mostró que los receptores que habían sido co-infundidos con las Ad-MSCs presentaban un porcentaje de células LSK DID⁺ significativamente mayor (p-valor < 0,05) en la MO ($8,42 \pm 3,32\%$, $11,72 \pm 0,93\%$ y $4,52 \pm 1,27\%$ respectivamente) que aquellos que sólo habían sido trasplantados con células LSK ($1,78 \pm 0,34\%$, $2,55 \pm 1,44\%$ y $1,57 \pm 0,45\%$, respectivamente).

El análisis de la SP y del bazo no mostró diferencias significativas en la detección de células LSK DID⁺ entre los dos grupos de estudio. Así, en la sangre periférica se detectó un porcentaje máximo de células LSK DID⁺ del $3,37 \pm 1,16\%$ en el grupo LSK y del $2,28 \pm 1,37\%$ en el grupo LSK+Ad-MSCs (Figura 21 B). En bazo el mayor porcentaje de células LSK detectado fue del $8,67 \pm 3,38\%$ en el grupo LSK y del $12,32 \pm 2,85\%$ en el grupo LSK+Ad-MSCs (Figura 21 C).

En los pulmones, se apreció un aumento en el número de células LSK 24 horas después del trasplante en los receptores co-trasplantados con Ad-MSCs ($18,49 \pm 6,55\%$), comparado con las detectadas en el grupo LSK (Figura 21 D).

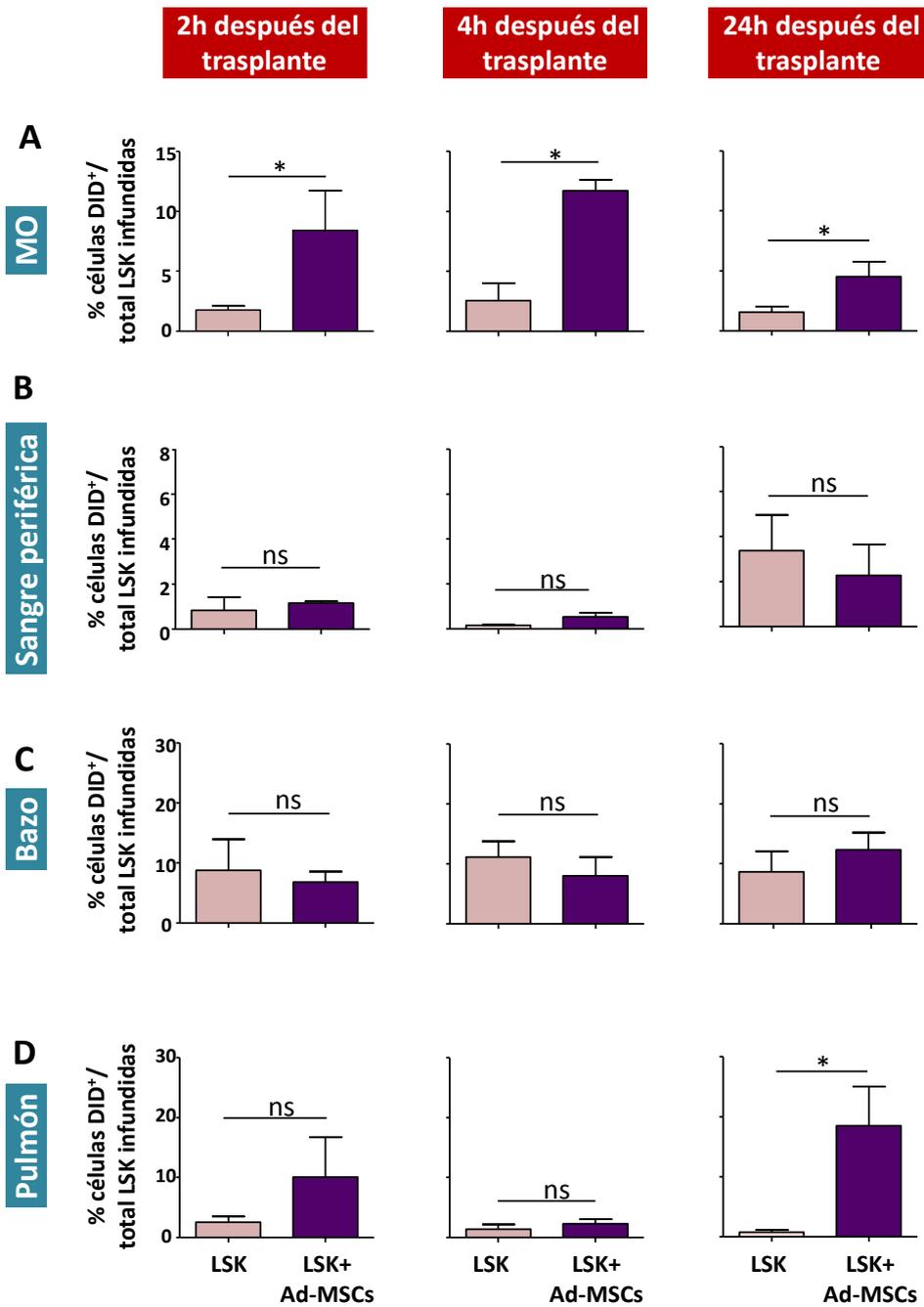


Figura 21: Análisis de biodistribución de células LSK-DID⁺ por citometría de flujo. Porcentaje de células LSK DID⁺ en (A) la MO, (B) la SP, (C) el bazo y (D) los pulmones.

Estos resultados sugieren que el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético, asociado a una reconstitución acelerada y sostenida en los receptores trasplantados, está mediada por una mejora en el *homing* de las LSK hacia la MO de los receptores.

3.3.- La co-infusión simultánea de las Ad-MSCs junto con las células LSK es imprescindible para la mejora del injerto hematopoyético.

Los siguientes experimentos fueron diseñados con el objeto de profundizar en los posibles mecanismos implicados en el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético.

3.3.1.- Consecuencias del fraccionamiento de la dosis de Ad-MSCs en el injerto hematopoyético.

Se investigó si era necesario infundir la dosis completa de Ad-MSCs junto con las células LSK por vía intravenosa, o bien si ésta podía fraccionarse, lo que permitiría disminuir el número de Ad-MSCs co-administradas en cada infusión. Así, como grupo control se infundieron 1.500 células LSK con o sin una dosis completa de 400.000, 600.000 o 10^6 Ad-MSCs infundidas el mismo día del trasplante. Los receptores de los otros tres grupos de estudio fueron trasplantados con 1.500 células LSK en el día 0 y las mismas cantidades de Ad-MSCs pero fraccionadas en 2 o 3 dosis, que fueron infundidas el día anterior, el mismo día junto con las células LSK y el día posterior al trasplante de las células LSK, como se detalla en la Figura 22 A.

Al igual que en los experimentos anteriores, la co-infusión intravenosa de células LSK y 600.000 o 10^6 Ad-MSCs mejoró significativamente los porcentajes de injerto analizado en la sangre periférica de los receptores B6D2F1. Sin embargo, la administración fraccionada de Ad-MSCs no tuvo ningún impacto en el injerto hematopoyético en ninguno de los grupos estudiados (Figura 22 B).

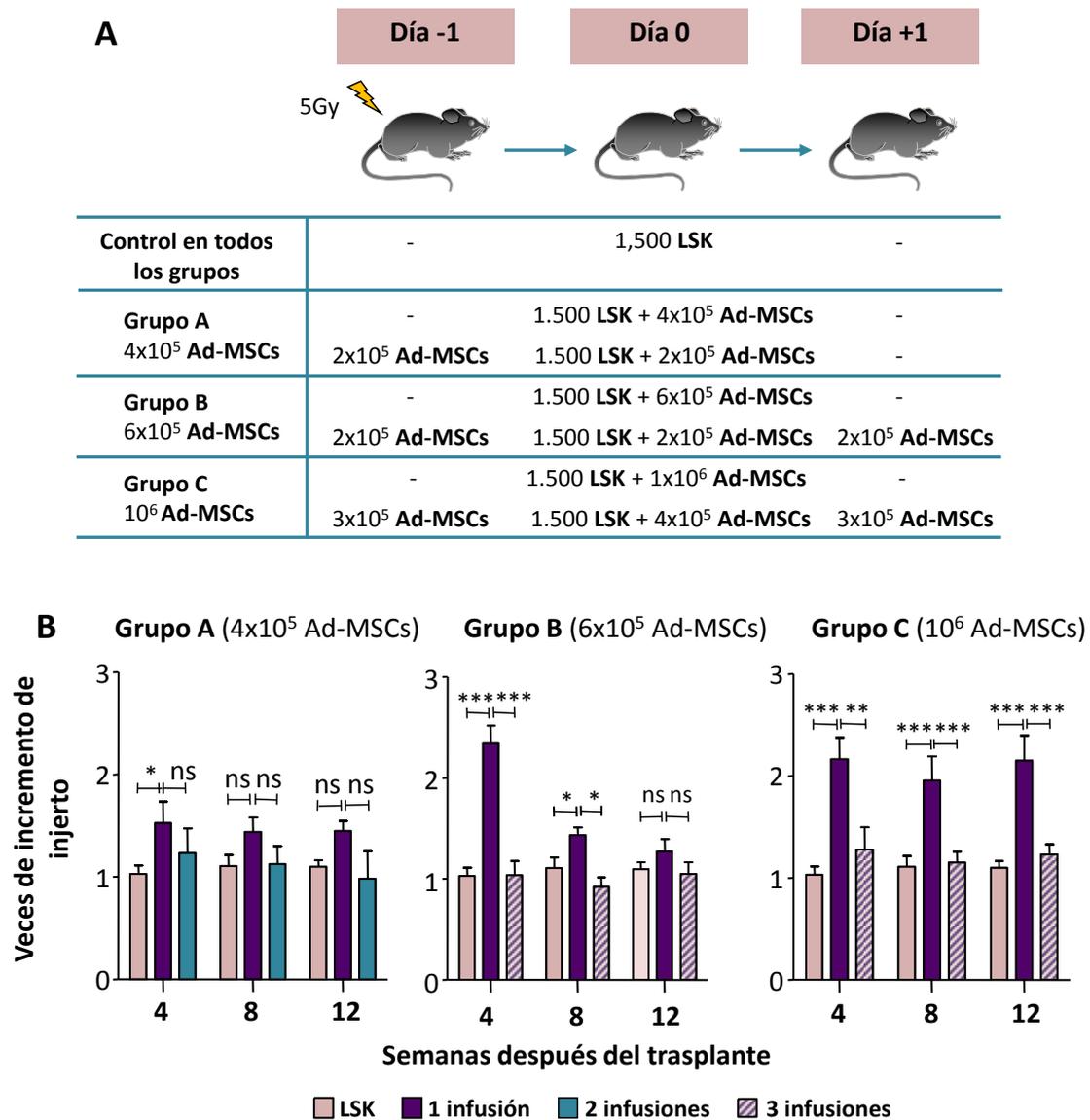


Figura 22: Impacto del fraccionamiento de la dosis de Ad-MSCs en la mejora del injerto hematopoyético en receptores B6D2F1. **(A)** Esquema del protocolo experimental y pautas de administración de las Ad-MSCs infundidas por vía intravenosa **(B)** Niveles del injerto del donante en la sangre periférica de receptores por citometría de flujo, representado por veces de incremento.

Estos resultados indicaban que el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético se producía sólo cuando ambos tipos celulares eran infundidos simultáneamente con una dosis completa de Ad-MSCs (600.000 o 10⁶ Ad-MSCs).

3.3.2.- Efecto de la ruta de administración de las Ad-MSCs y las células LSK.

Se investigó si el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto se mantenía si las LSKs eran infundidas con las Ad-MSCs el día 0, pero a través de diferentes rutas de administración.

En estos experimentos, distintos grupos de receptores fueron co-trasplantadas con 1.500 células LSK por vía intravenosa (IV) y con 10^6 o 2×10^6 Ad-MSCs por vía intraperitoneal (IP). Como grupo control, los receptores fueron trasplantados por vía intravenosa con 1.500 células LSK junto con 10^6 Ad-MSCs.

Al igual que en los experimentos anteriores, la co-infusión intravenosa de células LSK y Ad-MSCs mejoró significativamente el porcentaje de injerto de los donantes P3D2F1 en los receptores B6D2F1 (Figura 23). En cambio, cuando las Ad-MSCs fueron inyectadas por vía IP, no se observaron diferencias significativas en los niveles de quimerismo entre los distintos grupos de receptores, ni tan siquiera cuando se duplicó la dosis de Ad-MSC inyectada (Figura 23).

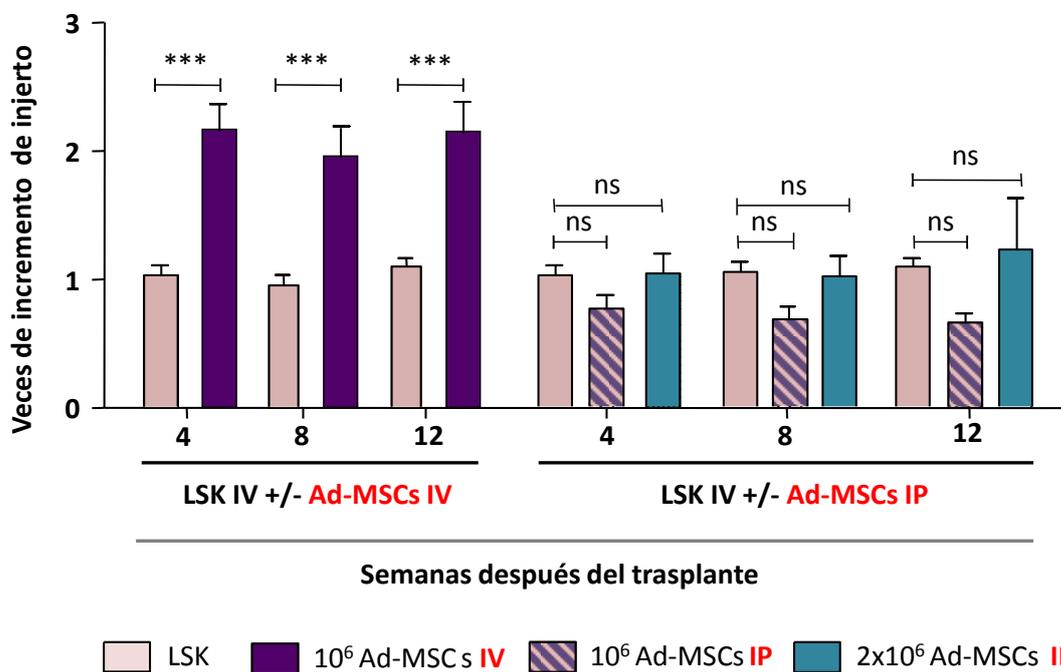


Figura 23: Impacto de la ruta de administración de las Ad-MSCs en el injerto hematopoyético. Niveles de injerto del donante en receptores B6D2F1 co-trasplantadas con Ad-MSCs por vía intravenosa (IV) o por vía intraperitoneal (IP), representado en veces de incremento.

Estos resultados mostraban que la co-infusión simultánea y por vía intravenosa de las células LSK junto con las Ad-MSCs era necesaria para observar el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético del donante.

3.4.- Las células LSK interactúan de forma directa con las Ad-MSCs.

Los resultados anteriores sugerían que el contacto directo entre ambas poblaciones celulares jugaba un papel importante en el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético. Para profundizar en esta hipótesis, estudiamos *in vitro* la interacción directa entre las células LSK y las Ad-MSCs, en las mismas condiciones que las co-infundidas en los experimentos *in vivo*. Para ello, se incubaron 1.500 células LSK-DID⁺ junto con 600.000 Ad-MSCs-CFSE⁺ durante 10 minutos y se valoró por citometría de flujo la asociación de células doble positivas DID⁺/CFSE⁺, que se llamaron dobletes.

Los análisis mostraron que el $83,69 \pm 2,48\%$ de la población DID⁺ (células LSK) formaba dobletes DID⁺/CFSE⁺, lo que demostraba una interacción muy marcada entre las células LSK y las Ad-MSCs CFSE⁺ (Figura 24 A y B).

Para confirmar esta interacción directa entre ambos tipos celulares se diseñó un segundo experimento, en el que 1.500 células LSK marcadas con Sca-1-PE y 600.000 Ad-MSCs marcadas con CD29-FITC fueron incubadas durante 10 min y analizadas con el citómetro de flujo *ImageStream100*, que permitía obtener fotografías de las células analizadas. Como se puede ver en la Figura 24 C, las fotografías mostraban una interacción directa entre células LSK y Ad-MSCs, que formaban dobletes perfectamente detectables.

Estas observaciones sugerían que las Ad-MSCs podrían actuar *in vivo* como transportadores de las células LSK, facilitando la migración y el *homing* de las mismas al nicho hematopoyético de la médula ósea durante las fases tempranas del trasplante y así facilitar su injerto.

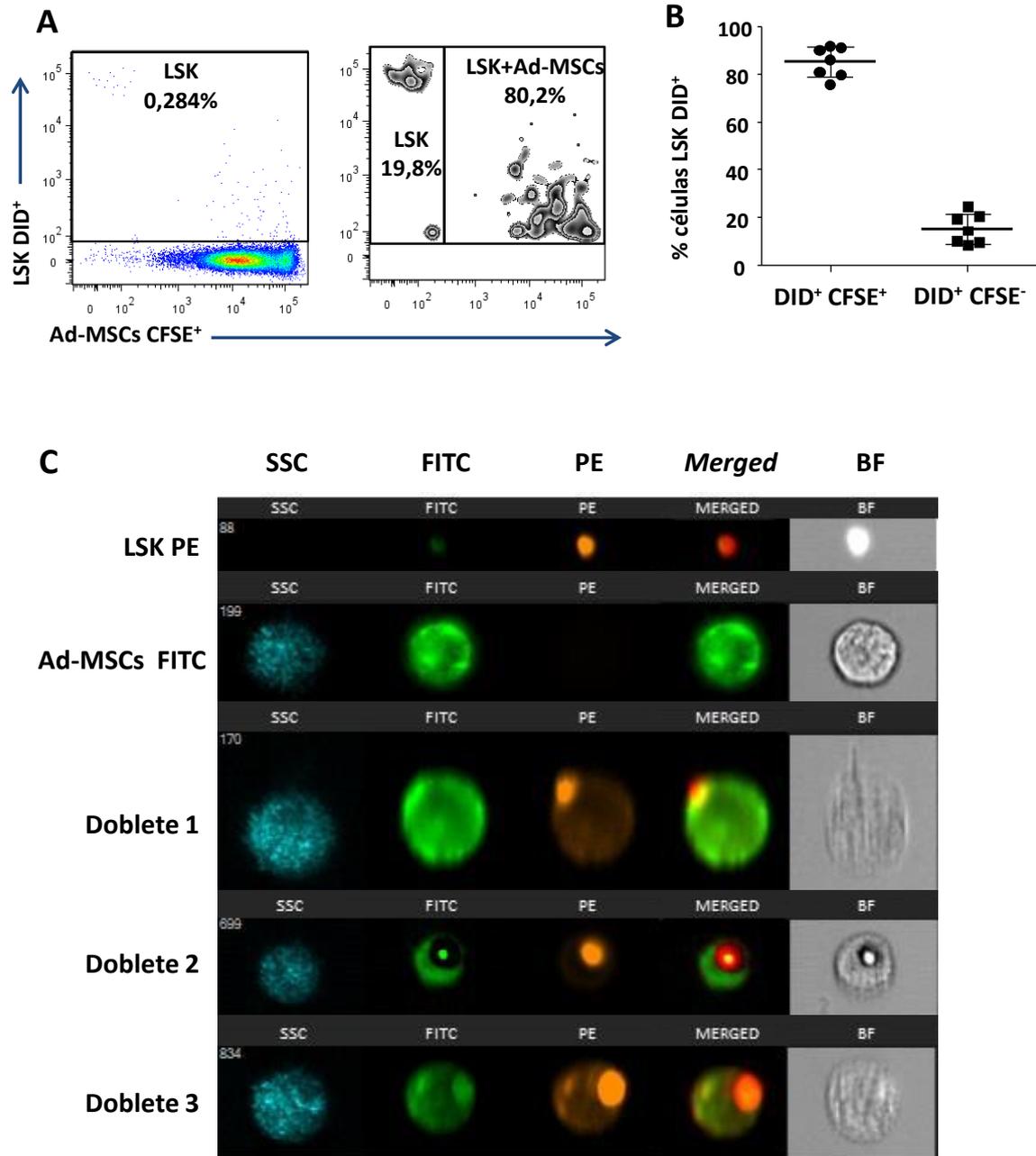


Figura 24: Análisis de la interacción *in vitro* de células LSK y Ad-MSCs. (A) Análisis representativo de citometría de flujo de las poblaciones LSK DID⁺ y AD-MSCs CFSE⁺. **(B)** Porcentaje de la población DID⁺/CFSE⁺ (dobletes) frente a la población DID⁺ CFSE⁻. **(C)** Imágenes de las células LSK-PE⁺ y Ad-MSC-FITC⁺ analizadas con el citómetro de flujo *ImageStream100*. En las imágenes se muestra el tamaño de las células en azul, las Ad-MSC-FITC en verde, las células LSK-PE en naranja y la unión de las imágenes con señal PE/FITC (*Merged*). La última columna (BF) representa las células en campo claro.

4.- Efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético en trasplantes singénicos con alto riesgo de fallo de injerto.

Una vez comprobado el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto de un número limitado de células LSK en un modelo de trasplante congénico de ratones acondicionados con una dosis submieloablative de radiación, se quiso estudiar si las Ad-MSCs mejoraban el injerto hematopoyético en un modelo con alto riesgo de fallo de injerto e impacto a nivel clínico, como puede ser la Anemia de Fanconi. Para ello, los siguientes experimentos se llevaron a cabo en el modelo de ratón deficiente en el gen *Fanca* (*Fanca*^{-/-}).

4.1.-Purificación y caracterización de células LSK *Fanca*^{-/-}.

Como primer paso, se realizó una caracterización fenotípica y funcional de las células LSK deficientes en el gen *Fanca* (*Fanca*^{-/-}) comparada con la de células LSK WT del mismo fondo genético (FVB).

4.1.1.- Purificación de células LSK *Fanca*^{-/-} y WT.

Para obtener células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} o WT (control sano), se marcaron células de la MO con anticuerpos monoclonales, se analizaron y se purificaron mediante citometría de flujo, como se indica en el apartado 3 de Materiales y Métodos. El análisis de las células de MO *Fanca*^{-/-} mostró que una media del $6,77 \pm 2,20\%$ de las células eran linaje negativo, de las cuales un $6,44 \pm 2,74\%$ eran Sca-1⁺, c-Kit⁺ (Figura 25 A), representando las células LSK *Fanca*^{-/-} el $0,40 \pm 0,12\%$ de las células de la MO total. Tras la selección de la fracción celular LSK, la pureza de células Lin⁻ fue del $93,64 \pm 4,30\%$ y la de células Sca-1⁺ c-Kit⁺ del $94,46 \pm 4,39\%$. En conjunto, las células LSK *Fanca*^{-/-} obtenidas tenían una pureza del $88,48 \pm 6,18\%$ de media (Figura 25 B).

Por otro lado, las células de MO de donantes control WT analizadas por citometría de flujo mostraron que el $11,27 \pm 5,12\%$ de las células eran Lin⁻, de las cuales $6,05 \pm 3,32\%$ eran células Sca-1⁺ c-Kit⁺. Por tanto, las células LSK WT representaban un $0,59 \pm 0,28\%$ de la celularidad total de la MO (Figura 25 C). Tras la selección de la fracción celular LSK, la pureza celular fue del $90,27 \pm 12,20\%$ en las células Lin⁻ y del $93,41 \pm 8,95\%$ en las células Sca-1⁺ c-Kit⁺, siendo la pureza final en las células LSK WT del $85,14 \pm 17,11\%$ (Figura 25 D).

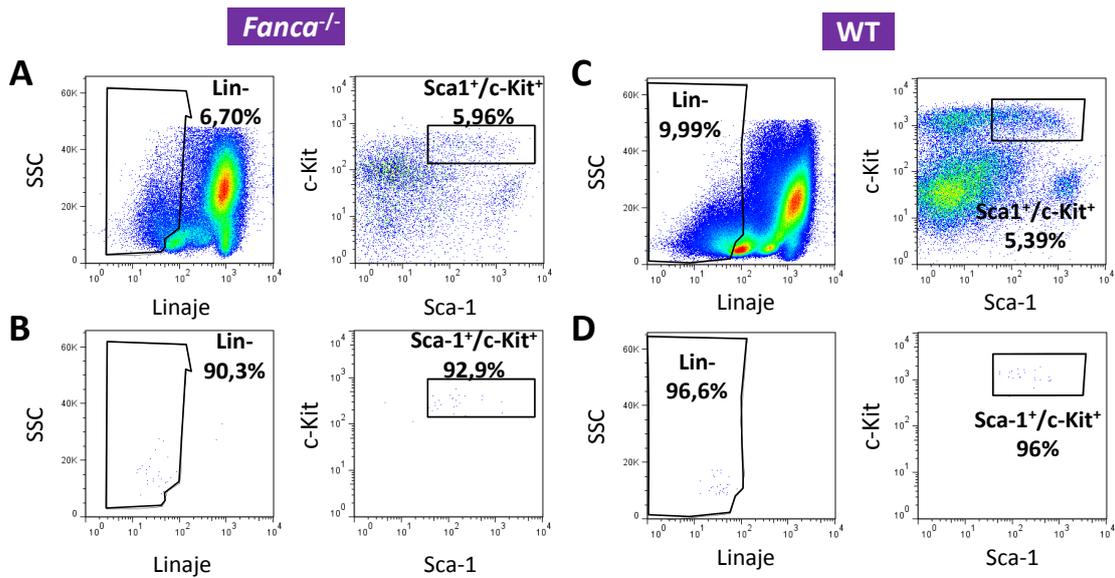


Figura 25: Análisis por citometría de flujo de la población de células LSK *Fanca^{-/-}* y WT. **(A)** Análisis representativo de la selección de las poblaciones Lin⁻ y LSK en la MO de ratones *Fanca^{-/-}*. **(B)** Análisis representativo de la pureza de las poblaciones Lin⁻ y LSK *Fanca^{-/-}* obtenidas tras la inmunoselección. **(C)** Análisis representativos de la selección de las poblaciones Lin⁻ y LSK en la MO de ratones WT. **(D)** Análisis representativos de la pureza de las poblaciones Lin⁻ y LSK WT obtenidos tras la inmunoselección.

La comparación de las población LSK de ratones *Fanca^{-/-}* y WT mostró una disminución significativa del porcentaje de células LSK en los ratones *Fanca^{-/-}* (Figura 26 A), debido a un porcentaje significativamente menor de células Lin⁻ (Figura 26 B). Dentro de la población Lin⁻, la proporción de células Sca-1⁺ c-Kit⁺ era similar en ambos tipos celulares (Figura 26 C).

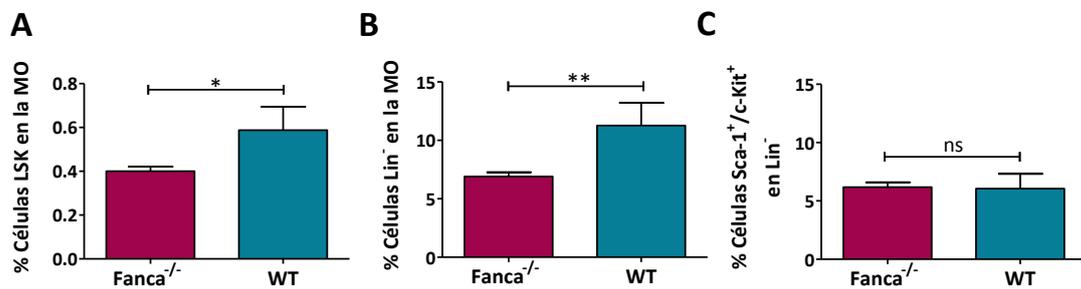


Figura 26: Comparación del contenido de células LSK en ratones *Fanca^{-/-}* y WT. **(A)** Porcentaje de células LSK de ratones *Fanca^{-/-}* y WT. **(B)** Porcentaje de células Lin⁻ *Fanca^{-/-}* y WT. **(C)** Porcentaje de células Sca-1⁺ c-Kit⁺ en ratones *Fanca^{-/-}* y WT.

4.1.2.- Capacidad clonogénica de células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} y WT.

Para valorar la capacidad clonogénica de las células LSK de ratones *Fanca*^{-/-} y WT, se sembraron 150 células LSK para generar colonias CFC. Al observar las colonias por microscopía óptica, se apreciaban en las placas de células LSK-*Fanca*^{-/-}, colonias que tendían a ser menos compactas que las formadas por células LSK-WT (Figura 27 A-B).

La cuantificación de las colonias mostró que por cada 150 células LSK-WT se generaban $30 \pm 12,97$ colonias y con LSK-*Fanca*^{-/-} se generaban $25,33 \pm 15,13$. Es decir que la eficacia de formación de colonias de las células LSK fue similar entre ambos tipos celulares, representando el $20 \pm 8,65\%$ para las células LSK-WT y el $16,89 \pm 10,09\%$ para las células LSK-*Fanca*^{-/-} (Figura 27 C).

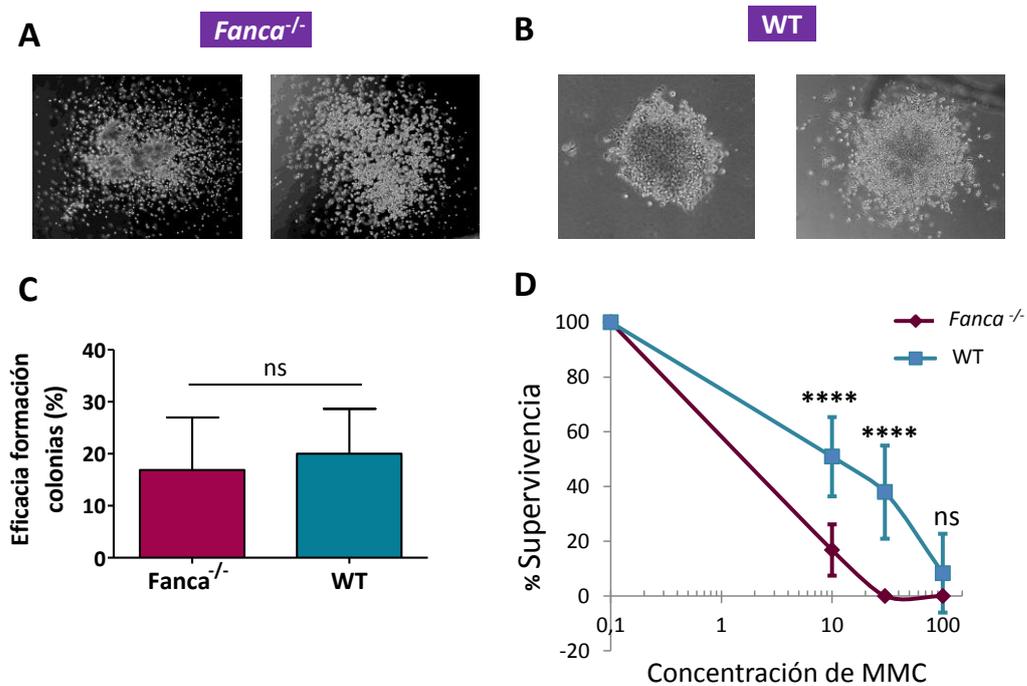


Figura 27: Capacidad clonogénica y sensibilidad a MMC de células LSK de ratones *Fanca*^{-/-} y WT. Imágenes representativas de colonias formadas a partir de (A) células LSK-*Fanca*^{-/-} y (B) células LSK-WT. (C) Comparación de la eficacia de formación de colonias de células LSK-*Fanca*^{-/-} y células LSK-WT. (D) Curva de supervivencia a distintas concentraciones de MMC de células LSK-*Fanca*^{-/-} y células LSK-WT.

Para confirmar la sensibilidad a MMC de las células LSK-*Fanca*^{-/-}, se sembraron en metilcelulosa 150 células LSK-*Fanca*^{-/-} o células LSK-WT con cantidades de MMC crecientes, como se detalla en el apartado 6 de Materiales y Métodos. El recuento de colonias a los siete días confirmó que las células LSK-*Fanca*^{-/-} eran significativamente más sensibles a la MMC que las células LSK-WT (Figura 27 D).

4.1.3.- Análisis del ciclo celular de células LSK de ratones *Fanca*^{-/-} y WT.

Se evaluó el ciclo celular de células LSK-*Fanca*^{-/-} y células LSK-WT tiñendo las células con los marcadores Hoechst 3342 (para ADN) y Pironina Y (para ARN), para distinguir las células que se encontraban en las fases sub-G₀, G₀, G₁ o S/G₂/M del ciclo celular.

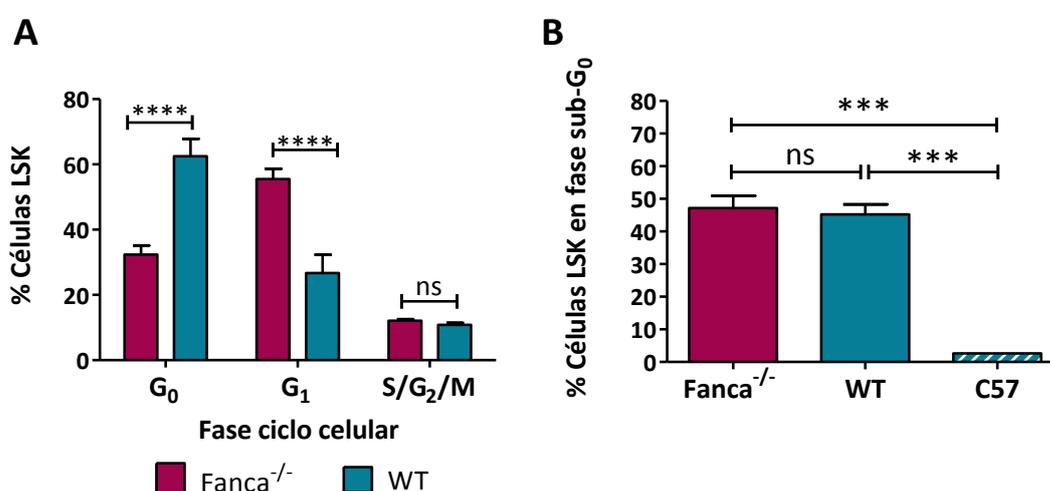


Figura 28: Análisis del ciclo celular de células LSK-*Fanca*^{-/-} y células LSK-WT. **(A)** Análisis de la proporción de células LSK en fase G₀, G₁ o S/G₂/M del ciclo celular. **(B)** Análisis de la proporción de células LSK en fase sub-G₀.

El análisis por citometría de flujo reveló un descenso significativo en la proporción de células LSK-*Fanca*^{-/-} en la fase G₀ y un aumento significativo en la proporción en la fase G₁, comparada con las células LSK-WT. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones S/G₂/M entre ambas poblaciones celulares (Figura 28 A).

Por otro lado, se observó un alto porcentaje de células en fase sub-G₀, indicativa de apoptosis, tanto en las muestras de células LSK-*Fanca*^{-/-} como de células LSK-WT. Para comprobar que esto estaba asociado a la cepa WT y no a la manipulación celular, se comparó la proporción de células LSK en fase sub-G₀ en ratones *Fanca*^{-/-}, WT y C57bl/6. Los resultados mostraron una

proporción significativamente mayor de células en fase sub-G₀ en las LSK-*Fanca*^{-/-} y LSK-WT con respecto a las células LSK de ratones C57bl/6 (Figura 28 B).

En conjunto, estos resultados mostraban que las células LSK-*Fanca*^{-/-} tenían una proporción significativamente menor en quiescencia que las células LSK-WT, lo que podía comprometer la capacidad de injerto de las LSK deficientes en el gen *Fanca*^{-/-}.

4.1.4.- Caracterización de las subpoblaciones en células LSK-*Fanca*^{-/-} y en células LSK-WT.

Se realizó un estudio detallado de las subpoblaciones de células LSK, mediante citometría de flujo. Las células LSK- *Fanca*^{-/-} y LSK-WT se marcaron y se analizaron para distinguir los progenitores hematopoyéticos a largo plazo (LT, CD34⁻/Flk2⁻), a corto plazo (ST, CD34⁺/Flk2⁻) y multipotentes (MPP, CD34⁺/Flk2⁺), como se ha descrito en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos (Figura 29 A).

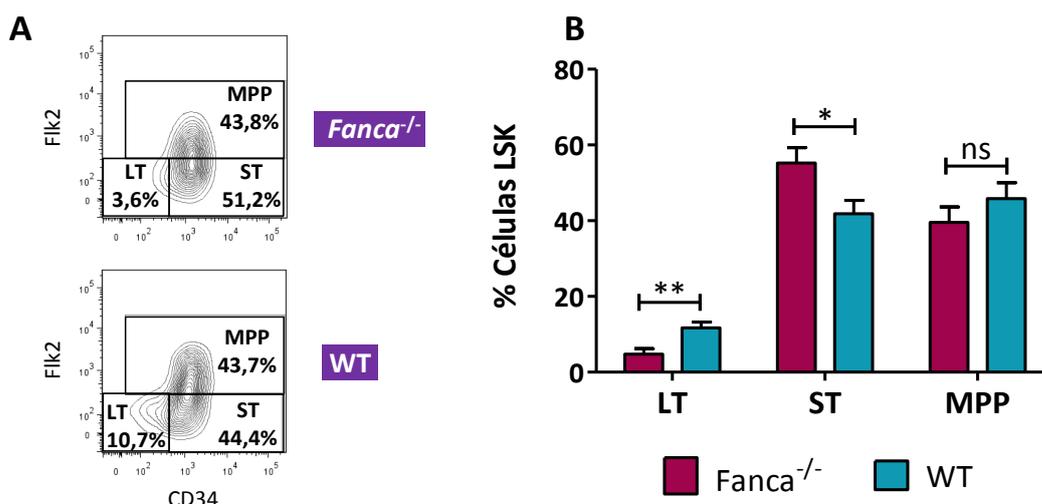


Figura 29: Análisis de las subpoblaciones LT, ST y MPP en células LSK-*Fanca*^{-/-} y células LSK-WT.

(A) Ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo de las subpoblaciones en células LSK-*Fanca*^{-/-} y en células LSK-WT. **(B)** Análisis del porcentaje de las poblaciones LT, ST y MPP en células LSK-*Fanca*^{-/-} y en células LSK-WT.

El análisis mostró que las células LSK-*Fanca*^{-/-} contenía una proporción significativamente menor de LT que las células LSK-WT, además de un aumento significativo de ST en las células LSK-*Fanca*^{-/-}. No se observaron diferencias significativas en la proporción de células MPP entre ambos tipos celulares (Figura 29 B).

4.1.5.- Estudio de la expresión de células adhesión y migración en células LSK de ratones *Fanca*^{-/-} y WT.

Quisimos conocer los niveles de expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1/VLA4, ICAM-1/LFA1 y de la molécula de migración CXCR4 implicadas en el *homing* y anidamiento de las CMH en el nicho hematopoyético. Para ello se obtuvieron y se tiñeron células de la MO de ratones *Fanca*^{-/-} y WT con dichos marcadores.

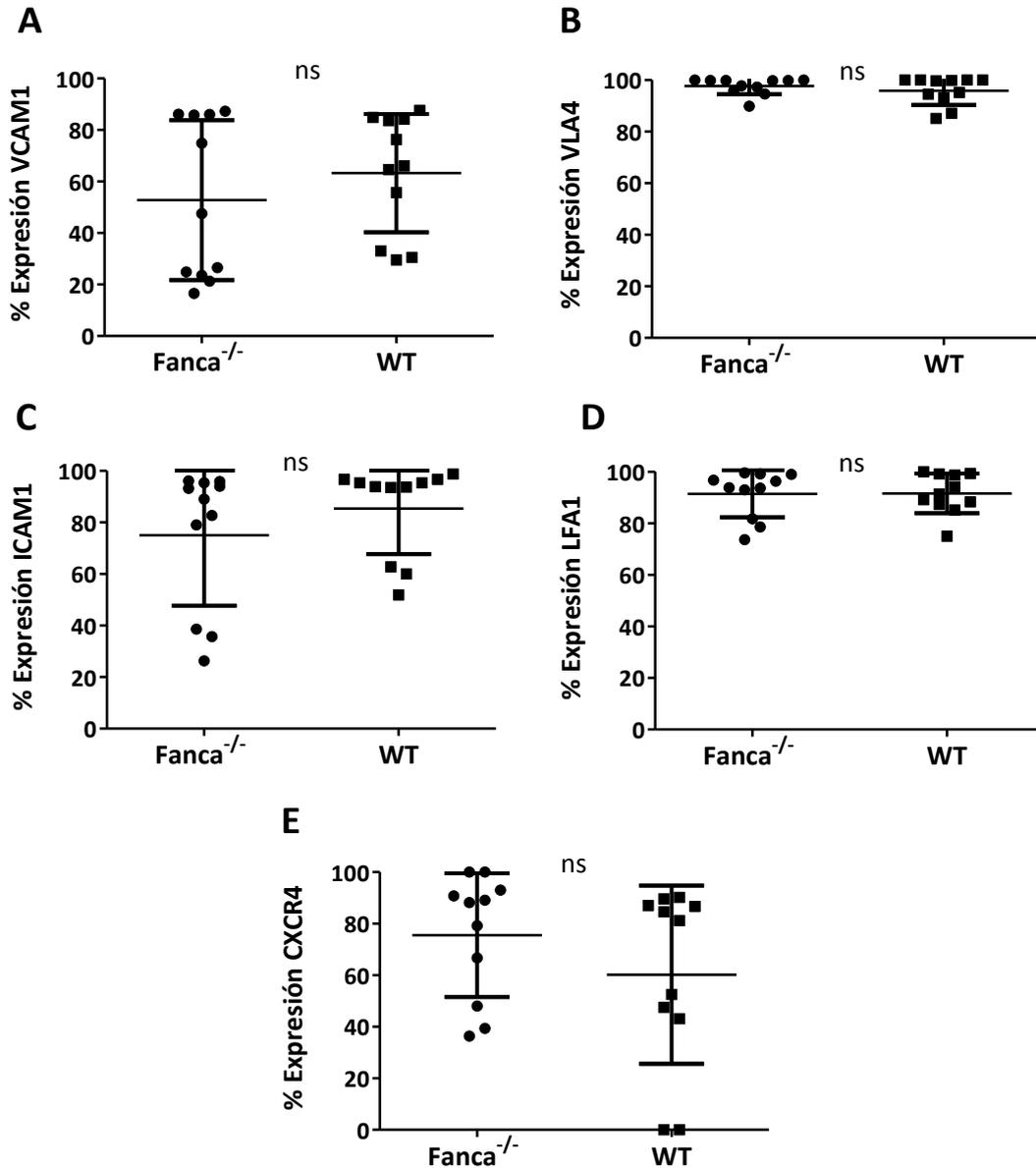


Figura 30: Análisis de la expresión de moléculas de adhesión y migración en células LSK-*Fanca*^{-/-} y células LSK-WT por citometría de flujo. Análisis de expresión de (A) VCAM-1, (B) de la integrina VLA-4 (C) de ICAM-1, (D) de la integrina LFA-1 y (E) de la molécula de migración CXCR4.

El análisis de ambos tipos de muestras reveló una expresión variable de las moléculas VCAM-1 (Figura 30 A), ICAM-1 (Figura 30 C) y CXCR4 (Figura 30 E), así como una expresión homogénea y muy elevada de las moléculas VLA-4 (Figura 30 B) y LFA-1 (Figura 30 D) en ambas muestras. A pesar de la expresión variable observada en alguna de las moléculas estudiadas, no existían diferencias significativas en su expresión entre las células LSK de ratones *Fanca*^{-/-} y WT.

4.2.- Caracterización del injerto hematopoyético de células LSK-*Fanca*^{-/-} y de células LSK-WT en receptores *Fanca*^{-/-} y WT.

Una vez caracterizadas las células LSK-*Fanca*^{-/-} y las células LSK-WT, se estudió la capacidad de injerto de ambos tipos celulares en receptores *Fanca*^{-/-} y WT.

4.2.1.- Capacidad de injerto de células LSK-WT en receptores WT.

Se trasplantaron 1.500, 3.000 y 5.000 células LSK-WT de donantes macho en receptores hembra WT acondicionados con una dosis submieloablative de 5 Gy (Figura 31 A), para comprobar si el nivel de injerto hematopoyéticos era similar al detectado en el modelo con receptores B6D2F1, descrito anteriormente.

Al igual que en lo observado en los trasplantes congénicos en receptores B6D2F1, todos los receptores WT trasplantados con 1.500 células LSK injertaron, presentando un porcentaje medio de quimerismo del $13,84 \pm 0,90\%$ en la semana 4 después del trasplante, que alcanzaba el $24,72 \pm 10,52\%$ en la semana 12 después del trasplante. Cuando se infundieron números más altos de células LSK-WT se observaron porcentajes mayores de injerto, alcanzando un $48,61 \pm 5,39\%$ de injerto de células del donante con 5.000 células LSK-WT en la semana 12 después del trasplante (Figura 31 B).

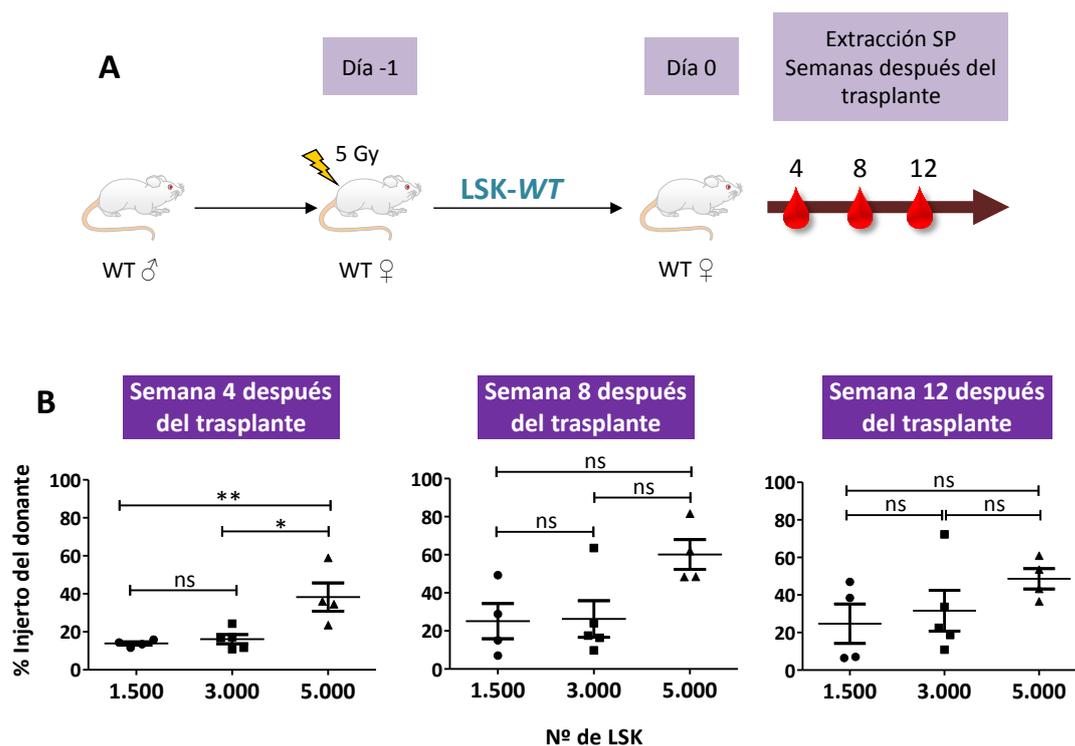


Figura 31: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores WT trasplantados con células LSK de donantes WT. **(A)** Modelo experimental del trasplante singénico de células LSK-WT. **(B)** Niveles de injerto hematopoyético en receptores WT en las semanas 4, 8 y 12 después del trasplante.

4.2.2.- Capacidad de injerto de células LSK-WT en receptores *Fanca*^{-/-}.

Para determinar la capacidad de injerto de células LSK WT en ratones *Fanca*^{-/-} acondicionados con una dosis submieloablative de 5 Gy de radiación, se trasplantó un número creciente de células LSK WT (1.500, 3.000 y 5.000) siguiendo el mismo esquema de trasplante que en los experimentos anteriores (Figura 32 A).

Cuatro semanas después del trasplante, el análisis del injerto de células del donante, analizado por qPCR en SP, mostró que la infusión de 1.500 o 3.000 células LSK-WT resultaba en un fallo de injerto en alrededor del 30% de los receptores *Fanca*^{-/-}, de forma mantenida en el tiempo. Era necesario infundir al menos 5.000 células LSK-WT para observar injerto hematopoyético en todos los receptores *Fanca*^{-/-} (Figura 32 B).

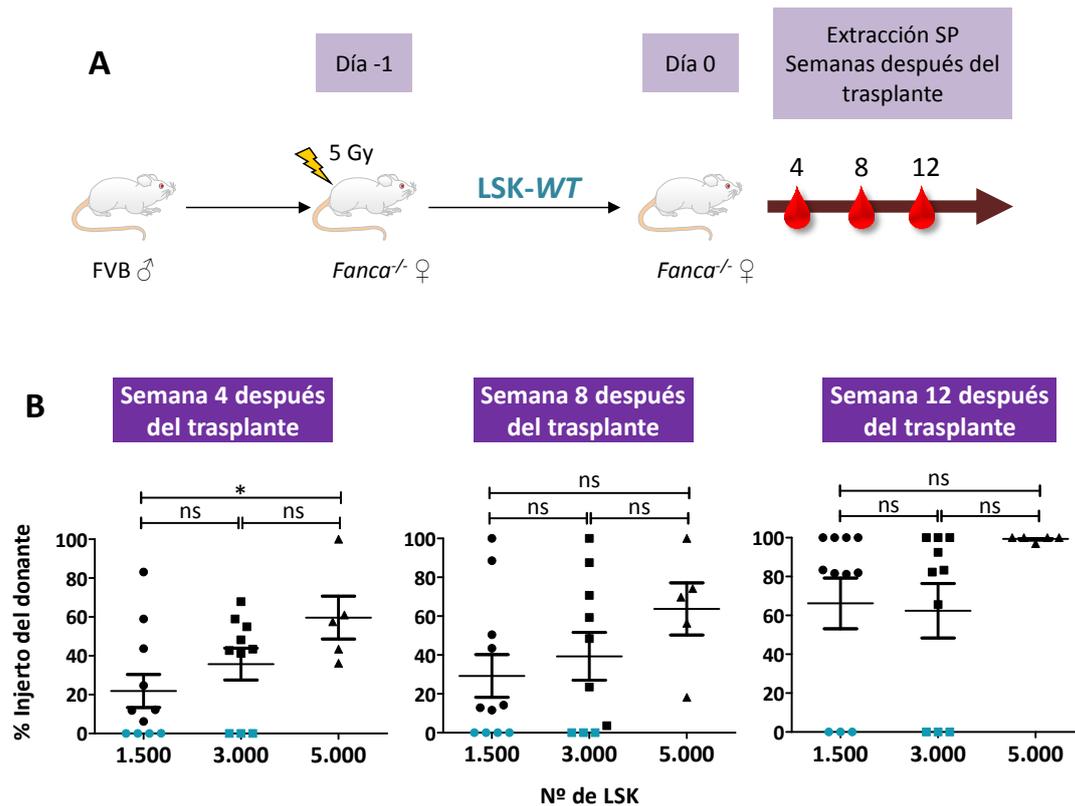


Figura 32: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK de donantes WT. **(A)** Modelo experimental del trasplante singénico de células LSK-WT **(B)** Niveles de injerto hematopoyético en receptores *Fanca*^{-/-} en las semana 4, 8 y 12 después del trasplante.

Los porcentajes de quimerismo observados en los receptores *Fanca*^{-/-} que presentaban injerto hematopoyético en las primeras semanas después del trasplante, llegaron a alcanzar el 100% de quimerismo a las 12 semanas después del trasplante, incluso con dosis de 1.500 células LSK-WT (Figura 32 B).

4.2.3.- Capacidad de injerto de células LSK-*Fanca*^{-/-} en receptores WT.

A continuación estudiamos si las células LSK *Fanca*^{-/-} eran capaces de injertar en receptores WT. Siguiendo el mismo protocolo experimental de trasplante singénico, 1.500, 3.000 o 5.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} de donante macho se trasplantaron en receptores hembras WT acondicionados con una dosis de radiación de 5 Gy (Figura 33 A).

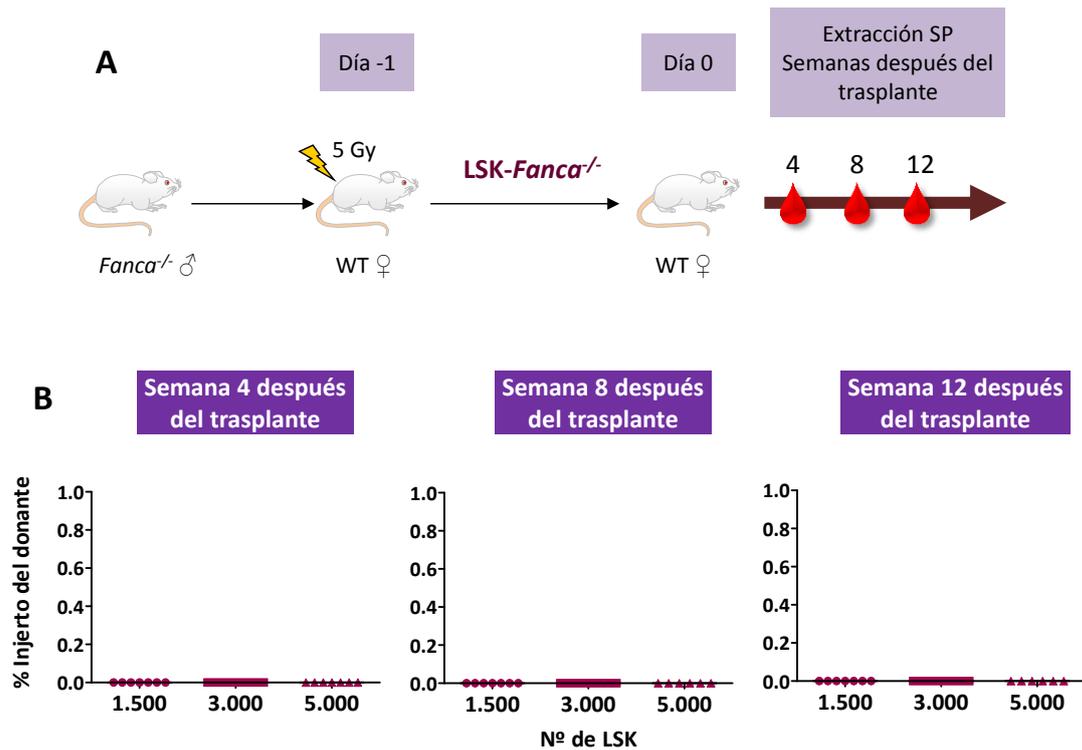


Figura 33: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores WT trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-}. **(A)** Modelo experimental del trasplante singénico de células LSK- *Fanca*^{-/-}. **(B)** Niveles de injerto hematopoyético en receptores WT en las semanas 4, 8 y 12 después del trasplante.

El análisis por qPCR del porcentaje de injerto de células LSK-*Fanca*^{-/-} en los receptores WT mostró que ninguna de las dosis infundidas de células LSK-*Fanca*^{-/-} fueron capaces de injertar en receptores WT (Figura 33 B).

4.2.4.- Capacidad de injerto de células LSK-*Fanca*^{-/-} en receptores *Fanca*^{-/-}.

Con el fin de conocer la capacidad de injerto de células LSK deficientes para el gen *Fanca* en receptores *Fanca*^{-/-}, se infundieron 1.500, 3.000, 5.000 y 10.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} de donantes macho en receptores hembra acondicionados con un dosis submieloablativa de 5 Gy de radiación (Figura 34 A).

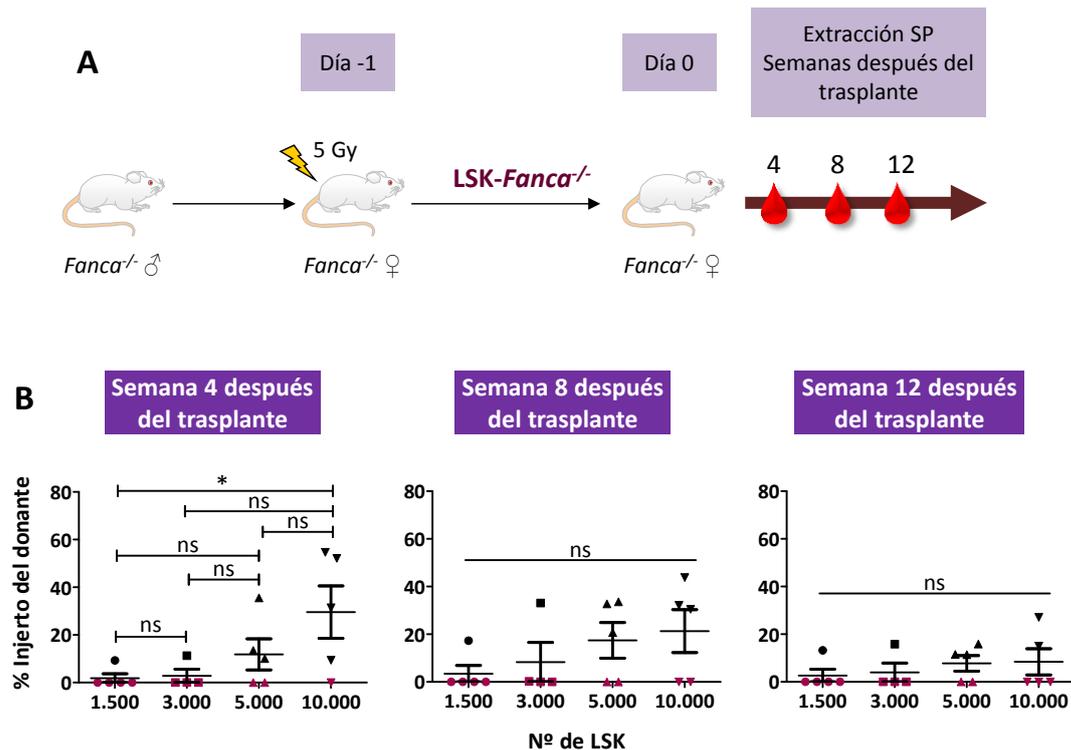


Figura 34: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-}. **(A)** Modelo experimental del trasplante singénico de células LSK-*Fanca*^{-/-}. **(B)** Niveles de injerto hematopoyético en receptores *Fanca*^{-/-} en las semanas 4, 8 y 12 después del trasplante.

Cuatro semanas después del trasplante, se detectó que la infusión de las dosis más bajas de células LSK-*Fanca*^{-/-} (1.500 o 3.000) producían fallo de injerto en el 80% de los receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados. Fue necesaria la infusión de dosis más altas de células LSK-*Fanca*^{-/-} para observar un descenso en el porcentaje de fallo de injerto, siendo del 30% con la infusión de 5.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} y del 20% cuando se trasplantaron 10.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} (Figura 34 B).

En los receptores en los que se detectó injerto hematopoyético del donante, se apreciaba un aumento en el porcentaje de quimerismo a medida que aumentaba la dosis de células LSK-*Fanca*^{-/-} infundidas, siendo éste significativamente mayor a partir de la infusión de 10.000 células con respecto a las 1.500 LSK-*Fanca*^{-/-} (Figura 34 B).

En las semanas 8 y 12 después del trasplante no se apreciaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio. Sin embargo, se observó un descenso en el porcentaje de injerto del donante en aquellos receptores infundidos con 5.000 o 10.000 células LSK-*Fanca*^{-/-}, así como un

aumento de los receptores que perdían el injerto inicial de las fases tempranas post-trasplante (Figura 34 B).

4.2.5.- Biodistribución de las células LSK-Fanca^{-/-} y LSK-WT en receptores Fanca^{-/-}.

Al igual que en el modelo de trasplante congénico en ratones B6D2F1, se estudió la biodistribución de las células LSK-Fanca^{-/-} y las células LSK-WT en receptores Fanca^{-/-}. Así, se infundieron por vía intravenosa 10.000 células LSK teñidas con el colorante vital DID con o sin 600.000 Ad-MSCs. A las 24 horas después del trasplante, los receptores fueron sacrificados y se valoró por citometría de flujo la presencia de células LSK-DID⁺ en la MO, bazo y sangre periférica de los ratones.

El análisis de la MO (Figura 35 A) y de la SP (Figura 35 B) 24 horas después del trasplante no mostró diferencias significativas en la detección de células LSK DID⁺ entre los dos grupos de estudio. Sin embargo, en el bazo de los receptores Fanca^{-/-} se observó un porcentaje significativamente mayor de células LSK-Fanca^{-/-} (20,10 ± 3,35%) en comparación con el porcentaje de células LSK-WT detectadas (5,64 ± 0,65%) (Figura 35 C).

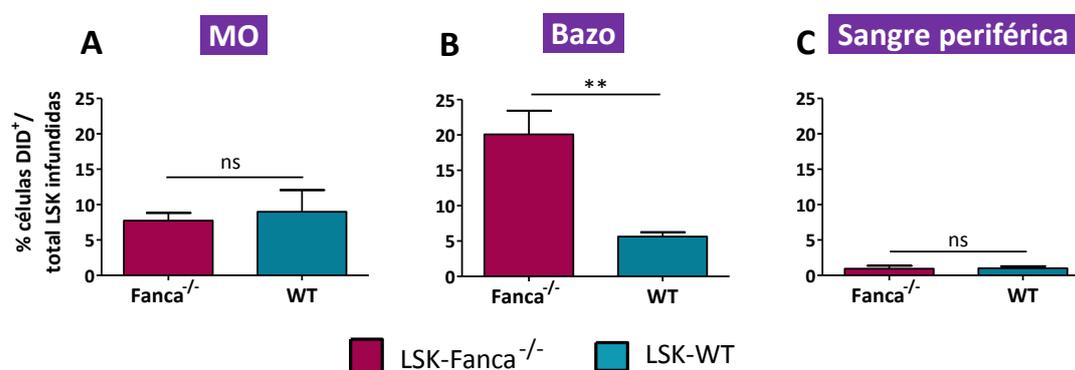


Figura 35: Análisis de biodistribución de células LSK-Fanca^{-/-}-DID⁺ o células LSK-WT-DID⁺ en receptores Fanca^{-/-} por citometría de flujo. Porcentaje de células LSK DID⁺ en (A) la MO, (B) la SP y (C) el bazo.

4.3.- Las Ad-MSCs evitan el fallo de injerto hematopoyético de células singénicas LSK-WT en receptores Fanca^{-/-} con acondicionamiento submieloablativo.

Teniendo en cuenta los fallos de injerto observados en los receptores Fanca^{-/-} tras el trasplante de células LSK-WT, se estudió si la co-infusión con Ad-MSC podía evitarlo.

Receptores *Fancc^{-/-}* fueron co-trasplantadas con 1.500 células LSK-WT por vía intravenosa con o sin 10^6 Ad-MSCs y en las semanas 4, 8 y 12 se analizó el nivel de quimerismo por qPCR (Figura 36 A). Cuatro semanas después del trasplante, el 30% de los receptores infundidos con sólo 1.500 células LSK-WT presentaban fallo de injerto. De forma muy significativa, en los receptores trasplantados con células LSK-WT y Ad-MSCs, no se observó ningún fallo de injerto (Figura 36 B).

En los ratones injertados de ambos grupos, el nivel de quimerismo fue similar, con injertos crecientes a lo largo del tiempo estudiado, llegando a alcanzar el 100% de injerto algunos de los receptores co-infundidos con Ad-MSCs en la semana 8 (Figura 36 B).

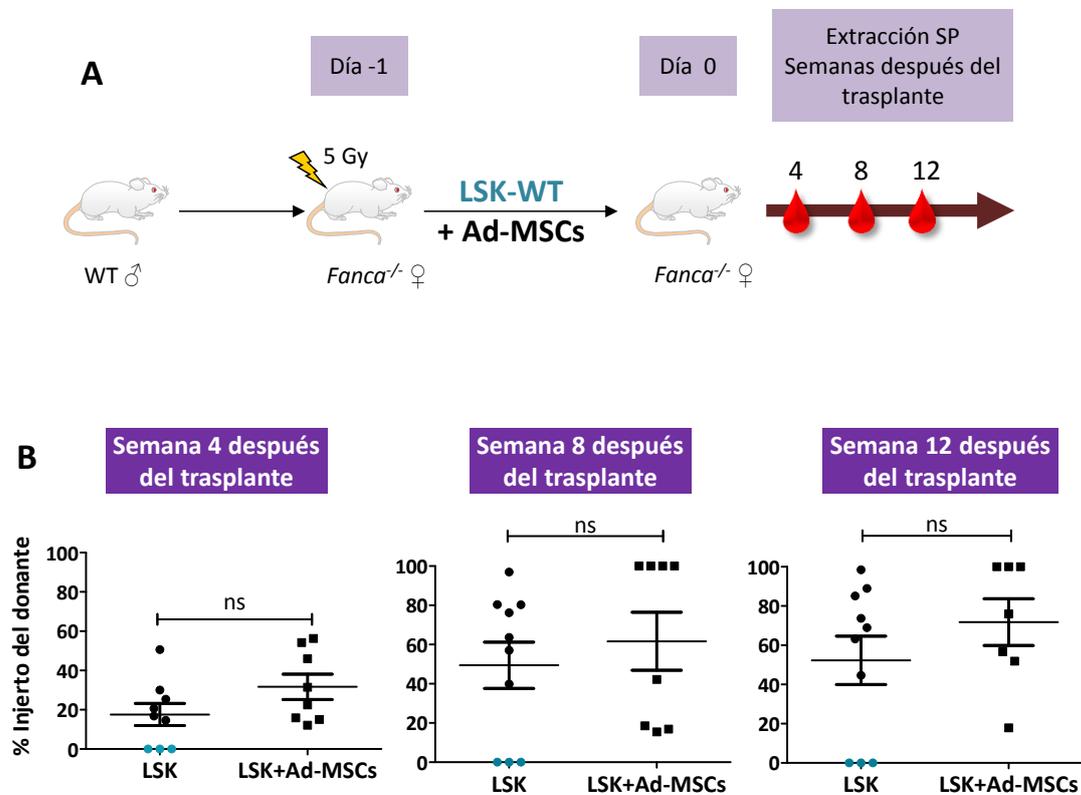


Figura 36: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores *Fancc^{-/-}* trasplantados con células LSK de donantes WT con o sin Ad-MSCs. **(A)** Modelo experimental del trasplante singénico de células LSK-WT con o sin Ad-MSCs. **(B)** Niveles de injerto hematopoyético en receptores *Fancc^{-/-}* en las semana 4, 8 y 12 después del trasplante.

Estos resultados indicaban que el co-trasplante de Ad-MSCs junto con células LSK-WT evitaba el fallo de injerto que se produce tras el trasplante de sólo 1.500 células LSK-WT en receptores *Fancc^{-/-}*.

5.- Análisis del efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto de células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas mediante transferencia génica en trasplantes singénicos en ratones *Fanca*^{-/-}.

Una vez conocido el efecto de las Ad-MSC sobre el injerto en ratones *Fanca*^{-/-}, quisimos estudiar su efecto sobre el injerto de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-FANCA-wPRE*.

5.1.- Transducción y caracterización de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas.

Se obtuvieron células LSK de ratones *Fanca*^{-/-}, que fueron corregidas con el vector PGK-FANCA-wPRE*, según se detalla en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Se valoró por qPCR el porcentaje de transducción, que fue del $76,01 \pm 0,17\%$, con una media de $1,08 \pm 0,28$ copias del vector por célula. Como control se utilizaron células LSK de ratones WT.

5.1.1- Capacidad clonogénica y sensibilidad a MMC de las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas.

Se valoró la capacidad clonogénica de las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas, comparándola con la capacidad de las células LSK-*Fanca*^{-/-} y de células LSK-WT. Las células LSK-*Fanca*^{-/-} formaban colonias con un número menor de células comparadas con las colonias derivadas de LSK-WT. Por el contrario, las colonias formadas a partir de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas presentaban una morfología más compacta, similar a la observada en las colonias de células LSK-WT control (Figura 37 A).

Sin embargo, la cuantificación de las colonias mostró eficacias de formación de colonias similares entre la células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas ($23,67 \pm 8,05\%$), células LSK-*Fanca*^{-/-} ($22,25 \pm 12\%$) y células LSK-WT ($21,5 \pm 4,9\%$) (Figura 37 B).

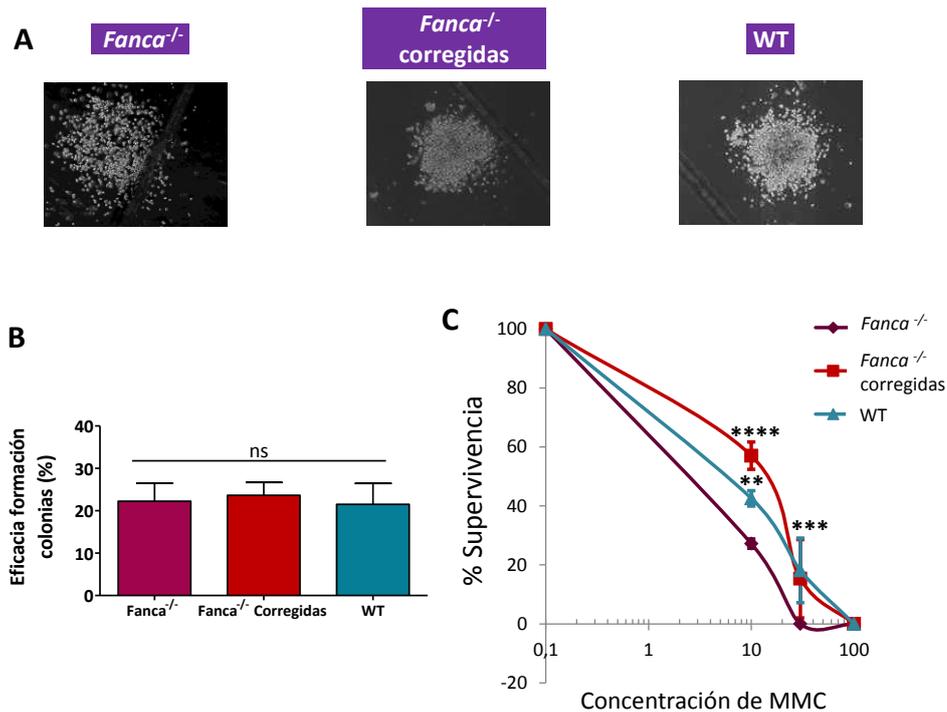


Figura 37: Capacidad clonogénica y sensibilidad a MMC de células LSK-*Fanca*^{-/-}, células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas y células LSK-WT. **(A)** Imágenes representativas de colonias. **(B)** Comparación de la eficacia de formación de colonias. **(C)** Curva de supervivencia a distintas concentraciones de MMC de células LSK-*Fanca*^{-/-}, células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas y células LSK-WT.

Por otro lado se comprobó la sensibilidad a MMC de las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-FANCA-wPRE* y se confirmó que éstas células eran significativamente menos sensibles a MMC que las células LSK-*Fanca*^{-/-}, presentando una curva de supervivencia similar a la de las células LSK-WT (Figura 37 C).

5.1.2.- Estudio del ciclo celular de células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas.

Se realizó un análisis del ciclo celular de las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas para comprobar si la transducción revertía el fenotipo observado en células LSK-*Fanca*^{-/-}, en las que el porcentaje de células en G₀ era menor comparado con el observado en las células LSK-WT.

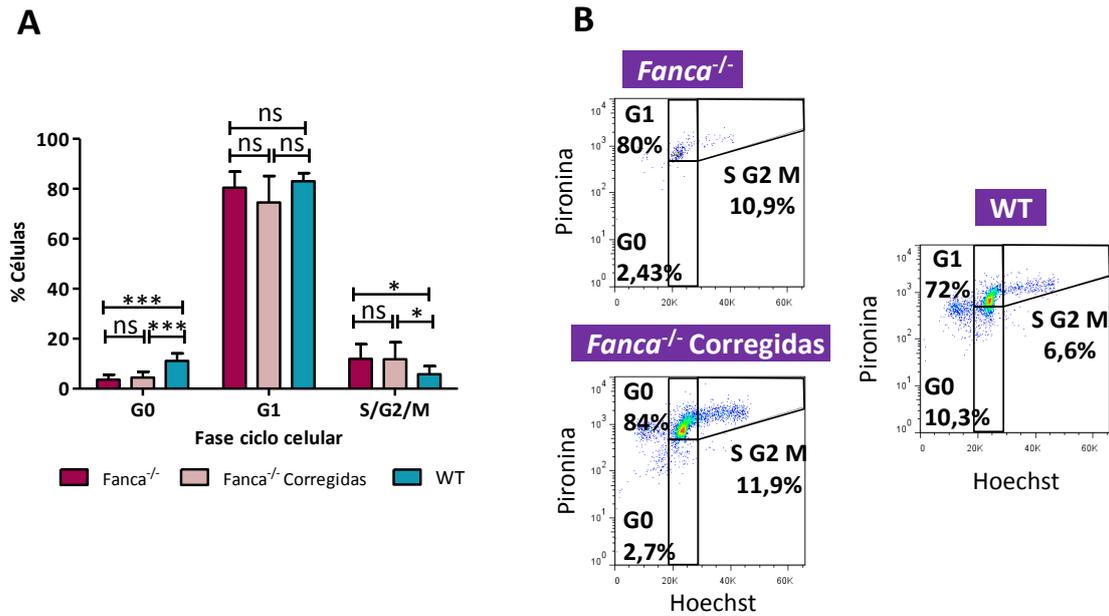


Figura 38: Análisis del ciclo celular de células LSK-*Fanca*^{-/-}, LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas y células LSK-WT. **(A)** Análisis de la proporción de células LSK en fase G₀, G₁ o S/G₂/M del ciclo celular. **(B)** Ejemplo representativo del análisis por citometría de flujo de las distintas fases del ciclo celular.

El análisis por citometría de flujo mostró que la mayoría de las células de los tres tipos celulares se encontraban en la fase G₁ del ciclo celular, tras el cultivo de las células durante la noche (Figura 38 A-B).

Sin embargo, el porcentaje de células en fase G₀ se mantuvo menor en las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas o sin corregir con respecto a las células LSK-WT. También se detectó una mayor proporción de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas o sin corregir en la fase S/G₂/M comparada con las células LSK-WT.

En todos los casos, la proporción de células en las distintas fases del ciclo celular entre las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas o sin corregir fue similar (Figura 38 A-B).

5.2.- Caracterización de la capacidad de injerto de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas.

5.2.1.- Capacidad de injerto de diferentes dosis de células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas en receptores *Fanca*^{-/-}.

Con el fin de conocer la capacidad de injerto de las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-*FANCA*-wPRE*, estudiamos la relación entre el número de células LSK

Fanca^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-FANCA- wPRE* infundidas y el injerto hematopoyético en estos trasplantes. Para ello, se trasplantó un número creciente de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas (1.500, 3.000, 5.000, 10.000, 15.000 o 20.000) en receptores *Fanca*^{-/-}, siguiendo el mismo protocolo de trasplante que en los experimentos anteriores (Figura 39 A).

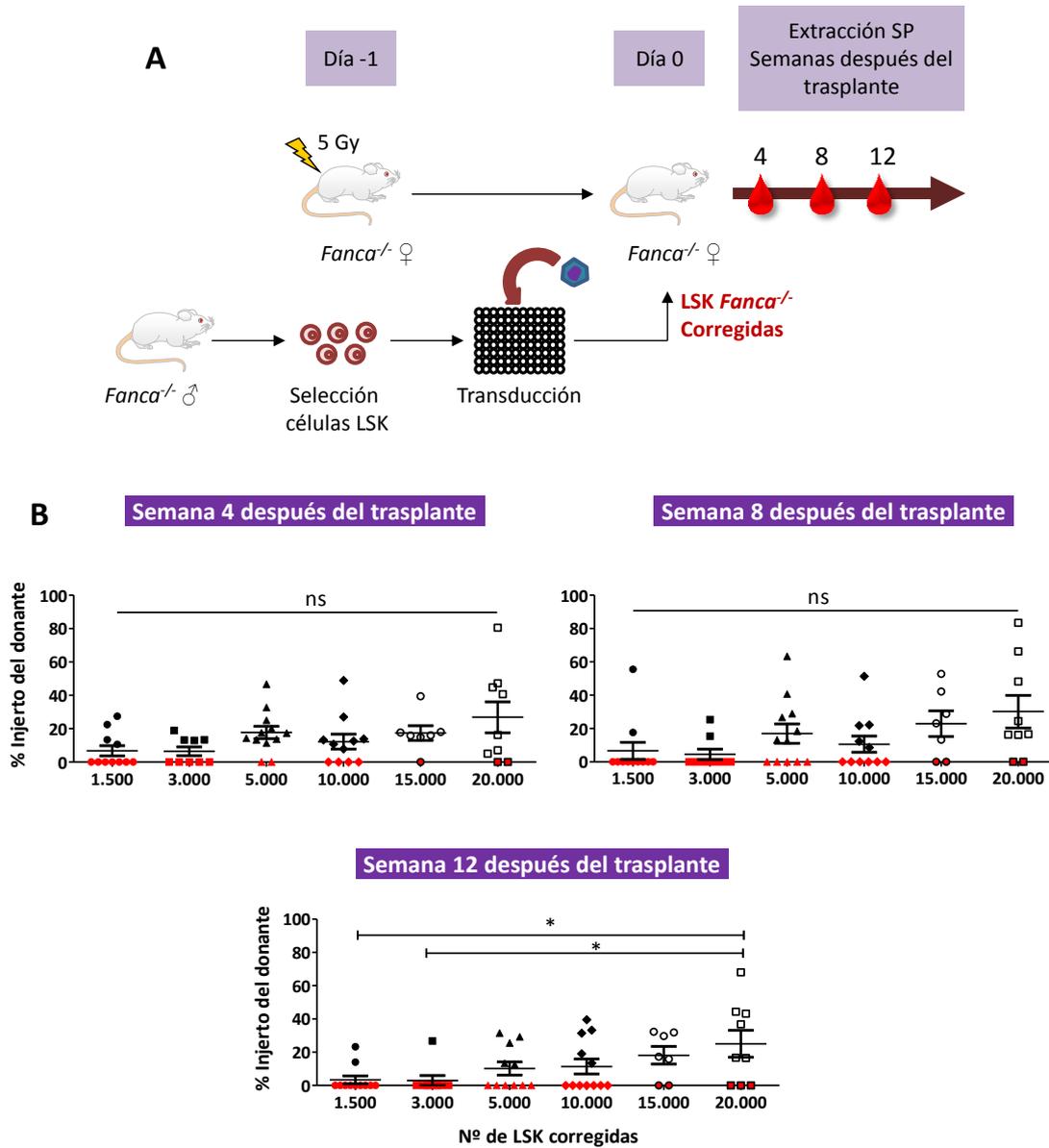


Figura 39: Análisis del quimerismo en receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-FANCA-wPRE*. **(A)** Modelo experimental del trasplante singénico de células LSK- *Fanca*^{-/-} corregidas. **(B)** Niveles de injerto hematopoyético en SP analizados por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} en las semana 4, 8 y 12 después del trasplante.

El análisis del quimerismo a las 4 semanas después del trasplante mostró que todos los grupos presentaban fallos de injerto del donante. Los receptores trasplantados con las dosis más bajas de células corregidas (1.500 y 3.000) mostraban un 60% de fallo de injerto, llegando a alcanzar un 80% en las semanas 8 y 12 después del trasplante. Sin embargo, en los receptores trasplantados con las dosis más altas (de 5.000 a 20.000 células) el fallo de injerto fue alrededor del 20% en todos los tiempos analizados. (Figura 39 B).

En todos los receptores, la media del porcentaje de injerto detectado en las semanas 4 y 8 después del trasplante fue muy similar entre todos los grupos de receptores analizados. Sólo a las 12 semanas después del trasplante se observaron diferencias significativas entre los grupos trasplantados con 1.500 o 3.000 LSK *Fanca*^{-/-} corregidas, que se mantuvo en niveles bajos y el grupo de receptores trasplantado con 20.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas, que alcanzó un porcentaje de injerto del donante del 25,05 ± 8,09% (Figura 39 B).

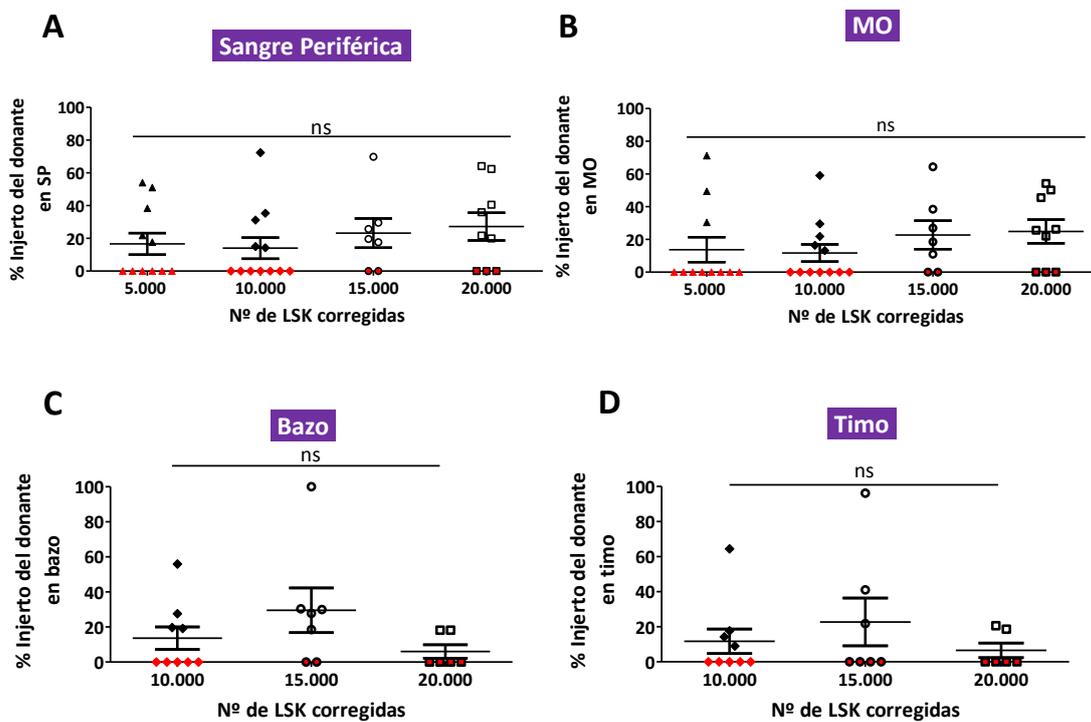


Figura 40: Análisis del quimerismo en tejidos de los receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas a las 16 semanas después del trasplante. Niveles de injerto hematopoyético analizado por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} en (A) SP, (B) MO, (C) Bazo y (D) Timo.

A las 16 semanas después del trasplante, los receptores trasplantados con cantidades entre 5.000 y 20.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas fueron sacrificados y se estudió el nivel de quimerismo en sangre periférica, MO, bazo y timo. En SP, éste se mantuvo en porcentajes de injerto similares a los detectados en la semana 12 después del trasplante (Figura 40 A). En MO no se observaron diferencias significativas en el injerto entre receptores trasplantados con dosis crecientes de células corregidas. Así, se detectaron niveles de quimerismo del $13,75 \pm 7,61\%$ con las dosis más bajas de células, alcanzando un $24,87 \pm 7,26\%$ en el grupo trasplantado con 20.000 células (Figura 40 B). Es de destacar que en dos de los receptores de 5.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas, se observó injerto en SP pero no en MO, sugiriendo la presencia de hematopoyesis extra medular (Figura 40 A y B).

El análisis de células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas en bazo y en timo mostró que estas células estaban presentes en ambos órganos en todos los grupos de estudio (Figura 40 C y D).

También se analizó el número de copias del vector en aquellos receptores que presentaban injerto a las 16 semanas después del trasplante. Para ello, se analizó por qPCR la presencia o ausencia de la secuencia empaquetadora Psi del vector utilizado.

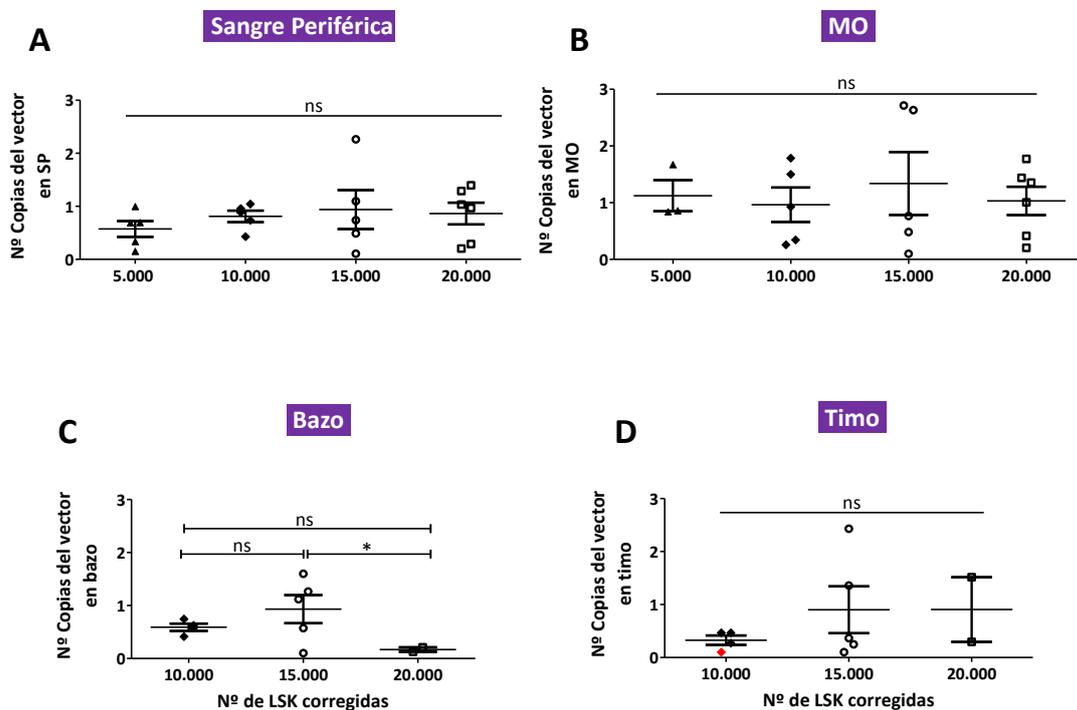


Figura 41: Análisis del número de copias del vector PGK-FANCA-wPRE* por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} corregidas que presentaron injerto del donante a las 16 semanas después del trasplante. Número de copias del vector por células en (A) SP, (B) MO, (C) Bazo y (D) Timo de receptores *Fanca*^{-/-}.

En todos los grupos de estudio, los receptores presentaron un número de copias comprendido entre 0,5 y 1,3 copias del vector por célula, tanto en SP, MO, bazo como en timo, no observándose diferencias significativas entre los tejidos (Figura 41 A- D).

5.2.2- Capacidad de injerto de células LSK- *Fancc*^{-/-} transducidas y sin transducir en receptores singénicos *Fancc*^{-/-}.

Se establecieron 10.000 células LSK-*Fancc*^{-/-} corregidas, como el número de células necesario para producir niveles de quimerismo estable en tan sólo una proporción de receptores *Fancc*^{-/-} y a su vez generar fallo de injerto en otros.

Receptores *Fancc*^{-/-} fueron trasplantados con 10.000 células LSK-*Fancc*^{-/-} corregidas o sin corregir, o con 10.000 células LSK-*Fancc*^{-/-} transducidas con un vector no terapéutico (control) que codificaba la proteína eGFP. Como otro control, se valoró la capacidad de injerto de 10.000 células LSK-*Fancc*^{-/-} corregidas en un receptor control WT.

En los grupos de receptores *Fancc*^{-/-} trasplantados con 10.000 células LSK-*Fancc*^{-/-} o LSK-*Fancc*^{-/-} corregidas o LSK-*Fancc*^{-/-} eGFP, se observaron fallos de injerto en alrededor del 30% de los receptores, que aumentó en las semanas 8 y 12 después del trasplante hasta más del 60% (Figura 42).

En los grupos de receptores *Fancc*^{-/-} trasplantados con células LSK-*Fancc*^{-/-} o células LSK-*Fancc*^{-/-} eGFP, se observó una disminución del quimerismo a lo largo del tiempo, presentando porcentajes de injerto del $8,43 \pm 5,50\%$ en el grupo trasplantado con células LSK-*Fancc*^{-/-} y del $2,90 \pm 2,90\%$ en el grupo trasplantado células LSK-*Fancc*^{-/-} eGFP en la semana 12 después del trasplante (Figura 42).

La infusión de 10.000 células LSK-*Fancc*^{-/-} corregidas en los receptores *Fancc*^{-/-}, tuvo un nivel de injerto superior, alcanzando un injerto medio de $15,01 \pm 4,74\%$ en la semana 12 después del trasplante. Sin embargo, los receptores WT trasplantados con estas mismas células no mostraron injerto del donante en ninguno de los tiempos analizados, manteniéndose su hematopoyesis a expensas de la producción endógena (Figura 42).

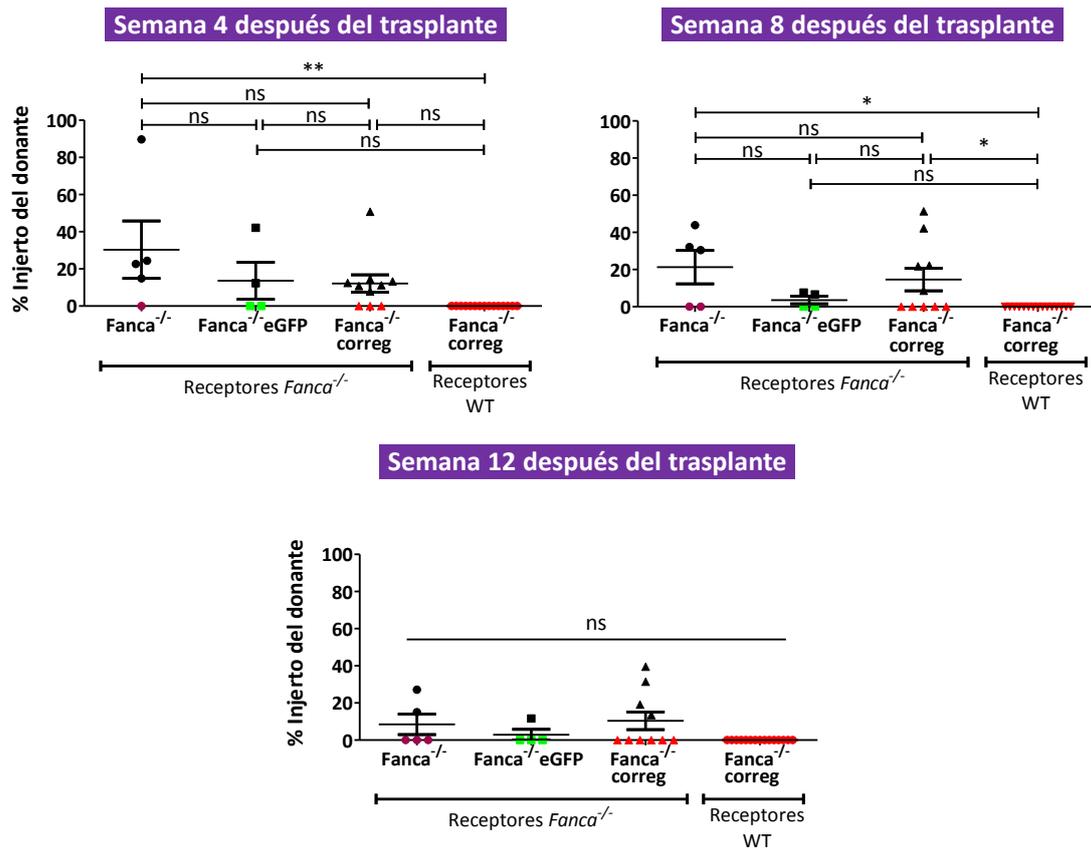


Figura 42: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} o WT trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} sin transducir o transducidas con el vector control PGK-eGFP-wPRE* o el vector PGK-FANCA-wPRE a las 4, 8 y 12 semanas después del trasplante.

A las 16 semanas después del trasplante se sacrificó a los receptores *Fanca*^{-/-} y WT trasplantados con las células *Fanca*^{-/-} corregidas y se analizó el injerto del donante en la SP, MO, bazo y timo. No se observaron diferencias significativas en SP en el nivel de quimerismo entre los distintos grupos de receptores *Fanca*^{-/-}, siendo los porcentajes de injerto muy similares a los observados en la semana 12 después del trasplante (Figura 43 A).

Se detectaron porcentajes similares de injerto en la MO respecto a los observados en la SP de los receptores *Fanca*^{-/-}, a excepción de aquellos que habían sido trasplantados con 10.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} que presentaron porcentajes de injerto del $8,33 \pm 5.27\%$ en MO frente al $29,67 \pm 19,92\%$ observado en SP (Figura 43 A y B).

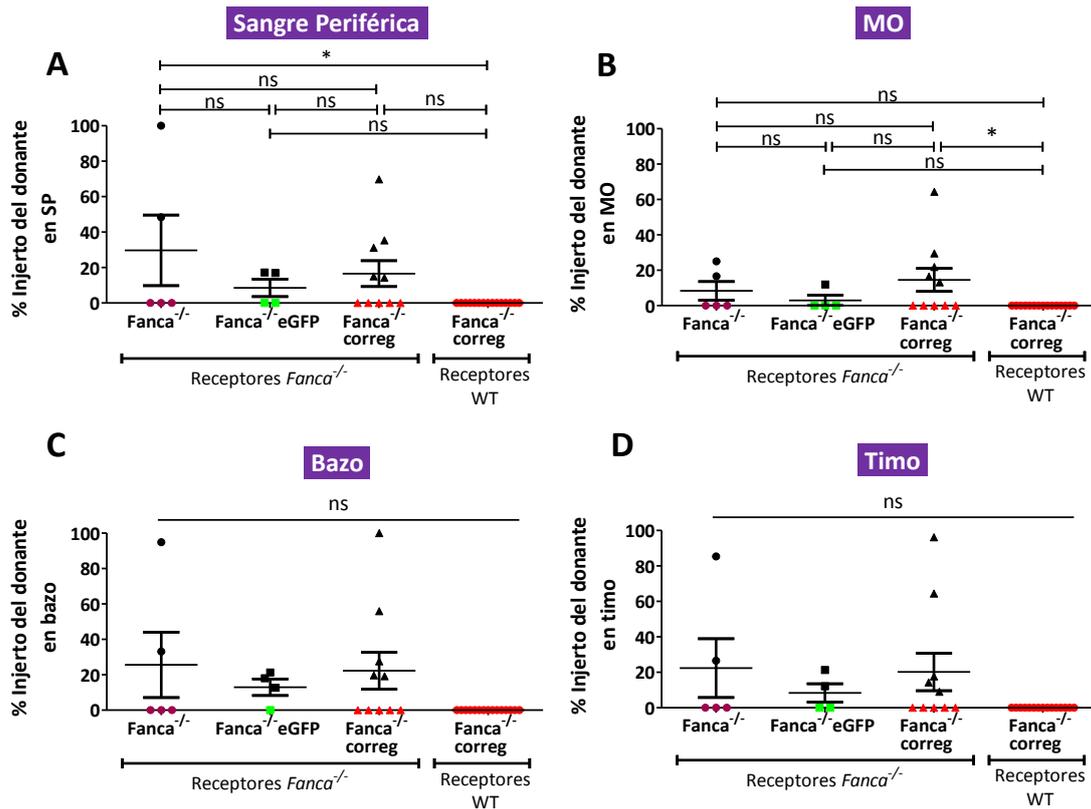


Figura 43: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} o WT trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} sin transducir o transducidas con el vector PGK-*eGFP*-wPRE* o el vector PGK-*FANCA*-wPRE* a las 16 semanas después del trasplante. Niveles de injerto hematopoyético en receptores *Fanca*^{-/-} o WT en (A) SP, (B) MO, (C) Bazo y (D) Timo.

En todos los receptores de los distintos grupos de estudio que habían mostrado niveles de quimerismo del donante en SP y MO, también se detectó injerto del donante en el bazo y en el timo (Figura 43 C y D).

5.3.- Las Ad-MSCs evitan el fallo del injerto hematopoyético de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas con el vector PGK-*FANCA*-wPRE* en receptores *Fanca*^{-/-}.

En los experimentos anteriores caracterizamos la capacidad de injerto de las células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-*FANCA*-wPRE* en un modelo de trasplante singénico de ratón con un acondicionamiento submieloablatoivo, detectando que la corrección mediante terapia génica no bastaba para evitar en fallo de injerto.

Como siguiente paso, estudiamos el impacto de las Ad-MSCs sobre el injerto de 10.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas, con o sin la co-infusión de 400.000 Ad-MSCs, trasplantadas en

receptores *Fanca*^{-/-}, siguiendo el mismo protocolo de trasplante que en los experimentos anteriores (Figura 44 A).

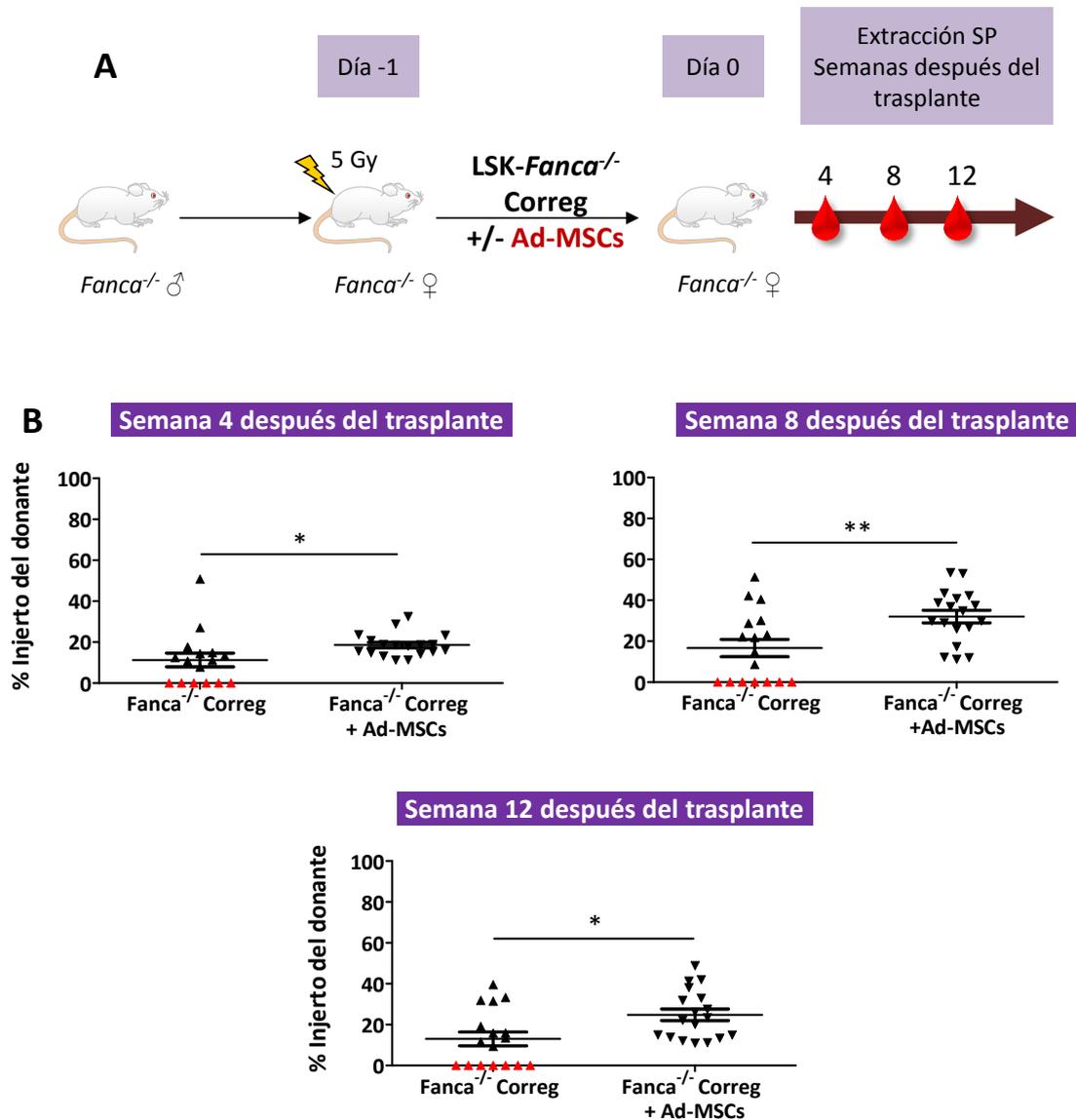


Figura 44: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} corregidas con o sin Ad-MSCs. **(A)** Modelo experimental del trasplante singénico de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas con o sin Ad-MSCs. **(B)** Niveles de injerto hematopoyético en receptores *Fanca*^{-/-} en las semana 4, 8 y 12 después del trasplante.

El análisis del quimerismo en sangre periférica mostró que la co-infusión de Ad-MSCs junto con 10.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas evitó el fallo de injerto observado en el grupo de receptores trasplantados sin Ad-MSCs, a todos los tiempos analizados (Figura 44 B). Así, 4 semanas después del trasplante, los receptores que sólo recibieron células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas mostraron injertos del $11,28 \pm 3,32\%$, detectándose un 37% de receptores con fallo

de injerto. Por el contrario, los receptores trasplantados con Ad-MSCs no presentaron fallos de injerto en ningún caso, alcanzando un quimerismo del donante del $18,62 \pm 1,34\%$.

En la semana 8 después del trasplante, el grupo de receptores trasplantados sólo con células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas tuvo un 41% de fallo de injerto y el quimerismo de los receptores alcanzó el $16,68 \pm 4,23\%$. Sin embargo, el grupo de receptores co-infundido con Ad-MSCs no presentó ningún fallo de injerto y alcanzó un nivel de quimerismo del donante del $32,03 \pm 3,05\%$ (Figura 44 B).

A las 16 semanas después del trasplante se valoró el porcentaje de injerto del donante en la SP, MO, bazo y timo de ambos grupos de estudio. Como en las semanas previas, en la sangre periférica de los receptores que sólo habían recibido células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas, se detectó un 47% de fallo de injerto y un nivel de quimerismo del $19,56 \pm 6,20\%$ en todos los receptores. También en este momento, los receptores co-trasplantados con células corregidas y Ad-MSCs no mostraron ningún fallo de injerto y se detectó el $38,80 \pm 4,53\%$ de células del donante (Figura 45 A).

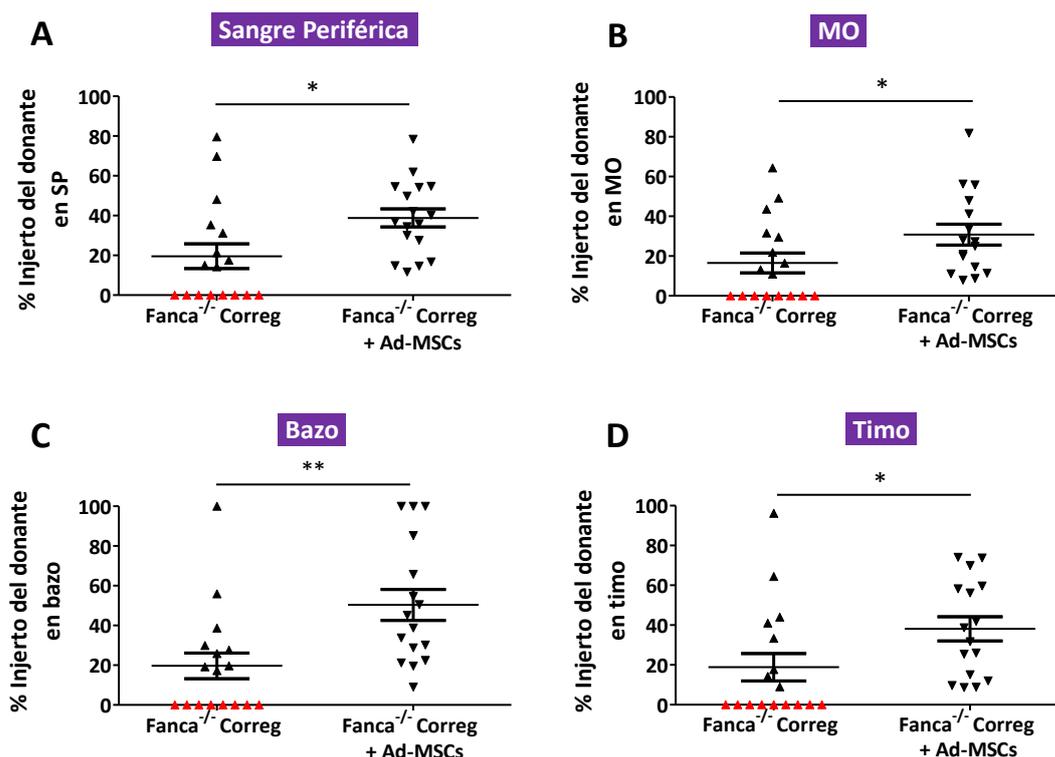


Figura 45: Análisis del quimerismo por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-FANCA-wPRE* con o sin Ad-MSCs a las 16 semanas después del trasplante. Niveles de injerto hematopoyético detectados por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} en (A) SP, (B) MO, (C) Bazo y (D) Timo.

Resultados similares a los detectados en la SP de fallo de injerto y de quimerismo del donante se observaron en la MO de ambos grupos de estudio (Figura 45 B).

Todos los receptores que presentaron niveles de quimerismo del donante en la SP mostraron injerto de donante en el bazo, no apreciándose fallos de injerto en los receptores co-trasplantados con Ad-MSCs, pero sí en los receptores que sólo recibieron células corregidas. Además, se observaron porcentajes de injerto significativamente mayores en el grupo de receptores co-infundido con Ad-MSCs ($50,34 \pm 7,76\%$) comparados con los niveles detectados en el bazo de los receptores que sólo recibieron células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas ($19,67 \pm 6,49\%$) (Figura 45 C).

En el timo, todos los receptores que había sido co-infundidos con Ad-MSCs presentaron injerto del donante, alcanzando el $38,15 \pm 6,08\%$ de quimerismo. Sin embargo, sólo en el 53% de los receptores que habían recibido células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas se detectaron células del donante ($18,83 \pm 6,84\%$) (Figura 45 D).

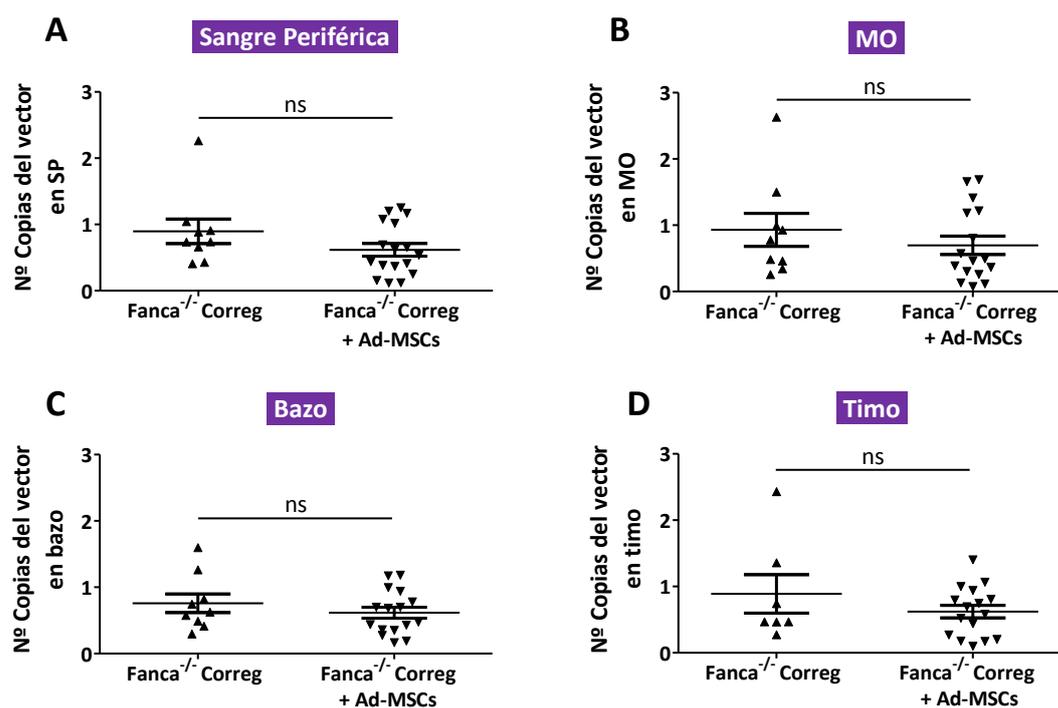
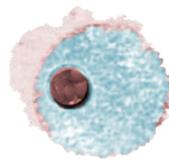


Figura 46: Análisis del número de copias del vector PGK-FANCA-wPRE* por qPCR en receptores *Fanca*^{-/-} trasplantados con células LSK de donantes *Fanca*^{-/-} corregidas con o sin Ad-MSCs que presentaron injerto del donante a las 16 semanas después del trasplante. Número de copias del vector por células en (A) SP, (B) MO, (C) Bazo y (D) Timo de receptores *Fanca*^{-/-}.

También se estudió el número de copias del vector por células en los órganos analizados. Todos los receptores que presentaban algún grado de quimerismo en la SP, MO, bazo y timo presentaban copias del vector en sus células (Figura 46). Tanto en SP, MO, bazo y timo el número de copias fue similar siempre cercano a 1 copia del vector por célula (Figura 46 A-D).

En este modelo de ratón con alto riesgo de fallo de injerto, los resultados indican que la co-infusión de Ad-MSCs evita el fallo de injerto y mejora el nivel de quimerismo del donante tras el trasplante de células LSK-*Fancc*^{-/-} corregidas genéticamente. Estas observaciones tienen gran relevancia clínica en el contexto de los protocolos actuales de terapia génica hematopoyética, pues sugieren que la infusión de MSCs junto con las CMHs corregidas limitaría los fallos de injerto y mejoraría los niveles de reconstitución de las células corregidas en pacientes no acondicionados o acondicionados con dosis submieloablativas.



Discusión

1.- Las Ad-MSCs mejoran el injerto de células LSK en receptores congénicos.

Las células estromales mesenquimales comprenden una población heterogénea de células multipotentes que pueden ser aisladas de varios tejidos y cultivadas *ex vivo* para uso clínico (38, 70, 189). Su aplicación más frecuente se basa en sus propiedades inmunosupresoras, como por ejemplo para el tratamiento de EICH severa resistente a corticoides en trasplantes alogénicos de CMHs (127, 128). Tanto la experiencia clínica como la experimental apoyan que la infusión de MSCs *in vivo* es segura, pues hasta el momento no se ha detectado ningún evento de transformación tumoral generada durante su expansión *in vitro*, ni ningún efecto adverso derivado de su administración *in vivo* (125, 128, 129).

Una aplicación menos estudiada de las MSCs es su efecto sobre el injerto de CMHs en receptores sometidos a trasplantes hematopoyéticos. Distintos estudios experimentales han demostrado un efecto beneficioso de las MSCs sobre el injerto hematopoyético en trasplantes xenogénicos (6, 32, 178, 184). En estos estudios, ratones NOD/SCID fueron co-trasplantados con células madre hematopoyéticas CD34⁺ humanas y MSCs, observándose en todos los casos una mejora del injerto hematopoyético humano con respecto a una infusión sin MSCs.

En humanos, las MSCs también han sido aplicadas a nivel clínico para incrementar y/o acelerar el injerto hematopoyético en trasplantes alogénicos con riesgo de fallo de injerto (13, 64, 130, 259, 260). Uno de los factores de riesgo a tener en cuenta es la propia enfermedad de base del paciente. Así, Fang y colaboradores (64) publicaron dos casos pediátricos con anemia aplásica y fallo de injerto tras recibir un trasplante alogénico de un familiar histocompatible. En estos pacientes, trasplantes posteriores de células CD34⁺ alogénicas del mismo donante junto con MSCs generaron un injerto hematopoyético estable y con quimerismo completo del donante.

También se han encontrado efectos beneficiosos en pacientes en donde el factor de riesgo estaba asociado al trasplante de MO de donantes familiares con diversos grados de disparidad HLA o de donantes no relacionados. Es de destacar el trabajo de Le blanc y colaboradores (130) en el que tres pacientes que habían tenido un fallo de injerto en trasplantes previos fueron co-trasplantados con CMHs y MSCs, previniendo esta vez el fallo de injerto previo y detectándose un injerto linfocitario precoz con respecto a la experiencia previa, no sólo en estos pacientes sino también en otros cuatro pacientes. También relacionado con el tipo de donante, en otro estudio llevado a cabo por Ball y colaboradores (13), se realizaron trasplantes haploidénticos en pacientes pediátricos con distintas patologías hematológicas, donde se mostró que la co-

infusión de MSCs y CMHs alogénicas evitaba el 15% de fallo de injerto observado en un grupo histórico control. Resultados similares se obtuvieron más recientemente en un ensayo llevado a cabo por Wu y colaboradores (260) que incluyó a cincuenta pacientes trasplantados con CMHs de donantes haploidénticos, en los que se co-infundieron MSCs sin que se detectara ningún fallo de injerto hematopoyético.

Es de destacar un estudio en el que dos pacientes con aplasia producida tras un trasplante con CMHs de donantes con grupo ABO incompatible fueron infundidos con las MSCs alrededor de tres meses después del trasplante (65). De manera llamativa, la infusión aislada de MSCs recuperó la hematopoyesis generada a partir de CMHs trasplantadas con antelación.

Puesto que las MSCs poseen propiedades inmunosupresoras importantes y en todos estos casos mencionados se trataba de trasplantes alogénicos, una explicación sobre la eficacia de las MSCs para el injerto hematopoyético podría estar relacionada con estas propiedades (129, 262), que limitarían la respuesta inmune del receptor contra el injerto.

A pesar de los resultados descritos, existen otros estudios clínicos en los que la infusión de MSCs no mostró ningún efecto. Es de recalcar que en estos casos los trasplantes fueron realizados con sangre de cordón umbilical con alto grado de histocompatibilidad y a las dosis de CMHs recomendadas (19, 80, 146). Así, en un estudio llevado a cabo por MacMillan y colaboradores (146) ocho pacientes recibieron CMH de sangre de cordón y todos fueron infundidos con MSCs. En este trabajo el momento de la infusión de las MSCs fue variable, cinco de ellos recibieron las MSCs cuatro horas antes del trasplante y tres recibieron dos dosis de MSCs, la primera, cuatro horas antes del trasplante y la segunda 21 días después. Todos los pacientes injertaron, sin detectarse diferencias en el injerto hematopoyético comparado con el grupo control. En un estudio piloto llevado a cabo por Gonzalo-Daganzo y colaboradores (80) en nueve pacientes trasplantados con CMHs de sangre de cordón como tratamiento de neoplasias hematológicas, la infusión de las MSCs 24h después del trasplante no produjo ningún efecto sobre el injerto. Resultados similares obtuvieron Bernardo y colaboradores en otro estudio llevado a cabo en 13 pacientes pediátricos con distintas patologías hematológicas tras la infusión de MSCs 4h antes del trasplante de CMHs (19).

Estos últimos estudios comparten algunas características que podrían explicar la ausencia de efecto de las MSCs. La primera es que las MSCs no fueron co-infundidas junto con las CMHs, sino que su administración fue adelantada o retrasada varias horas respecto a la infusión de las CMHs. En segundo lugar, la dosis de CMHs que recibieron fue la dosis recomendada para el tipo de trasplante que se estaba realizando. Es decir, parecería que las MSC son eficaces para la

mejora del injerto hematopoyético cuando las condiciones del trasplante no son las deseadas, por ejemplo, donantes no relacionados, identidad HLA no idéntica y patologías de base con dificultades de injerto, todas ellas, situaciones en las que el aspecto inmunológico podría jugar un papel de especial importancia.

En la mayoría de los estudios descritos, las MSCs procedían de un segundo donante diferente al donante de las CMHs, la mayoría de la veces de un donante haploidéntico, pero en muchos casos de donantes no relacionados y no histocompatibles, sin que se encontrara ninguna correlación entre el origen de las MSCs y su eficacia sobre el injerto (13, 19, 64, 69, 80, 148, 259).

El papel que las MSCs podrían tener sobre el injerto hematopoyético en el que no mediaran estos efectos inmunosupresores, como es el caso de los trasplantes autólogos, es un aspecto que ha sido muy poco estudiado. En un estudio descrito por Koç y colaboradores (116), pacientes sometidos a trasplantes autólogos para el tratamiento de cáncer de mama fueron confundidas con MSCs junto con las CMHs. Los resultados demostraron que la co-infusión de las MSCs no producía ningún efecto adverso, pero no se demostró ningún efecto beneficioso sobre el injerto hematopoyético debido a la ausencia de un grupo control comparativo.

En su conjunto, en la actualidad se desconoce si existe un efecto de las MSCs directo que favorezca el injerto de progenitores hematopoyéticos sin que medie un efecto inmunosupresor presente en el contexto alogénico. Si esto se demostrara, se abriría un nuevo campo de aplicación de las MSCs para trasplantes autólogos en los que existiera riesgo de fallo de injerto, por ejemplo, debido a la infusión de un bajo número de CMH, a un acondicionamiento de intensidad muy reducida o a la patología de base del receptor. Este podría ser el caso de los trasplantes incluidos en protocolos de terapia génica, en los que las MSCs facilitarían el injerto de un bajo número de CMH modificadas genéticamente.

Por ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético en un contexto de trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogos con fenotipo linaje⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺ (LSK). En la mayoría de los trabajos publicados sobre MSCs, la fuente de obtención de las MSCs fue la MO. En este estudio hemos utilizado Ad-MSCs debido a la fácil disponibilidad y cultivo de estas células y a que las características fenotípicas y funcionales de las Ad-MSCs y las MO-MSCs son similares (73, 191, 262).

Este posible efecto de las Ad-MSCs se ha testado en un modelo de trasplante congénico de ratón basado en la infusión de células LSK de donantes CD45.1/CD45.2 en receptores CD45.2.

Esta diferencia fenotípica no genera una respuesta inmune y permite detectar las células del donante injertadas.

En los trasplantes de CMHs para el tratamiento de patologías hematológicas malignas se utilizan acondicionamientos mieloablativos con el fin de erradicar la enfermedad de base del paciente, además de para preparar el nicho hematopoyético para el anidamiento de las CMHs infundidas. Sin embargo, los acondicionamientos de este tipo llevan asociados una alta toxicidad (12). Por ello, en la actualidad se utilizan de forma creciente acondicionamientos no mieloablativos o de intensidad reducida. Sin embargo, este tipo de acondicionamientos puede dificultar el injerto hematopoyético, al estar el nicho de la médula ósea ocupado con la hematopoyesis endógena del receptor.

Para detectar el posible efecto beneficioso de las Ad-MSCs, en este trabajo se ha realizado un acondicionamiento submieloablativo seguido del trasplante congénico de un número bajo de células LSK, desarrollando así un modelo en el que el injerto hematopoyético del donante estuviera limitado. Resnick y colaboradores (198) demostraron que un acondicionamiento submieloablativo seguido de la infusión de células LSK congénicas producía un injerto estable, dependiente de la dosis de radiación administrada. En este trabajo, los receptores acondicionados con una dosis de radiación de 7 Gy y trasplantados con una dosis reducida de células LSK (1.500), presentaron niveles de quimerismo del donante del 60% a 4 semanas post-trasplante (Figura 16 B). Este elevado nivel de injerto probablemente se explicaría porque se trata de una dosis de radiación asociada una alta mortalidad de la hematopoyesis endógena, lo que favorecería el injerto del donante.

Los receptores acondicionados con 3 Gy presentaron niveles de quimerismo muy bajos (Figura 16 D), consistente con una baja mortalidad de la hematopoyesis endógena, lo que dificultaría el anidamiento de las células LSK infundidas en la médula ósea. Los ratones que recibieron una dosis intermedia de radiación de 5 Gy, mostraron un injerto de alrededor del 20% (Figura 16 C), dosis que se eligió para investigar el posible efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético.

En un segundo paso, utilizando las mismas dosis de radiación y de células LSK, se comprobó el efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético en los receptores. Los experimentos mostraron que la co-infusión de Ad-MSCs no tenía ningún impacto en el injerto de células LSK (1.500), ni en receptores acondicionados con 7 Gy, que se mantuvieron elevados en todos los casos, ni de 3 Gy, los cuales siempre fueron bajos. Estos resultados indicaban que en los casos

en los que el acondicionamiento facilitaba (7 Gy) o dificultaba en exceso (3 Gy) el injerto hematopoyético de las células LSK, las Ad-MSCs no producían ningún efecto (Figura 18 B).

De manera interesante, cuando las Ad-MSCs se infundieron junto con las células LSK tras una dosis de radiación de 5 Gy, se detectó un aumento muy significativo en los niveles de quimerismo de las células LSK del donante, duplicando los niveles detectados en ausencia de Ad-MSCs (Figura 18 B). Estos resultados apuntaban a que con esta dosis de radiación, se producía una eliminación moderada de la hematopoyesis endógena pero suficiente para permitir el injerto hematopoyético y que éste aumentase significativamente con la co-infusión de las MSCs.

Park y colaboradores (184) observaron que en ratones NOD/SCID trasplantados con células humanas CD34⁺, el injerto humano era dependiente de la dosis de MSCs trasplantadas. En concordancia con este estudio, los resultados obtenidos en este trabajo también mostraron un efecto dependiente de la dosis de Ad-MSCs en los trasplantes congénicos realizados (Figura 19). Este incremento fue significativo durante las primeras 4 semanas después del trasplante, aún con dosis relativamente bajas de MSC. A las 8 y 12 semanas, a pesar de que los injertos fueron siempre superiores en el grupo que recibió Ad-MSCs, sólo los grupos que fueron infundidos con las dosis elevadas de Ad-MSCs (6×10^5 o más Ad-MSCs/ratón), se mantuvo una diferencia significativa entre los grupos de estudio. Es de recalcar que a nivel clínico, la mera mejora del injerto a corto plazo en los pacientes tiene marcada importancia, pues es un periodo especialmente crítico para la aparición de infecciones oportunistas favorecidas por la leucopenia y por la necesidad de transfusiones de hematíes y plaquetas.

En los siguientes experimentos, basados en trasplantes seriados a receptores secundarios y terciarios, se demostró que las Ad-MSCs no sólo aumentaban el injerto de células hematopoyéticas responsables de la reconstitución a corto plazo (ST), sino que también lo hacían con las células responsables del injerto a largo plazo (LT), las verdaderas CMHs (Figura 20). Así, se observó un mayor número de células LSK injertadas en los receptores primarios que habían recibido 1.500 células LSK junto con 600.000 Ad-MSCs, lo que parecía indicar que las Ad-MSCs favorecían el *homing* de las células LSK hacia el nicho hematopoyético de la médula ósea. Esta hipótesis fue confirmada por los experimentos de biodistribución, en los que se observó que las Ad-MSCs aumentaban el número de células LSK detectadas en la MO de los receptores durante las primeras horas tras el trasplante (Figura 21).

El mecanismo por el que actúan las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético en un contexto autólogo podría deberse a varias causas. Se ha demostrado que el estroma puede dañarse por los efectos de la quimio/radioterapia, incluyendo la administrada durante el acondicionamiento

previo al trasplante. Es decir, que el soporte podría estar dañado y el injerto de los progenitores hematopoyéticos infundidos podría estar comprometido (41, 71), por lo que se ha postulado que las MSCs podrían mejorar este estroma al contribuir con la regeneración del microambiente medular (116). Hay que tener en cuenta que las MSCs son un componente esencial del nicho hematopoyético donde contribuyen a su estructura y a la auto-renovación, proliferación y diferenciación de las CMHs a través de la secreción de numerosos factores de crecimiento y citoquinas (38, 111, 159, 189). Sin embargo, prácticamente la totalidad de los estudios coinciden en que el estroma, aún después de acondicionamientos mieloablativos, sigue siendo de los receptores (212) y son muy limitados los casos en los que se ha detectado el injerto de MSCs aisladas a tiempos más prolongados tras el trasplante (31, 32) por lo que éste no parece ser el mecanismo subyacente (212).

Otro de los posibles mecanismos podría ser paracrino, como consecuencia de la secreción de diferentes factores de crecimiento y citoquinas por estas células, tales como IL-6, IL-11, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), *stem cell factor* (SCF) o el ligando Flt-3. (38, 189). Éstos podrían incrementar el anidamiento y la proliferación de las CMHs que llegaron a la MO, favoreciendo la aparición de células hematopoyéticas del donante en la sangre periférica de los receptores.

Para valorar esta posibilidad, se administraron Ad-MSCs por vía intravenosa junto con las células LSK o por vía intraperitoneal. Los resultados obtenidos mostraron que cuando las Ad-MSCs no eran co-infundidas junto con las células LSK, el efecto beneficioso de las Ad-MSCs sobre el injerto hematopoyético no era detectable, comparado con el incremento detectado en el quimerismo cuando ambas poblaciones se infundían simultáneamente por vía intravenosa (Figura 23). Estos resultados contrastaban con los obtenidos previamente por nuestro grupo (182), en el que las Ad-MSCs trasplantadas por vía intraperitoneal eran capaces de controlar la enfermedad injerto contra huésped (EICH) en ratones trasplantados con células de MO alogénicas, indicando que los factores solubles liberados por las Ad-MSCs eran un factor clave para el control del EICH, pero no para la mejora del injerto hematopoyético.

Para confirmar esta falta de efecto, se infundió de forma fraccionada la dosis de MSCs eficaz (dosis iguales o superiores a 6×10^5 MSC/ratón), por lo que la dosis co-infundida simultáneamente junto con las LSK era siempre inferior a la dosis eficaz. Una vez más, se confirmó que era necesaria la co-infusión simultánea de la dosis mínima de Ad-MSCs definida en los experimentos de dosis /dependencia, para detectar una mejora del injerto (Figura 22).

Estos resultados, junto con la observación de que bastaban 10 minutos de incubación para que la mayoría de las células LSK co-localizaran con las Ad-MSCs (Figura 24), indicaban que la

interacción LSK-Ad-MSCs es un requisito para aumentar el injerto de las células LSK trasplantadas. Las imágenes obtenidas mediante el citómetro de flujo ImageStream100 confirmaron que existía una interacción directa entre las Ad-MSCs y las células LSK. Es decir, las Ad-MSCs podrían estar interaccionando con los progenitores hematopoyéticos a través de algunas de las numerosas moléculas de adhesión que expresan, tales como VCAM-1, VLA-4 o CD44 (51, 187, 245) y que la expresión de receptores quimiotácticos en las Ad-MSCs, como CXCR4, favorecería la migración de ambas poblaciones hacia la MO en respuesta a gradientes de quimioquinas como CXCL12, CXCL13 o CXCL16 (214).

Los resultados obtenidos en este estudio podrían tener una aplicación práctica en los trasplantes autólogos de CMHs, particularmente en el campo de la terapia génica, donde la infusión de un número bajo de CMHs y el uso de un régimen de acondicionamiento de baja intensidad podría ser un impedimento para reestablecer la hematopoyesis de los pacientes trasplantados con CMHs autólogas corregidas por terapia génica.

2.- Las Ad-MSCs evitan el fallo de injerto asociado al trasplante de dosis limitantes de CMHs *Fanca*^{-/-} corregidas genéticamente en receptores singénicos.

Para demostrar que las MSCs podrían mejorar el injerto hematopoyético de CMHs autólogas corregidas mediante terapia génica, se testó esta hipótesis en un modelo de ratón con alto riesgo de fallo de injerto y con relevancia clínica. Dado que la División de Terapias Innovadoras en Hematopoyesis está coordinando un protocolo clínico de terapia génica en pacientes con Anemia de Fanconi (AF), elegimos un modelo de ratón con esta patología.

La anemia de Fanconi es una enfermedad rara caracterizada por malformaciones congénitas, predisposición a la formación de tumores y por el desarrollo progresivo de fallo de médula ósea (121, 235). Está causada por la mutación en alguno de los 19 genes que participan en la ruta de reparación del ADN Fanconi/Brca2. El grupo de complementación A, caracterizado por mutaciones en el gen *FANCA* (44, 237), representa al 68% de los pacientes con AF en el mundo y al 80% de los pacientes con AF en España (33, 147).

El fallo de médula ósea y las complicaciones derivadas de este estado, es la mayor causa de muerte de estos pacientes, siendo el trasplante alogénico de CMHs el único tratamiento curativo disponible (8). Sin embargo, tiene un alto riesgo de morbilidad y mortalidad a causa de la toxicidad de la quimio/radioterapia aplicadas como acondicionamiento, las infecciones

oportunistas o el EICH (43, 76, 147). Para los pacientes con AF sometidos a trasplantes alogénicos que cuenten con donantes hermanos compatibles sanos, la supervivencia a 10 años es mayor al 80% (66). Sin embargo, esta opción no está disponible en la mayoría de los casos, por lo que es necesario realizar el trasplante con donantes alternativos, es decir, con donantes no relacionados o con donantes haploidénticos o HLA no-idénticos. En la AF, los resultados con donantes alternativos son peores que en otras patologías, debido a la mayor severidad de las complicaciones de este tipo de trasplantes, generando porcentajes de supervivencia media a largo plazo del orden del 30% (89, 147).

Existen distintos modelos de ratón para la AF. A pesar de que estos modelos no comparten todas las características del fenotipo humano, como los defectos hematológicos espontáneos, el desarrollo de tumores (42, 185, 256) o la hipersensibilidad a la radiación (34), sí comparten con los pacientes con AF algunos fenotipos, como son la hipersensibilidad a agentes intercalantes del ADN (42, 200, 265), siendo una buena herramienta para la investigación de la enfermedad, incluyendo el ensayo de nuevos tratamientos. Por todos estos aspectos, en este trabajo se generó un modelo de trasplante con alto riesgo de fallo de injerto, utilizando ratones deficientes en el gen *Fanca* (*Fanca*^{-/-}).

Antes de valorar el efecto de las MSCs sobre el injerto hematopoyético singénico en ratones *Fanca*^{-/-}, se caracterizaron distintos aspectos particulares de las células LSK *Fanca*^{-/-} que pudieran tener impacto en el estudio, como su capacidad de injerto en estos ratones. Así, se constató que los ratones *Fanca*^{-/-} presentaban un porcentaje de células LSK inferior a las observadas en los ratones WT con el mismo fondo genético (FVB) (Figura 26), lo que difería de las observaciones de otros trabajos en los que estas diferencias no alcanzaron significación (200).

A diferencia de lo observado con los ratones WT, el trasplante de células LSK *Fanca*^{-/-} en receptores *Fanca*^{-/-} evidenció un problema de injerto hematopoyético importante (Figura 34). Este fallo de injerto ya había sido descrito en ratones con mutaciones en *Fancc*^{-/-} y *Fandc1*^{-/-} (92, 175). Distintos estudios han mostrado que una capacidad de injerto defectuosa de las CMHs puede estar asociada con la pérdida de quiescencia y una excesiva proliferación (102, 238). Esta posibilidad fue confirmada con el análisis del ciclo celular de las células LSK-*Fanca*^{-/-}, en el que se observó una proporción significativamente menor de células en fase de quiescencia comparada con la de ratones WT FVB (Figura 28). Este hecho podría ser una consecuencia de la posible implicación de las proteínas FA en la activación de los puntos de control del ciclo celular (109).

Por otro lado, el trasplante de dosis bajas de células LSK-WT (1.500 ó 3.000), capaces de injertar en receptores WT, producía un fallo de injerto en el 30% de los receptores *Fanca*^{-/-}, siendo

necesario infundir una dosis superior de células (5.000 células LSK) para evitar el fallo de injerto (Figura 32). Estos resultados parecían indicar que los problemas de injerto observados con células LSK-*Fanca*^{-/-} no eran sólo consecuencia de la reducida capacidad de injerto de estas células, sino que además el microambiente medular de los receptores *Fanca*^{-/-} podría tener alguna deficiencia para alojar células hematopoyéticas, incluyendo las LSK-WT sanas. Se conoce poco acerca del nicho hematopoyético de los pacientes con AF, sin embargo, se ha observado que MSCs derivadas de ratones con mutaciones en el gen *Fancg*^{-/-} tienen una capacidad disminuida para mantener la hematopoyesis en cultivo, lo que podría apoyar la posibilidad de fallos en el microambiente medular (136).

A diferencia de lo observado en los trasplantes de células LSK-*Fanca*^{-/-} en receptores *Fanca*^{-/-}, en los que se observó una progresiva pérdida del injerto del donante (Figura 34), los receptores *Fanca*^{-/-} que injertaron tras la infusión de células LSK-WT tuvieron un injerto creciente (Figura 32). Estos resultados correlacionaban con los obtenidos en el estudio de las subpoblaciones de células LSK-WT o *Fanca*^{-/-}, que parecían indicar que los injertos de células LSK *Fanca*^{-/-} podrían tener una durabilidad menor que las de las células LSK-WT debido a la mayor proporción de CMH-ST en decremento de la proporción de CMH-LT (Figura 29).

Además, en los receptores *Fanca*^{-/-}, dosis bajas de células LSK-WT produjeron niveles de injerto elevados a largo plazo, llegando a observarse un quimerismo completo del donante en la SP del receptor. Estos resultados parecían indicar una ventaja proliferativa de las CMHs sanas sobre las CMHs *Fanca*^{-/-} endógenas (Figura 32). Resultados similares fueron descritos en receptores *Fancd1*^{-/-} tras el trasplante de CMHs WT (175). En este sentido, como era de esperar, tras el trasplante de células LSK-*Fanca*^{-/-} en receptores WT con acondicionamiento submieloablativo, no se observó ningún injerto del donante (Figura 33), indicando una desventaja de las CMHs *Fanca*^{-/-} frente a las CMHs WT endógenas.

En un trasplante de CMHs, una vez que éstas entran en el torrente sanguíneo inician un proceso de *homing*, proceso por el cual llegan a la MO, en donde anidan y proliferan, facilitando la reconstitución del receptor (96). Se ha observado que las CMHs humanas deficientes en el gen *FANCA* muestran defectos de adhesión y anidamiento celular, asociados a una desregulación de la actividad de la proteína Cdc42 (268). Sin embargo, son numerosas las proteínas de adhesión que están implicadas en el viaje de las células por el torrente sanguíneo hasta la MO. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la expresión de algunas de las moléculas de adhesión más importantes para el *homing* y anidamiento de las CMHs en el nicho hematopoyético, era similar entre las células LSK-*Fanca*^{-/-} y LSK-WT. Tampoco se observaron

diferencias significativas en la expresión de la quimioquina CXCR4 (Figura 30), de forma similar a lo descrito en otro estudio en el que se observó una expresión similar de CXCR4 en CMHs de ratones *Fanca*^{-/-}, *Fancc*^{-/-}, *Fancd2*^{-/-} y ratones WT (213).

Los experimentos de biodistribución de células LSK-*Fanca*^{-/-} confirmaron que las células eran capaces de llegar no sólo a la MO (Figura 35), sino a otro órgano hematopoyético importante en el ratón como es el bazo (42, 169). Esto explicaría la presencia de células del donante en la sangre periférica en los dos receptores *Fanca*^{-/-} en los que las LSK *Fanca*^{-/-} corregidas del donante no habrían injertado en la MO pero si en el bazo (Figura 40), en donde se generaría la progenie detectada en la sangre periférica.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos indican que tanto las CMHs de los ratones *Fanca*^{-/-} como su nicho hematopoyético en la MO poseen deficiencias que dificultan el injerto hematopoyético singénico.

En el 10-15% de los pacientes con AF se observa un mosaicismo somático, que actúa como una terapia génica natural, evidenciándose la ventaja proliferativa de las CMHs que han revertido en su mutación patogénica en uno de los alelos (88, 252). Este hecho, constituye la base principal para sugerir que el trasplante de un número limitado de CMHs corregidas genéticamente podría repoblar la hematopoyesis de forma progresiva y normalizar la hematopoyesis de los pacientes con AF (199). Sin embargo, existen dos limitaciones importantes para poder llevar a cabo una terapia génica en las células autólogas de MO de pacientes con AF: la hipersensibilidad de los pacientes a los agentes citotóxicos utilizados en el acondicionamiento de los receptores y el limitado número de progenitores que puede obtenerse de los pacientes, progenitores que además son hipersensibles a las condiciones de cultivo *ex vivo* necesario para su corrección (185).

Estudios previos han demostrado una ventaja selectiva de las CMHs de FA corregidas sobre las CMHs no corregidas (93, 199). Esto aumentaría la eficacia de una terapia génica sugiriendo que el injerto de un número limitado de células corregidas podría tener un efecto terapéutico significativo (171). En este trabajo, se realizaron trasplantes con progenitores de ratones *Fanca*^{-/-} corregidos mediante terapia génica, si bien no se pudo confirmar tal ventaja selectiva por parte de las CMHs *Fanca*^{-/-} corregidas genéticamente (Figura 42). Además, se detectó que la infusión de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas producía un 30% de fallo de injerto, llegando a alcanzar más del 50% cuando se infundían las dosis más bajas de células (Figura 39). Sin embargo, en aquellos receptores en los que se había detectado niveles basales de quimerismo, el análisis a 16 semanas después del trasplante mostró que las células del donante injertadas estaban

corregidas genéticamente, demostrado por la detección de copias provirales (Figura 41). Esto confirmaba, además, que la integración del transgen se mantenía estable a largo plazo.

Porcentajes de fallo de injerto similares se observaron en los experimentos en ratón realizados por Müller y colaboradores en los que la infusión 2.000 células LSK-*Fanca*^{-/-} transducidas durante 94 horas con un vector lentiviral, en receptores con radiación mieloablativa, mostraron fallo de injerto en el 45% de los receptores *Fanca*^{-/-} (170). Sin embargo, en otro grupo de ratones trasplantados con CMHs de ratones *Fanca*^{-/-} transducidas en periodos cortos de tiempo de 4h, se detectó injerto del donante en todos los receptores. Estas observaciones sugieren que son necesarios tiempos de cultivo *ex vivo* reducidos para preservar el injerto de las células *Fanca*^{-/-} genéticamente modificadas y que éste sea estable (170). En esta tesis, las condiciones óptimas en las que se obtuvieron mayores porcentajes de transducción consistieron en tiempos de transducción de 18 horas, las cuales preservaban las CMHs como se demuestra por la capacidad de reconstitución de estos progenitores, a pesar de que el cultivo estimulaba la entrada de las células LSK en la fase G₁ del ciclo celular (Figura 38).

En los trasplantes alogénicos realizados para el tratamiento de patologías hematológicas, el fallo de injerto es poco frecuente pero potencialmente fatal, pues genera pancitopenias severas y prolongadas e inmunodeficiencia. Este fallo se puede manifestar tanto por la ausencia de injerto inicial o por una pérdida progresiva tras un injerto inicial. Los factores de riesgo asociadas con el fallo de injerto incluyen donante no familiar, menor grado de compatibilidad HLA (46, 81), régimen de acondicionamiento de baja intensidad (15, 151) y la eliminación de células T de los injertos, pues estos dos últimos aspectos colaboran con la preparación el nicho hematopoyético para el injerto de las CMHs del donante (81, 82). Algunas patologías hematológicas no malignas como la anemia aplásica o hemoglobinopatías, en los que las reacciones inmunes pueden tener un papel en la generación de la enfermedad, la edad y el sexo del donante también influyen en los fallos del injerto en el trasplante (110, 165).

El fallo de injerto en pacientes con AF es un problema grave que afecta a un tercio de los pacientes con AF sometidos a un trasplante alogénico de CMHs con donantes no relacionados, en los que además la incidencia de EICH es del 50%-70% (76, 147, 149). Antes de la utilización del fármaco inmunosupresor Fludarabina, los fallos de injerto eran incluso más frecuentes en pacientes con mosaicismo de células T (145), sugiriendo que la presencia de células T resistentes a la quimioterapia aumentan el riesgo de rechazo (147). De estas complicaciones resulta claro que la utilización de células autólogas en los trasplantes de pacientes con AF podría tener un beneficio evidente con respecto a los trasplantes alogénicos.

En los ensayos de terapia génica una gran limitación es la obtención de cantidades suficientes de CMHs para su modificación genética. Hasta el momento, se han realizado dos ensayos clínicos de terapia génica en pacientes con AF. En estos ensayos, pacientes con mutaciones en los genes *FANCC* o *FANCA* fueron trasplantados con células CD34⁺ pre-estimuladas y transducidas con vectores γ -retrovirales durante 5-7 días, tras los cuales fueron infundidas a los pacientes. En estos trasplantes, la disponibilidad de células sólo permitió la infusión de un número de células CD34⁺ alrededor de 50 veces menor al infundido habitualmente en los trasplantes convencionales. Los progenitores hematopoyéticos infundidos no injertaron de forma estable en los receptores, detectándose inicialmente un número muy bajo de células corregidas en la sangre periférica de los pacientes (108, 138, 139).

En los trasplantes realizados en esta tesis, en un contexto singénico, uno de los factores de riesgo estaría generado por el uso de un acondicionamiento no mieloablativo, en el que sobreviven un número significativo de CMHs endógenas que limitaría el injerto de las células del donante. En un estudio realizado por Olson y colaboradores en pacientes sometidos a trasplantes alogénicos, aquellos que recibieron acondicionamientos de intensidad reducida o no mieloablativos, tuvieron una incidencia de fallo de injerto del 8% y el 19%, respectivamente. Por el contrario, sólo el 3% de los casos con acondicionamientos ablativos presentaron fallo de injerto (179).

Los resultados obtenidos hasta el momento no revelan claramente si en los pacientes con AF es necesario un acondicionamiento mieloablativo/inmunosupresor para obtener un injerto estable de CMHs corregidas genéticamente (237). Sin embargo, la experiencia previa con trasplantes de CMHs alogénicos en estos pacientes ha mostrado la alta toxicidad de los regímenes de acondicionamientos utilizados sin complicaciones en pacientes con otro tipo de anemia aplásica (66, 77). Establecer la aproximación óptima para conseguir un injerto estable y a largo plazo, sin excesiva toxicidad, ha sido un reto para pacientes con AF ya que por su defecto en la corrección del ADN presentan una mayor toxicidad a las dosis convencionales de quimioterapia y/o radioterapia (7, 78). Distintos estudios han mostrado que la ablación de la hematopoyesis, con la toxicidad que conlleva, no es necesaria en los modelos de ratón para *Fancc*^{-/-} y *Fancd1*^{-/-} (92, 199). Así, en los resultados aquí obtenidos, la infusión de 1.500 células WT en ratones *Fanca*^{-/-} con acondicionamiento submieloablativo resultó en un 30% de fallo de injerto, mientras que en el trabajo de Müller y colaboradores (170), la infusión de 2.000 células LSK WT en receptores *Fanca*^{-/-} acondicionados de forma mieloablativa no produjo ningún fallo de injerto.

Es de destacar que el co-trasplante de Ad-MSCs junto con un número reducido de células LSK-WT o de células LSK-*Fanca*^{-/-} corregidas genéticamente evitó el fallo de injerto asociado al trasplante del mismo número de células LSK sin las Ad-MSCs en receptores *Fanca*^{-/-} (Figura 36 y Figura 44). En este trabajo se ha demostrado que el mecanismo por el que las Ad-MSCs podrían estar evitando el fallo de injerto en receptores es el de células transportadoras de las CMHs hasta el nicho medular. Sin embargo, en los receptores *Fanca*^{-/-}, en los que el microambiente medular podría estar alterado, el efecto de las MSCs podría estar mediado además por su contribución a la función del nicho medular. Además, la sobreexpresión de las citoquinas inflamatorias TNF- α e IFN- γ que se ha observado en la MO de los pacientes con AF (56) podría estar desencadenando una acción inmunosupresora por parte de las Ad-MSCs (117, 197).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las MSCs son un componente del nicho hematopoyético, necesario para el mantenimiento y diferenciación de las CMHs (38, 189). Tras la infusión de las MSCs, su identificación en la MO es complicada, no pudiendo ser detectadas en la mayoría de los casos. Estudios realizados sobre la MO de pacientes sometidos a trasplantes alogénicos han descrito que el estroma de los pacientes continúa siendo del receptor, incluso después de acondicionamientos mieloablativos (212). Sin embargo, en algunos estudios experimentales y clínicos se ha detectado de forma aislada la presencia de las MSCs del donante en la MO de los receptores (31, 32, 125). En este trabajo no hemos podido analizar si las Ad-MSCs infundidas se integraban en el nicho de los receptores *Fanca*^{-/-} corregidas, aunque su estudio en un futuro sería muy interesante.

Por otro lado, a pesar de que el trasplante de células LSK singénicas no debería producir una respuesta inmune del receptor a las células del donante, la infusión de células LSK-*Fanca*^{-/-} transducidas con el vector PGK-FANCA-wPRE* podría producir una respuesta inmune contra la proteína FANCA exógena, la cual no está presente endógenamente en el receptor. Si este fuese el caso, las propiedades inmunosupresoras de las MSCs podrían reducir esta respuesta y favorecer el injerto de las células corregidas que expresan la proteína.

Los resultados obtenidos en el modelo de ratón *Fanca*^{-/-} permiten demostrar la eficacia de las Ad-MSCs para prevenir y evitar el fallo de injerto de CMHs autólogas corregidas genéticamente. La Anemia de Fanconi podría ser un ejemplo representativo de la aplicabilidad de las MSCs en protocolos de terapia génica, como los utilizados para el tratamiento de otras enfermedades monogénicas con riesgo de fallo de injerto, como la granulomatosis crónica (181) o la β -talasemia (36), con objeto de asegurar el injerto de las CMHs corregidas genéticamente.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto una nueva propiedad de las MSCs para reducir el fallo de injerto de CMHs en trasplantes autólogos; en particular, en protocolos de terapia génica hematopoyética. Además, la observación de que el efecto de las Ad-MSCs sobre el injerto de CMHs es más significativo cuando se utilizan acondicionamientos de baja intensidad permitiría reducir la utilización de acondicionamientos altamente tóxicos sin que aumenten los riesgos de fallo de injerto.



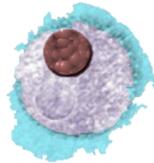
Conclusiones

- **1.-** Las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs) mejoran significativamente tanto a corto como a largo plazo el injerto hematopoyético de un número reducido de células de médula ósea con fenotipo linaje⁻, Sca-1⁺ c-Kit⁺ (LSK) trasplantadas en ratones congénicos acondicionados con una dosis submieloablative de 5 Gy.
- **2.-** Las Ad-MSCs co-infundidas aumentan el *homing* de las células LSK del donante en la médula ósea de los receptores congénicos.
- **3.-** La co-infusión simultánea de células LSK y Ad-MSCs es imprescindible para la mejora del injerto hematopoyético mediado por las Ad-MSCs.
- **4.-** La MO de ratones deficientes en el gen *Fanca* contiene menos progenitores hematopoyéticos con fenotipo LSK y poseen una menor capacidad de injerto y reconstitución comparada con las células LSK de ratones sanos.
- **5.-** La médula ósea de ratones deficientes en el gen *Fanca* muestra un defecto para ser reconstituida por células madre hematopoyéticas en comparación con la MO de ratones sanos.
- **6.-** Receptores *Fanca*^{-/-} acondicionados con dosis submieloablative de radiación (5 Gy) presentan un 30% de fallo de injerto al ser trasplantados con un número reducido de células madre hematopoyéticas (1.500 células LSK de donante sano). Sin embargo, la co-infusión de estas células junto con Ad-MSCs, rescata la capacidad de injerto y reconstitución del inóculo.
- **7.-** Las células LSK *Fanca*^{-/-} corregidas con el vector lentiviral PGK-FANCA-wPRE* poseen una menor capacidad de injerto y reconstitución respecto a inóculos equivalentes de ratones sanos. Como consecuencia de ello, se observa entre un 80% y un 30% de fallo de injerto en receptores *Fanca*^{-/-} acondicionados con 5 Gy y trasplantados con dosis de 1.500 a 20.000 células LSK corregidas genéticamente.

- **8.-** La co-infusión de Ad-MSCs evita el fallo de injerto de 10.000 células LSK *Fancc^{-/-}* corregidas genéticamente y trasplantadas en receptores *Fancc^{-/-}* acondicionados con una dosis submieloablative de 5 Gy.

COROLARIO:

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral abren una nueva perspectiva de aplicación clínica de las MSCs para reducir el riesgo de fallo de injerto en pacientes sometidos a acondicionamientos de baja intensidad y trasplantados con un número reducido de células madre hematopoyéticas autólogas, tal como ocurre en determinados protocolos de terapia génica.



Bibliografía

1. **Aiuti, A., I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer, and J. C. Gutierrez-Ramos.** 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* **185**:111-120.
2. **Akkina, R. K., R. M. Walton, M. L. Chen, Q. X. Li, V. Planelles, and I. S. Chen.** 1996. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* **70**:2581-2585.
3. **Alter, B. P.** 2005. Bone marrow failure: a child is not just a small adult (but an adult can have a childhood disease). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:96-103.
4. **Alter, B. P., M. H. Greene, I. Velazquez, and P. S. Rosenberg.** 2003. Cancer in Fanconi anemia. *Blood* **101**:2072.
5. **Anasetti, C., and J. A. Hansen.** 1992. Marrow transplantation in cancer therapy. *The Tohoku journal of experimental medicine* **168**:333-343.
6. **Angelopoulou, M., E. Novelli, J. E. Grove, H. M. Rinder, C. Civin, L. Cheng, and D. S. Krause.** 2003. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* **31**:413-420.
7. **Auerbach, A. D., B. Adler, R. J. O'Reilly, D. Kirkpatrick, and R. S. Chaganti.** 1983. Effect of procarbazine and cyclophosphamide on chromosome breakage in Fanconi anemia cells: relevance to bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet* **9**:25-36.
8. **Auerbach, A. D., Buchwald, M. and Jonje, H.** 1998. Fanconi Anemia, p. 317-332. *In* B. a. K. Vogelstein, K.W (ed.), *The Genetic Basis of Human Cancer*. McGraw-Hill, New York, N.Y.
9. **Auerbach, A. D., A. Rogatko, and T. M. Schroeder-Kurth.** 1989. International Fanconi Anemia Registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. *Blood* **73**:391-396.
10. **Avecilla, S. T., K. Hattori, B. Heissig, R. Tejada, F. Liao, K. Shido, D. K. Jin, S. Dias, F. Zhang, T. E. Hartman, N. R. Hackett, R. G. Crystal, L. Witte, D. J. Hicklin, P. Bohlen, D. Eaton, D. Lyden, F. de Sauvage, and S. Rafii.** 2004. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* **10**:64-71.
11. **Avigdor, A., P. Goichberg, S. Shivtiel, A. Dar, A. Peled, S. Samira, O. Kollet, R. Hershkovich, R. Alon, I. Hardan, H. Ben-Hur, D. Naor, A. Nagler, and T. Lapidot.** 2004. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* **103**:2981-2989.
12. **Bacigalupo, A., K. Ballen, D. Rizzo, S. Giralt, H. Lazarus, V. Ho, J. Apperley, S. Slavin, M. Pasquini, B. M. Sandmaier, J. Barrett, D. Blaise, R. Lowski, and M. Horowitz.** 2009. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* **15**:1628-1633.
13. **Ball, L. M., M. E. Bernardo, H. Roelofs, A. Lankester, A. Cometa, R. M. Egeler, F. Locatelli, and W. E. Fibbe.** 2007. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* **110**:2764-2767.
14. **Ball, L. M., M. E. Bernardo, H. Roelofs, M. J. van Tol, B. Contoli, J. J. Zwaginga, M. A. Avanzini, A. Conforti, A. Bertaina, G. Giorgiani, C. M. Jol-van der Zijde, M. Zecca, K. Le Blanc, F. Frassoni, R. M. Egeler, W. E. Fibbe, A. C. Lankester, and F. Locatelli.** 2013. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **163**:501-509.
15. **Baron, F., M. B. Maris, B. E. Storer, B. M. Sandmaier, M. J. Stuart, P. A. McSweeney, J. P. Radich, M. A. Pulsipher, E. D. Agura, T. R. Chauncey, D. G. Maloney, J. A. Shizuru, and R. Storb.** 2005. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with chronic myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**:272-279.

16. **Barquinero, J.** 2009. Células madre hematopoyéticas, p. 59-81. Monografía XXVII: Células Madre y Terapia regenerativa. Real Academia Nacional de Farmacia.
17. **Becker, P. S., S. K. Nilsson, Z. Li, V. M. Berrios, M. S. Dooner, C. L. Cooper, C. C. Hsieh, and P. J. Quesenberry.** 1999. Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status. *Exp Hematol* **27**:533-541.
18. **Berenson, R. J., R. G. Andrews, W. I. Bensinger, D. Kalamasz, G. Knitter, C. D. Buckner, and I. D. Bernstein.** 1988. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest* **81**:951-955.
19. **Bernardo, M. E., L. M. Ball, A. M. Cometa, H. Roelofs, M. Zecca, M. A. Avanzini, A. Bertaina, L. Vinti, A. Lankester, R. Maccario, O. Ringden, K. Le Blanc, R. M. Egeler, W. E. Fibbe, and F. Locatelli.** 2010. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* **46**:200-207.
20. **Bernardo, M. E., N. Zaffaroni, F. Novara, A. M. Cometa, M. A. Avanzini, A. Moretta, D. Montagna, R. Maccario, R. Villa, M. G. Daidone, O. Zuffardi, and F. Locatelli.** 2007. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* **67**:9142-9149.
21. **Boggs, D. R.** 1984. The total marrow mass of the mouse: a simplified method of measurement. *American journal of hematology* **16**:277-286.
22. **Bogliolo, M., B. Schuster, C. Stoepker, B. Derkunt, Y. Su, A. Raams, J. P. Trujillo, J. Minguillon, M. J. Ramirez, R. Pujol, J. A. Casado, R. Banos, P. Rio, K. Knies, S. Zuniga, J. Benitez, J. A. Bueren, N. G. Jaspers, O. D. Scharer, J. P. de Winter, D. Schindler, and J. Surralles.** 2013. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *American journal of human genetics* **92**:800-806.
23. **Bonifer, C.** 2005. Epigenetic plasticity of hematopoietic cells. *Cell Cycle* **4**:211-214.
24. **Bradley, T. R., and D. Metcalf.** 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* **44**:287-299.
25. **Brenner, M. K.** 1996. Gene transfer to hematopoietic cells. *N Engl J Med* **335**:337-339.
26. **Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg, and D. T. Scadden.** 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**:841-846.
27. **Calvi, L. M., and D. C. Link.** 2013. Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Calcif Tissue Int* **94**:112-124.
28. **Callen, E., J. A. Casado, M. D. Tischkowitz, J. A. Bueren, A. Creus, R. Marcos, A. Dasi, J. M. Estella, A. Munoz, J. J. Ortega, J. de Winter, H. Joenje, D. Schindler, H. Hanenberg, S. V. Hodgson, C. G. Mathew, and J. Surralles.** 2005. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood* **105**:1946-1949.
29. **Callen, E., E. Samper, M. J. Ramirez, A. Creus, R. Marcos, J. J. Ortega, T. Olive, I. Badell, M. A. Blasco, and J. Surralles.** 2002. Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet* **11**:439-444.
30. **Cancelas, J. A., A. W. Lee, R. Prabhakar, K. F. Stringer, Y. Zheng, and D. A. Williams.** 2005. Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat Med* **11**:886-891.
31. **Carrancio, S., B. Blanco, C. Romo, S. Muntion, N. Lopez-Holgado, J. F. Blanco, J. G. Brinon, J. F. San Miguel, F. M. Sanchez-Guijo, and M. C. del Canizo.** 2011. Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: an in vitro and in vivo model. Part 2: Effect on bone marrow microenvironment. *PLoS One* **6**:e26241.
32. **Carrancio, S., C. Romo, T. Ramos, N. Lopez-Holgado, S. Muntion, H. J. Prins, A. C. Martens, J. G. Brinon, J. F. San Miguel, M. C. Del Canizo, and F. Sanchez-Guijo.** 2012. Effects of

MSC coadministration and route of delivery on cord blood hematopoietic stem cell engraftment. *Cell Transplant* **22**:1171-1183.

33. **Casado, J. A., E. Callen, A. Jacome, P. Rio, M. Castella, S. Lobitz, T. Ferro, A. Munoz, J. Sevilla, A. Cantalejo, E. Cela, J. Cervera, J. Sanchez-Calero, I. Badell, J. Estella, A. Dasi, T. Olive, J. J. Ortega, A. Rodriguez-Villa, M. Tapia, A. Molines, L. Madero, J. C. Segovia, K. Nevelling, R. Kalb, D. Schindler, H. Hanenberg, J. Surralles, and J. A. Bueren.** 2007. A comprehensive strategy for the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia research network. *J Med Genet* **44**:241-249.

34. **Casado, J. A., M. I. Nunez, J. C. Segovia, J. M. Ruiz de Almodovar, and J. A. Bueren.** 2005. Non-homologous end-joining defect in fanconi anemia hematopoietic cells exposed to ionizing radiation. *Radiat Res* **164**:635-641.

35. **Castella, M., R. Pujol, E. Callen, M. J. Ramirez, J. A. Casado, M. Talavera, T. Ferro, A. Munoz, J. Sevilla, L. Madero, E. Cela, C. Belendez, C. Diaz de Heredia, T. Olive, J. Sanchez de Toledo, I. Badell, J. Estella, A. Dasi, A. Rodriguez-Villa, P. Gomez, M. Tapia, A. Molines, A. Figuera, J. A. Bueren, and J. Surralles.** 2011. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet*.

36. **Cavazzana-Calvo, M., E. Payen, O. Negre, G. Wang, K. Hehir, F. Fusil, J. Down, M. Denaro, T. Brady, K. Westerman, R. Cavallesco, B. Gillet-Legrand, L. Caccavelli, R. Sgarra, L. Maouche-Chretien, F. Bernaudin, R. Girot, R. Dorazio, G. J. Mulder, A. Polack, A. Bank, J. Soulier, J. Larghero, N. Kabbara, B. Dalle, B. Gourmel, G. Socie, S. Chretien, N. Cartier, P. Aubourg, A. Fischer, K. Cornetta, F. Galacteros, Y. Beuzard, E. Gluckman, F. Bushman, S. Hacein-Bey-Abina, and P. Leboulch.** 2010. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* **467**:318-322.

37. **Cioc, A. M., J. E. Wagner, M. L. MacMillan, T. DeFor, and B. Hirsch.** 2010. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. *American journal of clinical pathology* **133**:92-100.

38. **Conget, P. A., and J. J. Minguell.** 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* **181**:67-73.

39. **Connick, P., M. Kolappan, C. Crawley, D. J. Webber, R. Patani, A. W. Michell, M. Q. Du, S. L. Luan, D. R. Altmann, A. J. Thompson, A. Compston, M. A. Scott, D. H. Miller, and S. Chandran.** 2012. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol* **11**:150-156.

40. **Curry, J. L., J. J. Trentin, and N. Wolf.** 1967. Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. *J Exp Med* **125**:703-720.

41. **Chamberlin, W., J. Barone, A. Kedo, and W. Fried.** 1974. Lack of recovery of murine hematopoietic stromal cells after irradiation-induced damage. *Blood* **44**:385-392.

42. **Cheng, N. C., H. J. van de Vrugt, M. A. van der Valk, A. B. Oostra, P. Krimpenfort, Y. de Vries, H. Joenje, A. Berns, and F. Arwert.** 2000. Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog *Fanca*. *Hum Mol Genet* **9**:1805-1811.

43. **Chewning, J. H., H. Castro-Malaspina, A. Jakubowski, N. A. Kernan, E. B. Papadopoulos, T. N. Small, G. Heller, K. C. Hsu, M. A. Perales, M. R. van den Brink, J. W. Young, S. E. Prockop, N. H. Collins, R. J. O'Reilly, and F. Boulad.** 2007. Fludarabine-based conditioning secures engraftment of second hematopoietic stem cell allografts (HSCT) in the treatment of initial graft failure. *Biol Blood Marrow Transplant* **13**:1313-1323.

44. **D'Andrea, A. D.** 2010. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N Engl J Med* **362**:1909-1919.

45. **D'Andrea, A. D., and M. Grompe.** 1997. Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood* **90**:1725-1736.

46. **Davies, S. M., C. Kollman, C. Anasetti, J. H. Antin, J. Gajewski, J. T. Casper, A. Nademane, H. Noreen, R. King, D. Confer, and N. A. Kernan.** 2000. Engraftment and survival

after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program. *Blood* **96**:4096-4102.

47. **de Winter, J. P., F. Leveille, C. G. van Berkel, M. A. Rooimans, L. van Der Weel, J. Steltenpool, I. Demuth, N. V. Morgan, N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, J. Lightfoot, P. A. Leegwater, Q. Waisfisz, K. Komatsu, F. Arwert, J. C. Pronk, C. G. Mathew, M. Digweed, M. Buchwald, and H. Joenje.** 2000. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *American journal of human genetics* **67**:1306-1308.
48. **de Winter, J. P., M. A. Rooimans, L. van Der Weel, C. G. van Berkel, N. Alon, L. Bosnoyan-Collins, J. de Groot, Y. Zhi, Q. Waisfisz, J. C. Pronk, F. Arwert, C. G. Mathew, R. J. Scheper, M. E. Hoatlin, M. Buchwald, and H. Joenje.** 2000. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nature genetics* **24**:15-16.
49. **de Winter, J. P., Q. Waisfisz, M. A. Rooimans, C. G. van Berkel, L. Bosnoyan-Collins, N. Alon, M. Carreau, O. Bender, I. Demuth, D. Schindler, J. C. Pronk, F. Arwert, H. Hoehn, M. Digweed, M. Buchwald, and H. Joenje.** 1998. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nature genetics* **20**:281-283.
50. **Deans, A. J., and S. C. West.** 2011. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**:467-480.
51. **Deans, R. J., and A. B. Moseley.** 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28**:875-884.
52. **Ding, L., T. L. Saunders, G. Enikolopov, and S. J. Morrison.** 2012. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**:457-462.
53. **Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz.** 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**:315-317.
54. **Dorsman, J. C., M. Levitus, D. Rockx, M. A. Rooimans, A. B. Oostra, A. Haitjema, S. T. Bakker, J. Steltenpool, D. Schuler, S. Mohan, D. Schindler, F. Arwert, G. Pals, C. G. Mathew, Q. Waisfisz, J. P. de Winter, and H. Joenje.** 2007. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* **29**:211-218.
55. **Doulatov, S., F. Notta, E. Laurenti, and J. E. Dick.** 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell* **10**:120-136.
56. **Dufour, C., A. Corcione, J. Svahn, R. Haupt, V. Poggi, A. N. Beka'ssy, R. Scime, A. Pistorio, and V. Pistoia.** 2003. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood* **102**:2053-2059.
57. **Dufour, C., and J. Svahn.** 2008. Fanconi anaemia: new strategies. *Bone Marrow Transplant* **41 Suppl 2**:S90-95.
58. **Eapen, M., M. M. Horowitz, J. P. Klein, R. E. Champlin, F. R. Loberiza, Jr., O. Ringden, and J. E. Wagner.** 2004. Higher mortality after allogeneic peripheral-blood transplantation compared with bone marrow in children and adolescents: the Histocompatibility and Alternate Stem Cell Source Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* **22**:4872-4880.
59. **Eliopoulos, N., J. Stagg, L. Lejeune, S. Pommey, and J. Galipeau.** 2005. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* **106**:4057-4065.
60. **Ellis, S. L., J. Grassinger, A. Jones, J. Borg, T. Camenisch, D. Haylock, I. Bertoncello, and S. K. Nilsson.** 2011. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* **118**:1516-1524.
61. **EU/3/10/822, P. Testori Coggi, and C. E.** 2010. Declaración del medicamento "Vector lentiviral conteniendo el gen de la anemia de Fanconi A (FANCA)" como medicamento huérfano con arreglo al reglamento (CE) nº 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo. In Paola EMA, ed. (European Comision).

62. **Fagundo, J. C., E. Dorticos, V. Pavon, and L. Cortina.** 2004. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones. *Revista Cubana Hematología* **20**.
63. **Fanconi, G.** 1927. Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniciziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und Erziehung (Wien)* **117**:257-280.
64. **Fang, B., N. Li, Y. Song, J. Li, R. C. Zhao, and Y. Ma.** 2009. Cotransplantation of haploidentical mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells and to reduce the risk of graft failure in two children with severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant* **13**:499-502.
65. **Fang, B., Y. Song, N. Li, J. Li, Q. Han, and R. C. Zhao.** 2009. Mesenchymal stem cells for the treatment of refractory pure red cell aplasia after major ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* **88**:261-266.
66. **Farzin, A., S. M. Davies, F. O. Smith, A. Filipovich, M. Hansen, A. D. Auerbach, and R. E. Harris.** 2007. Matched sibling donor haematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anaemia: an update of the Cincinnati Children's experience. *Br J Haematol* **136**:633-640.
67. **Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio.** 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**:1528-1530.
68. **Fleming, W. H., E. J. Alpern, N. Uchida, K. Ikuta, G. J. Spangrude, and I. L. Weissman.** 1993. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* **122**:897-902.
69. **Fouillard, L., A. Chapel, D. Bories, S. Bouchet, J. M. Costa, H. Rouard, P. Herve, P. Gourmelon, D. Thierry, M. Lopez, and N. C. Gorin.** 2007. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* **21**:568-570.
70. **Friedenstein, A. J., N. W. Latzinik, A. G. Grosheva, and U. F. Gorskaya.** 1982. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* **10**:217-227.
71. **Galotto, M., G. Berisso, L. Delfino, M. Podesta, L. Ottaggio, S. Dallorso, C. Dufour, G. B. Ferrara, A. Abbondandolo, G. Dini, A. Bacigalupo, R. Cancedda, and R. Quarto.** 1999. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol* **27**:1460-1466.
72. **Garaycochea, J. I., and K. J. Patel.** 2014. Why does the bone marrow fail in Fanconi anemia? *Blood* **123**:26-34.
73. **Garcia-Gomez, I., G. Elvira, A. G. Zapata, M. L. Lamana, M. Ramirez, J. G. Castro, M. G. Arranz, A. Vicente, J. Bueren, and D. Garcia-Olmo.** 2010. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert opinion on biological therapy* **10**:1453-1468.
74. **Garcia-Higuera, I., T. Taniguchi, S. Ganesan, M. S. Meyn, C. Timmers, J. Hejna, M. Grompe, and A. D. D'Andrea.** 2001. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular cell* **7**:249-262.
75. **Garcia-Olmo, D., M. Garcia-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro, and J. A. Rodriguez-Montes.** 2005. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* **48**:1416-1423.
76. **Gluckman, E.** 1996. Allogeneic bone marrow transplantation in Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant* **18**:S33-35.
77. **Gluckman, E., A. D. Auerbach, M. M. Horowitz, K. A. Sobocinski, R. C. Ash, M. M. Bortin, A. Butturini, B. M. Camitta, R. E. Champlin, W. Friedrich, R. A. Good, E. C. Gordon-Smith, R. E. Harris, J. P. Klein, J. J. Ortega, R. Pasquini, N. K. Ramsay, B. Speck, M. R. Vowels, M. J. Zhang, and R. P. Gale.** 1995. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood* **86**:2856-2862.
78. **Gluckman, E., R. Berger, and J. Dutreix.** 1984. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Semin Hematol* **21**:20-26.

79. **Gonzalez-Murillo, A., M. L. Lozano, L. Alvarez, A. Jacome, E. Almarza, S. Navarro, J. C. Segovia, H. Hanenberg, G. Guenechea, J. A. Bueren, and P. Rio.** 2010. Development of lentiviral vectors with optimized transcriptional activity for the gene therapy of patients with Fanconi anemia. *Hum Gene Ther* **21**:623-630.
80. **Gonzalo-Daganzo, R., C. Regidor, T. Martin-Donaire, M. A. Rico, G. Bautista, I. Krsnik, R. Fores, E. Ojeda, I. Sanjuan, J. A. Garcia-Marco, B. Navarro, S. Gil, R. Sanchez, N. Panadero, Y. Gutierrez, M. Garcia-Berciano, N. Perez, I. Millan, R. Cabrera, and M. N. Fernandez.** 2009. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy* **11**:278-288.
81. **Grandage, V. L., J. M. Cornish, D. H. Pamphilon, M. N. Potter, C. G. Steward, A. Oakhill, and D. I. Marks.** 1998. Second allogeneic bone marrow transplants from unrelated donors for graft failure following initial unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **21**:687-690.
82. **Green, A., E. Clarke, L. Hunt, A. Canterbury, A. Lankester, G. Hale, H. Waldmann, S. Goodman, J. M. Cornish, D. I. Marks, C. G. Steward, A. Oakhill, and D. H. Pamphilon.** 1999. Children with acute lymphoblastic leukemia who receive T-cell-depleted HLA mismatched marrow allografts from unrelated donors have an increased incidence of primary graft failure but a similar overall transplant outcome. *Blood* **94**:2236-2246.
83. **Greenbaum, A., Y. M. Hsu, R. B. Day, L. G. Schuettepelz, M. J. Christopher, J. N. Borgerding, T. Nagasawa, and D. C. Link.** 2013. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**:227-230.
84. **Gregory, C. J., and A. C. Eaves.** 1978. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* **51**:527-537.
85. **Grewal, S. S., J. P. Kahn, M. L. MacMillan, N. K. Ramsay, and J. E. Wagner.** 2004. Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. *Blood* **103**:1147-1151.
86. **Grimes, B. R., C. M. Steiner, S. Merfeld-Clauss, D. O. Traktuev, D. Smith, A. Reese, A. M. Breman, V. C. Thurston, G. H. Vance, B. H. Johnstone, R. B. Slee, and K. L. March.** 2009. Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture. *Stem cells and development* **18**:717-724.
87. **Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahimi, P. G. Robey, and S. Shi.** 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13625-13630.
88. **Gross, M., H. Hanenberg, S. Lobitz, R. Friedl, S. Herterich, R. Dietrich, B. Gruhn, D. Schindler, and H. Hoehn.** 2002. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* **98**:126-135.
89. **Guardiola, P., R. Pasquini, I. Dokal, J. J. Ortega, M. van Weel-Sipman, J. C. Marsh, S. E. Ball, F. Locatelli, C. Vermylen, R. Skinner, P. Ljungman, R. Miniero, P. J. Shaw, G. Souillet, M. Michallet, A. N. Bekassy, G. Krivan, P. Di Bartolomeo, C. Heilmann, L. Zanesco, J. Y. Cahn, W. Arcese, A. Bacigalupo, and E. Gluckman.** 2000. Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* **95**:422-429.
90. **Guezguez, B., and M. Bhatia.** 2008. Transplantation of human hematopoietic repopulating cells: mechanisms of regeneration and differentiation using human-mouse xenografts. *Curr Opin Organ Transplant* **13**:44-52.
91. **Gush, K. A., K. L. Fu, M. Grompe, and C. E. Walsh.** 2000. Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice. *Blood* **95**:700-704.
92. **Haneline, L. S., T. A. Gobbett, R. Ramani, M. Carreau, M. Buchwald, M. C. Yoder, and D. W. Clapp.** 1999. Loss of FancC function results in decreased hematopoietic stem cell repopulating ability. *Blood* **94**:1-8.
93. **Haneline, L. S., X. Li, S. L. Ciccone, P. Hong, Y. Yang, H. E. Broxmeyer, S. H. Lee, A. Orazi, E. F. Srour, and D. W. Clapp.** 2003. Retroviral-mediated expression of recombinant FancC

enhances the repopulating ability of Fancc^{-/-} hematopoietic stem cells and decreases the risk of clonal evolution. *Blood* **101**:1299-1307.

94. **Hare, J. M., J. H. Traverse, T. D. Henry, N. Dib, R. K. Strumpf, S. P. Schulman, G. Gerstenblith, A. N. DeMaria, A. E. Denktas, R. S. Gammon, J. B. Hermiller, Jr., M. A. Reisman, G. L. Schaer, and W. Sherman.** 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **54**:2277-2286.

95. **Harrison, D. E.** 1980. Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* **55**:77-81.

96. **Heazlewood, S. Y., A. Oteiza, H. Cao, and S. K. Nilsson.** 2014. Analyzing hematopoietic stem cell homing, lodgment, and engraftment to better understand the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci* **1310**:119-128.

97. **Hirose, J., T. Kouro, H. Igarashi, T. Yokota, N. Sakaguchi, and P. W. Kincade.** 2002. A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow. *Immunol Rev* **189**:28-40.

98. **Hong, S. H., E. J. Gang, J. A. Jeong, C. Ahn, S. H. Hwang, I. H. Yang, H. K. Park, H. Han, and H. Kim.** 2005. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:1153-1161.

99. **Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul, and T. Hofmann.** 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:8932-8937.

100. **Ibanez, A., P. Rio, J. A. Casado, J. A. Bueren, J. L. Fernandez-Luna, and C. Pipaon.** 2009. Elevated levels of IL-1beta in Fanconi anaemia group A patients due to a constitutively active phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway are capable of promoting tumour cell proliferation. *Biochem J* **422**:161-170.

101. **in 't Anker, P. S., W. A. Noort, S. A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, A. B. Kruisselbrink, R. L. van Bezooijen, W. Beekhuizen, R. Willemze, H. H. Kanhai, and W. E. Fibbe.** 2003. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* **88**:845-852.

102. **Ito, K., A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiya, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T. W. Mak, and T. Suda.** 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**:997-1002.

103. **Joenje, H., F. Arwert, A. W. Eriksson, H. de Koning, and A. B. Oostra.** 1981. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature* **290**:142-143.

104. **Kamminga, L. M., R. van Os, A. Ausema, E. J. Noach, E. Weersing, B. Dontje, E. Vellenga, and G. de Haan.** 2005. Impaired hematopoietic stem cell functioning after serial transplantation and during normal aging. *Stem Cells* **23**:82-92.

105. **Karussis, D., C. Karageorgiou, A. Vaknin-Dembinsky, B. Gowda-Kurkalli, J. M. Gomori, I. Kassis, J. W. Bulte, P. Petrou, T. Ben-Hur, O. Abramsky, and S. Slavin.** 2010. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **67**:1187-1194.

106. **Kay, M. A.** 2011. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet* **12**:316-328.

107. **Kee, Y., and A. D. D'Andrea.** 2010. Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes Dev* **24**:1680-1694.

108. **Kelly, P. F., S. Radtke, C. Kalle, B. Balcik, K. Bohn, R. Mueller, T. Schuesler, M. Haren, L. Reeves, J. A. Cancelas, T. Leemhuis, R. Harris, A. D. Auerbach, F. O. Smith, S. M. Davies, and D. A. Williams.** 2007. Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther* **15**:211-219.

109. **Kennedy, R. D., and A. D. D'Andrea.** 2005. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev* **19**:2925-2940.
110. **Kernan, N. A., C. Bordignon, G. Heller, I. Cunningham, H. Castro-Malaspina, B. Shank, N. Flomenberg, J. Burns, S. Y. Yang, P. Black, and et al.** 1989. Graft failure after T-cell-depleted human leukocyte antigen identical marrow transplants for leukemia: I. Analysis of risk factors and results of secondary transplants. *Blood* **74**:2227-2236.
111. **Kfoury, Y., and D. T. Scadden.** 2015. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell* **16**:239-253.
112. **Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, C. Terhorst, and S. J. Morrison.** 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**:1109-1121.
113. **Kim, D. H., K. H. Yoo, Y. S. Yim, J. Choi, S. H. Lee, H. L. Jung, K. W. Sung, S. E. Yang, W. I. Oh, Y. S. Yang, S. H. Kim, S. Y. Choi, and H. H. Koo.** 2006. Cotransplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) enhanced engraftment of hematopoietic stem cells in a MSC-dose dependent manner in NOD/SCID mice. *J Korean Med Sci* **21**:1000-1004.
114. **Kim, J., J. W. Kang, J. H. Park, Y. Choi, K. S. Choi, K. D. Park, D. H. Baek, S. K. Seong, H. K. Min, and H. S. Kim.** 2009. Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch Pharm Res* **32**:117-126.
115. **Knipscheer, P., M. Raschle, A. Smogorzewska, M. Enoiu, T. V. Ho, O. D. Scharer, S. J. Elledge, and J. C. Walter.** 2009. The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science* **326**:1698-1701.
116. **Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan, and H. M. Lazarus.** 2000. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* **18**:307-316.
117. **Krampera, M., L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, V. Santarlasci, B. Mazzinghi, G. Pizzolo, F. Vinante, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato.** 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**:386-398.
118. **Kratz, K., B. Schopf, S. Kaden, A. Sendoel, R. Eberhard, C. Lademann, E. Cannavo, A. A. Sartori, M. O. Hengartner, and J. Jiricny.** 2010. Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell* **142**:77-88.
119. **Kubbies, M., D. Schindler, H. Hoehn, A. Schinzel, and P. S. Rabinovitch.** 1985. Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells. *American journal of human genetics* **37**:1022-1030.
120. **Kunisaki, Y., and P. S. Frenette.** 2012. The secrets of the bone marrow niche: Enigmatic niche brings challenge for HSC expansion. *Nat Med* **18**:864-865.
121. **Kutler, D. I., B. Singh, J. Satagopan, S. D. Batish, M. Berwick, P. F. Giampietro, H. Hanenberg, and A. D. Auerbach.** 2003. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* **101**:1249-1256.
122. **Lapidot, T., A. Dar, and O. Kollet.** 2005. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**:1901-1910.
123. **Lapidot, T., and I. Petit.** 2002. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* **30**:973-981.
124. **Laterveer, L., I. J. Lindley, M. S. Hamilton, R. Willemze, and W. E. Fibbe.** 1995. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* **85**:2269-2275.
125. **Lazarus, H. M., O. N. Koc, S. M. Devine, P. Curtin, R. T. Maziarz, H. K. Holland, E. J. Shpall, P. McCarthy, K. Atkinson, B. W. Cooper, F. van Rhee, J. Mittermueller, T. de Witte, E. Holler, and H. Ansari.** 2005. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded

mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**:389-398.

126. **Le Blanc, K.** 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* **5**:485-489.

127. **Le Blanc, K., F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M. E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R. M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, and O. Ringden.** 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**:1579-1586.

128. **Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel, and O. Ringden.** 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**:1439-1441.

129. **Le Blanc, K., and O. Ringden.** 2005. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **11**:321-334.

130. **Le Blanc, K., H. Samuelsson, B. Gustafsson, M. Remberger, B. Sundberg, J. Arvidson, P. Ljungman, H. Lonnies, S. Nava, and O. Ringden.** 2007. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* **21**:1733-1738.

131. **Lee, W. Y., K. J. Park, Y. B. Cho, S. N. Yoon, K. H. Song, S. Kim do, S. H. Jung, M. Kim, H. W. Yoo, I. Kim, H. Ha, and C. S. Yu.** 2013. Autologous adipose tissue-derived stem cells treatment demonstrated favorable and sustainable therapeutic effect for Crohn's fistula. *Stem Cells* **31**:2575-2581.

132. **Leteurtre, F., X. Li, P. Guardiola, G. Le Roux, J. C. Sergere, P. Richard, E. D. Carosella, and E. Gluckman.** 1999. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *Br J Haematol* **105**:883-893.

133. **Levitus, M., M. A. Rooimans, J. Steltenpool, N. F. Cool, A. B. Oostra, C. G. Mathew, M. E. Hoatlin, Q. Waisfisz, F. Arwert, J. P. de Winter, and H. Joenje.** 2004. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood* **103**:2498-2503.

134. **Li, X., and W. D. Heyer.** 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**:99-113.

135. **Li, Y., J. Chen, X. G. Chen, L. Wang, S. C. Gautam, Y. X. Xu, M. Katakowski, L. J. Zhang, M. Lu, N. Janakiraman, and M. Chopp.** 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* **59**:514-523.

136. **Li, Y., S. Chen, J. Yuan, Y. Yang, J. Li, J. Ma, X. Wu, M. Freund, K. Pollok, H. Hanenberg, W. S. Goebel, and F. C. Yang.** 2009. Mesenchymal stem/progenitor cells promote the reconstitution of exogenous hematopoietic stem cells in *Fancg*^{-/-} mice in vivo. *Blood* **113**:2342-2351.

137. **Li, Z. Y., C. Q. Wang, G. Lu, X. Y. Pan, and K. L. Xu.** 2014. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic recovery and acute graft-versus-host disease in murine allogeneic umbilical cord blood transplantation model. *Cell Biochem Biophys* **70**:115-122.

138. **Liu, J. M., S. Kim, E. J. Read, M. Futaki, I. Dokal, C. S. Carter, S. F. Leitman, M. Pensiero, N. S. Young, and C. E. Walsh.** 1999. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (*FANCC*). *Hum Gene Ther* **10**:2337-2346.

139. **Liu, J. M., N. S. Young, C. E. Walsh, M. Cottler-Fox, C. Carter, C. Dunbar, A. J. Barrett, and R. Emmons.** 1997. Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi anemia complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients. *Hum Gene Ther* **8**:1715-1730.

140. **Liu, T., G. Ghosal, J. Yuan, J. Chen, and J. Huang.** 2010. *FAN1* acts with *FANCI-FANCD2* to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science* **329**:693-696.

141. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* **25**:402-408.

142. **Lo Ten Foe, J. R., M. A. Rooimans, L. Bosnoyan-Collins, N. Alon, M. Wijker, L. Parker, J. Lightfoot, M. Carreau, D. F. Callen, A. Savoia, N. C. Cheng, C. G. van Berkel, M. H. Strunk, J. J. Gille, G. Pals, F. A. Kruyt, J. C. Pronk, F. Arwert, M. Buchwald, and H. Joenje.** 1996. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nature genetics* **14**:320-323.
143. **Lorenz, E., D. Uphoff, T. R. Reid, and E. Shelton.** 1951. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* **12**:197-201.
144. **MacKay, C., A. C. Declais, C. Lundin, A. Agostinho, A. J. Deans, T. J. MacArtney, K. Hofmann, A. Gartner, S. C. West, T. Helleday, D. M. Lilley, and J. Rouse.** 2010. Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell* **142**:65-76.
145. **MacMillan, M. L., A. D. Auerbach, S. M. Davies, T. E. Defor, A. Gillio, R. Giller, R. Harris, M. Cairo, K. Dusenbery, B. Hirsch, N. K. Ramsay, D. J. Weisdorf, and J. E. Wagner.** 2000. Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial. *Br J Haematol* **109**:121-129.
146. **Macmillan, M. L., B. R. Blazar, T. E. DeFor, and J. E. Wagner.** 2009. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* **43**:447-454.
147. **MacMillan, M. L., T. E. DeFor, J. A. Young, K. E. Dusenbery, B. R. Blazar, A. Slungaard, H. Zierhut, D. J. Weisdorf, and J. E. Wagner.** 2015. Alternative donor hematopoietic cell transplantation for Fanconi anemia. *Blood* **125**:3798-3804.
148. **MacMillan, M. L., M. R. Hughes, S. Agarwal, and G. Q. Daley.** 2011. Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**:S109-114.
149. **Macmillan, M. L., and J. E. Wagner.** 2010. Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how? *Br J Haematol* **149**:14.21.
150. **Maggio-Price, L., R. Russell, N. S. Wolf, C. E. Alpers, and D. Engel.** 1988. Clinicopathologic features of young and old sphha/sphha mice. Mutants with congenital hemolytic anemia. *Am J Pathol* **132**:461-473.
151. **Maris, M. B., D. Niederwieser, B. M. Sandmaier, B. Storer, M. Stuart, D. Maloney, E. Petersdorf, P. McSweeney, M. Pulsipher, A. Woolfrey, T. Chauncey, E. Agura, S. Heimfeld, J. Slattery, U. Hegenbart, C. Anasetti, K. Blume, and R. Storb.** 2003. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* **102**:2021-2030.
152. **Masuda, S., N. Ageyama, H. Shibata, Y. Obara, T. Ikeda, K. Takeuchi, Y. Ueda, K. Ozawa, and Y. Hanazono.** 2009. Cotransplantation with MSCs improves engraftment of HSCs after autologous intra-bone marrow transplantation in nonhuman primates. *Exp Hematol* **37**:1250-1257 e1251.
153. **Mazo, I. B., S. Massberg, and U. H. von Andrian.** 2011. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol* **32**:493-503.
154. **McLeod, D. L., M. M. Shreve, and A. A. Axelrad.** 1976. Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature* **261**:492-494.
155. **Meetei, A. R., J. P. de Winter, A. L. Medhurst, M. Wallisch, Q. Waisfisz, H. J. van de Vrugt, A. B. Oostra, Z. Yan, C. Ling, C. E. Bishop, M. E. Hoatlin, H. Joenje, and W. Wang.** 2003. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature genetics* **35**:165-170.
156. **Meetei, A. R., M. Levitus, Y. Xue, A. L. Medhurst, M. Zwaan, C. Ling, M. A. Rooimans, P. Bier, M. Hoatlin, G. Pals, J. P. de Winter, W. Wang, and H. Joenje.** 2004. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nature genetics* **36**:1219-1224.
157. **Meetei, A. R., A. L. Medhurst, C. Ling, Y. Xue, T. R. Singh, P. Bier, J. Steltenpool, S. Stone, I. Dokal, C. G. Mathew, M. Hoatlin, H. Joenje, J. P. de Winter, and W. Wang.** 2005. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nature genetics* **37**:958-963.

158. **Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener, and D. Dilloo.** 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**:4619-4621.
159. **Mendez-Ferrer, S., M. Battista, and P. S. Frenette.** 2010. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci* **1192**:139-144.
160. **Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, and P. S. Frenette.** 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**:829-834.
161. **Metcalfe, D.** 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* **339**:27-30.
162. **Metcalfe, D., H. R. MacDonald, N. Odartchenko, and B. Sordat.** 1975. Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:1744-1748.
163. **Miao, Z., J. Jin, L. Chen, J. Zhu, W. Huang, J. Zhao, H. Qian, and X. Zhang.** 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* **30**:681-687.
164. **Mingozzi, F., and K. A. High.** 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12**:341-355.
165. **Miniero, R., V. Rocha, P. Saracco, F. Locatelli, B. Brichard, A. Nagler, I. Roberts, I. Yaniv, M. Beksac, F. Bernaudin, and E. Gluckman.** 1998. Cord blood transplantation (CBT) in hemoglobinopathies. *Eurocord. Bone Marrow Transplant* **22 Suppl 1**:S78-79.
166. **Mirotsov, M., Z. Zhang, A. Deb, L. Zhang, M. Gnecci, N. Noiseux, H. Mu, A. Pachori, and V. Dzau.** 2007. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:1643-1648.
167. **Modlich, U., J. Bohne, M. Schmidt, C. von Kalle, S. Knoss, A. Schambach, and C. Baum.** 2006. Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* **108**:2545-2553.
168. **Moldovan, G. L., and A. D. D'Andrea.** 2009. How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome. *Annu Rev Genet* **43**:223-249.
169. **Morrison, S. J., N. Uchida, and I. L. Weissman.** 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**:35-71.
170. **Muller, L. U., M. D. Milsom, M. O. Kim, A. Schambach, T. Schuesler, and D. A. Williams.** 2008. Rapid lentiviral transduction preserves the engraftment potential of Fanca(-/-) hematopoietic stem cells. *Mol Ther* **16**:1154-1160.
171. **Muller, L. U., and D. A. Williams.** 2009. Finding the needle in the hay stack: hematopoietic stem cells in Fanconi anemia. *Mutation research* **668**:141-149.
172. **Nakeff, A., and S. Daniels-McQueen.** 1976. In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proc Soc Exp Biol Med* **151**:587-590.
173. **Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, and D. Trono.** 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**:263-267.
174. **Nauta, A. J., G. Westerhuis, A. B. Kruisselbrink, E. G. Lurvink, R. Willemze, and W. E. Fibbe.** 2006. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* **108**:2114-2120.
175. **Navarro, S., N. W. Meza, O. Quintana-Bustamante, J. A. Casado, A. Jacome, K. McAllister, S. Puerto, J. Surralles, J. C. Segovia, and J. A. Bueren.** 2006. Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* **14**:525-535.
176. **Nie, Y., Y. C. Han, and Y. R. Zou.** 2008. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* **205**:777-783.

177. **Nijman, S. M., T. T. Huang, A. M. Dirac, T. R. Brummelkamp, R. M. Kerkhoven, A. D. D'Andrea, and R. Bernards.** 2005. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* **17**:331-339.
178. **Noort, W. A., A. B. Kruisselbrink, P. S. in't Anker, M. Kruger, R. L. van Bezooijen, R. A. de Paus, M. H. Heemskerk, C. W. Lowik, J. H. Falkenburg, R. Willemze, and W. E. Fibbe.** 2002. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* **30**:870-878.
179. **Olsson, R., M. Remberger, M. Schaffer, D. M. Berggren, B. M. Svahn, J. Mattsson, and O. Ringden.** 2013. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* **48**:537-543.
180. **Orozco, L., A. Munar, R. Soler, M. Alberca, F. Soler, M. Huguet, J. Sentis, A. Sanchez, and J. Garcia-Sancho.** 2013. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation* **95**:1535-1541.
181. **Ott, M. G., M. Schmidt, K. Schwarzwaelder, S. Stein, U. Siler, U. Koehl, H. Glimm, K. Kuhlcke, A. Schilz, H. Kunkel, S. Naundorf, A. Brinkmann, A. Deichmann, M. Fischer, C. Ball, I. Pilz, C. Dunbar, Y. Du, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, U. Luthi, M. Hassan, A. J. Thrasher, D. Hoelzer, C. von Kalle, R. Seger, and M. Grez.** 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* **12**:401-409.
182. **Oviedo, A., R. Yanez, I. Colmenero, M. Aldea, A. Rubio, J. A. Bueren, and M. L. Lamana.** 2013. Reduced Efficacy of Mesenchymal Stromal Cells in Preventing Graft-Vs-Host-Disease in an in Vivo Model of Haploidentical Bone Marrow Transplant with Leukemia. *Cell Transplant* **22**:1381-1394.
183. **Papayannopoulou, T.** 2003. Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles. *Curr Opin Hematol* **10**:214-219.
184. **Park, S. K., J. H. Won, H. J. Kim, S. B. Bae, C. K. Kim, K. T. Lee, N. S. Lee, Y. K. Lee, D. C. Jeong, N. G. Chung, H. S. Kim, D. S. Hong, and H. S. Park.** 2007. Co-transplantation of human mesenchymal stem cells promotes human CD34+ cells engraftment in a dose-dependent fashion in NOD/SCID mice. *J Korean Med Sci* **22**:412-419.
185. **Parmar, K., A. D'Andrea, and L. J. Niedernhofer.** 2009. Mouse models of Fanconi anemia. *Mutation research* **668**:133-140.
186. **Pasquini, R., J. Carreras, M. C. Pasquini, B. M. Camitta, A. L. Fasth, G. A. Hale, R. E. Harris, J. C. Marsh, A. J. Robinson, M. J. Zhang, M. Eapen, and J. E. Wagner.** 2008. HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation for fanconi anemia: comparison of irradiation and nonirradiation containing conditioning regimens. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**:1141-1147.
187. **Perdomo-Arciniegas, A. M., and J. P. Vernet.** 2011. Co-culture of hematopoietic stem cells with mesenchymal stem cells increases VCAM-1-dependent migration of primitive hematopoietic stem cells. *International journal of hematology* **94**:525-532.
188. **Perez, L. E., H. M. Rinder, C. Wang, J. B. Tracey, N. Maun, and D. S. Krause.** 2001. Xenotransplantation of immunodeficient mice with mobilized human blood CD34+ cells provides an in vivo model for human megakaryocytopoiesis and platelet production. *Blood* **97**:1635-1643.
189. **Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak.** 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143-147.
190. **Pluznik, D. H., and L. Sachs.** 1965. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* **66**:319-324.
191. **Puissant, B., C. Barreau, P. Bourin, C. Clavel, J. Corre, C. Bousquet, C. Taureau, B. Cousin, M. Abbal, P. Laharrague, L. Penicaud, L. Casteilla, and A. Blancher.** 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* **129**:118-129.

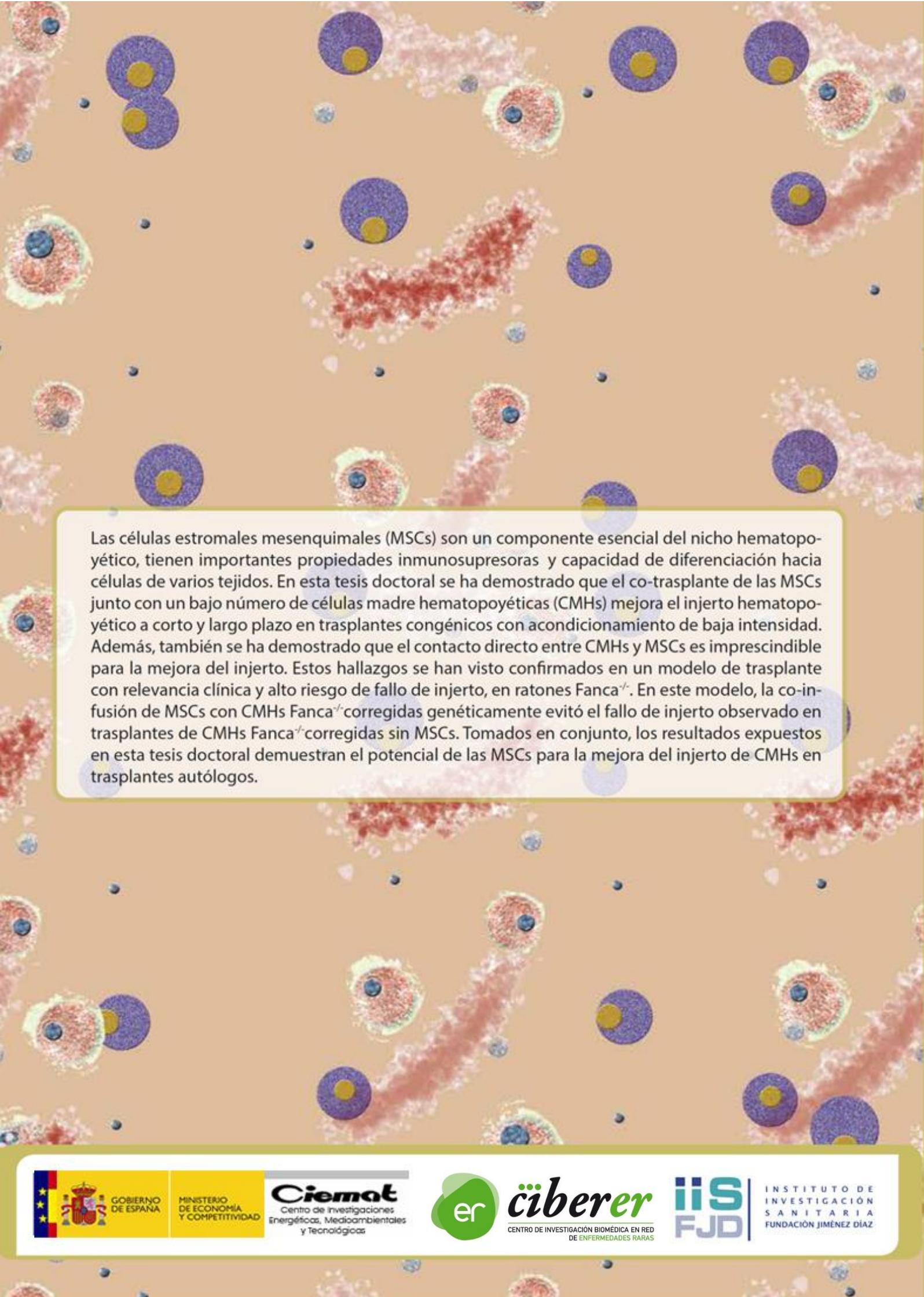
192. **Rafii, S., R. Mohle, F. Shapiro, B. M. Frey, and M. A. Moore.** 1997. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma* **27**:375-386.
193. **Rahman, N., S. Seal, D. Thompson, P. Kelly, A. Renwick, A. Elliott, S. Reid, K. Spanova, R. Barfoot, T. Chagtai, H. Jayatilake, L. McGuffog, S. Hanks, D. G. Evans, D. Eccles, D. F. Easton, and M. R. Stratton.** 2006. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics*.
194. **Rangappa, S., C. Fen, E. H. Lee, A. Bongso, and E. K. Sim.** 2003. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* **75**:775-779.
195. **Ratajczak, M. Z., J. Ratajczak, B. Machalinski, and A. M. Gewirtz.** 1998. *In vitro* and *in vivo* evidence that *ex vivo* cytokine priming of donor marrow cells may ameliorate posttransplant thrombocytopenia. *Blood* **91**:353-359.
196. **Reiser, J., G. Harmison, S. Kluepfel-Stahl, R. O. Brady, S. Karlsson, and M. Schubert.** 1996. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:15266-15271.
197. **Ren, G., L. Zhang, X. Zhao, G. Xu, Y. Zhang, A. I. Roberts, R. C. Zhao, and Y. Shi.** 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell* **2**:141-150.
198. **Resnick, I. B., M. Y. Shapira, and S. Slavin.** 2005. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy for malignant and non-malignant diseases. *Transpl Immunol* **14**:207-219.
199. **Rio, P., N. W. Meza, A. Gonzalez-Murillo, S. Navarro, L. Alvarez, J. Surralles, M. Castella, G. Guenechea, J. C. Segovia, H. Hanenberg, and J. A. Bueren.** 2008. In vivo proliferation advantage of genetically corrected hematopoietic stem cells in a mouse model of Fanconi anemia FA-D1. *Blood* **112**:4853-4861.
200. **Rio, P., J. C. Segovia, H. Hanenberg, J. A. Casado, J. Martinez, K. Gottsche, N. C. Cheng, H. J. Van de Vrugt, F. Arwert, H. Joenje, and J. A. Bueren.** 2002. In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* **100**:2032-2039.
201. **Rosenberg, P. S., B. P. Alter, and W. Ebell.** 2008. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* **93**:511-517.
202. **Rosenberg, P. S., G. Socie, B. P. Alter, and E. Gluckman.** 2005. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood* **105**:67-73.
203. **Rosselli, F., J. Sanceau, E. Gluckman, J. Wietzerbin, and E. Moustacchi.** 1994. Abnormal lymphokine production: a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II. In vitro and in vivo spontaneous overproduction of tumor necrosis factor alpha. *Blood* **83**:1216-1225.
204. **Ruster, B., S. Gottig, R. J. Ludwig, R. Bistran, S. Muller, E. Seifried, J. Gille, and R. Henschler.** 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* **108**:3938-3944.
205. **Ryu, B. Y., M. V. Evans-Galea, J. T. Gray, D. M. Bodine, D. A. Persons, and A. W. Nienhuis.** 2007. An experimental system for the evaluation of retroviral vector design to diminish the risk for proto-oncogene activation. *Blood*.
206. **Saito, H., A. T. Hammond, and R. E. Moses.** 1993. Hypersensitivity to oxygen is a uniform and secondary defect in Fanconi anemia cells. *Mutation research* **294**:255-262.
207. **Sawyer, S. L., L. Tian, M. Kahkonen, J. Schwartzentruber, M. Kircher, J. Majewski, D. A. Dymant, A. M. Innes, K. M. Boycott, L. A. Moreau, J. S. Moilanen, and R. A. Greenberg.** 2014. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov* **5**:135-142.
208. **Scott, L. M., G. V. Priestley, and T. Papayannopoulou.** 2003. Deletion of alpha4 integrins from adult hematopoietic cells reveals roles in homeostasis, regeneration, and homing. *Mol Cell Biol* **23**:9349-9360.

209. **Schofield, R.** 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**:7-25.
210. **Schuler, D., A. Kiss, and F. Fabian.** 1969. Chromosomal peculiarities and "in vitro" examinations in Fanconi's anaemia. *Humangenetik* **7**:314-322.
211. **Seyschab, H., R. Friedl, Y. Sun, D. Schindler, H. Hoehn, S. Hentze, and T. Schroeder-Kurth.** 1995. Comparative evaluation of diepoxybutane sensitivity and cell cycle blockage in the diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* **85**:2233-2237.
212. **Simmons, P. J., D. Przepiorka, E. D. Thomas, and B. Torok-Storb.** 1987. Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature* **328**:429-432.
213. **Skinner, A. M., S. L. O'Neill, M. Grompe, and P. Kurre.** 2008. CXCR4 induction in hematopoietic progenitor cells from Fanca(-/-), -c(-/-), and -d2(-/-) mice. *Exp Hematol* **36**:273-282.
214. **Smith, H., C. Whittall, B. Weksler, and J. Middleton.** 2012. Chemokines Stimulate Bidirectional Migration of Human Mesenchymal Stem Cells Across Bone Marrow Endothelial Cells. *Stem Cells Dev* **21**:476-486.
215. **Smogorzewska, A., R. Desetty, T. T. Saito, M. Schlabach, F. P. Lach, M. E. Sowa, A. B. Clark, T. A. Kunkel, J. W. Harper, M. P. Colaiacovo, and S. J. Elledge.** 2010. A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Molecular cell* **39**:36-47.
216. **Smogorzewska, A., S. Matsuoka, P. Vinciguerra, E. R. McDonald, 3rd, K. E. Hurov, J. Luo, B. A. Ballif, S. P. Gygi, K. Hofmann, A. D. D'Andrea, and S. J. Elledge.** 2007. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* **129**:289-301.
217. **Socie, G.** 2013. Allogeneic BM transplantation for the treatment of aplastic anemia: current results and expanding donor possibilities. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2013**:82-86.
218. **Sordi, V., M. L. Malosio, F. Marchesi, A. Mercalli, R. Melzi, T. Giordano, N. Belmonte, G. Ferrari, B. E. Leone, F. Bertuzzi, G. Zerbin, P. Allavena, E. Bonifacio, and L. Piemonti.** 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* **106**:419-427.
219. **Spangrude, G. J., and G. R. Johnson.** 1990. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:7433-7437.
220. **Springer, T. A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**:301-314.
221. **Stabler, C. T., S. Lecht, P. Lazarovici, and P. I. Leikes.** 2015. Mesenchymal stem cells for therapeutic applications in pulmonary medicine. *Br Med Bull*.
222. **Stoepker, C., K. Hain, B. Schuster, Y. Hilhorst-Hofstee, M. A. Rooimans, J. Steltenpool, A. B. Oostra, K. Eirich, E. T. Korthof, A. W. Nieuwint, N. G. Jaspers, T. Bettecken, H. Joenje, D. Schindler, J. Rouse, and J. P. de Winter.** 2011. SLX4, a coordinator of structure-specific endonucleases, is mutated in a new Fanconi anemia subtype. *Nature genetics*.
223. **Strathdee, C. A., H. Gavish, W. R. Shannon, and M. Buchwald.** 1992. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* **356**:763-767.
224. **Sudres, M., F. Norol, A. Trenado, S. Gregoire, F. Charlotte, B. Levacher, J. J. Lataillade, P. Bourin, X. Holy, J. P. Vernant, D. Klatzmann, and J. L. Cohen.** 2006. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* **176**:7761-7767.
225. **Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda, and T. Nagasawa.** 2006. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**:977-988.
226. **Swart, J. F., and N. M. Wulffraat.** 2014. Mesenchymal stromal cells for treatment of arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology* **28**:589-603.

227. **Sykes, M., C. H. Chester, T. M. Sundt, M. L. Romick, K. A. Hoyles, and D. H. Sachs.** 1989. Effects of T cell depletion in radiation bone marrow chimeras. III. Characterization of allogeneic bone marrow cell populations that increase allogeneic chimerism independently of graft-vs-host disease in mixed marrow recipients. *J Immunol* **143**:3503-3511.
228. **Taichman, R. S., and S. G. Emerson.** 1994. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* **179**:1677-1682.
229. **Tavtigian, S. V., J. Simard, J. Rommens, F. Couch, D. Shattuck-Eidens, S. Neuhausen, S. Merajver, S. Thorlacius, K. Offit, D. Stoppa-Lyonnet, C. Belanger, R. Bell, S. Berry, R. Bogden, Q. Chen, T. Davis, M. Dumont, C. Frye, T. Hattier, S. Jammulapati, T. Janecki, P. Jiang, R. Kehrer, J. F. Leblanc, J. T. Mitchell, J. McArthur-Morrison, K. Nguyen, Y. Peng, C. Samson, M. Schroeder, S. C. Snyder, L. Steele, M. Stringfellow, C. Stroup, B. Swedlund, J. Swense, D. Teng, A. Thomas, T. Tran, M. Tranchant, J. Weaver-Feldhaus, A. K. Wong, H. Shizuya, J. E. Eyfjord, L. Cannon-Albright, F. Labrie, M. H. Skolnick, B. Weber, A. Kamb, and D. E. Goldgar.** 1996. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature genetics* **12**:333-337.
230. **Thomas, E. D.** 1975. Bone marrow transplantation: prospects for leukemia and other conditions. *The Proceedings of the Institute of Medicine of Chicago* **30**:256-258.
231. **Thomas, E. D.** 1983. Karnofsky Memorial Lecture. Marrow transplantation for malignant diseases. *J Clin Oncol* **1**:517-531.
232. **Thomas, E. D., R. Storb, R. A. Clift, A. Fefer, L. Johnson, P. E. Neiman, K. G. Lerner, H. Glucksberg, and C. D. Buckner.** 1975. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med* **292**:895-902.
233. **Timmers, C., T. Taniguchi, J. Hejna, C. Reifsteck, L. Lucas, D. Bruun, M. Thayer, B. Cox, S. Olson, A. D. D'Andrea, R. Moses, and M. Grompe.** 2001. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Molecular cell* **7**:241-248.
234. **Tisato, V., and E. Cozzi.** 2012. Xenotransplantation: an overview of the field. *Methods Mol Biol* **885**:1-16.
235. **Tischkowitz, M., and I. Dokal.** 2004. Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br J Haematol* **126**:176-191.
236. **Tolar, J., J. E. Adair, M. Antoniou, C. C. Bartholomae, P. S. Becker, B. R. Blazar, J. Bueren, T. Carroll, M. Cavazzana-Calvo, D. W. Clapp, R. Dalglish, A. Galy, H. B. Gaspar, H. Hanenberg, C. Von Kalle, H. P. Kiem, D. Lindeman, L. Naldini, S. Navarro, R. Renella, P. Rio, J. Sevilla, M. Schmidt, E. Verhoeyen, J. E. Wagner, D. A. Williams, and A. J. Thrasher.** 2011. Stem Cell Gene Therapy for Fanconi Anemia: Report from the 1st International Fanconi Anemia Gene Therapy Working Group Meeting. *Mol Ther* **19**:1193-1198.
237. **Tolar, J., P. S. Becker, D. W. Clapp, H. Hanenberg, C. D. de Heredia, H. P. Kiem, S. Navarro, P. Qasba, P. Rio, M. Schmidt, J. Sevilla, E. Verhoeyen, A. J. Thrasher, and J. Bueren.** 2012. Gene therapy for Fanconi anemia: one step closer to the clinic. *Hum Gene Ther* **23**:141-144.
238. **Tothova, Z., R. Kollipara, B. J. Huntly, B. H. Lee, D. H. Castrillon, D. E. Cullen, E. P. McDowell, S. Lazo-Kallanian, I. R. Williams, C. Sears, S. A. Armstrong, E. Passegue, R. A. DePinho, and D. G. Gilliland.** 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* **128**:325-339.
239. **Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia.** 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**:726-736.
240. **Uchida, N., D. He, A. M. Frieria, M. Reitsma, D. Sasaki, B. Chen, and A. Tsukamoto.** 1997. The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood* **89**:465-472.
241. **Uchida, N., A. Tsukamoto, D. He, A. M. Frieria, R. Scollay, and I. L. Weissman.** 1998. High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts. *J Clin Invest* **101**:961-966.
242. **Valeri, A., S. Martinez, J. A. Casado, and J. A. Bueren.** 2011. Fanconi anaemia: from a monogenic disease to sporadic cancer. *Clin Transl Oncol* **13**:215-221.

243. **Varas, F., A. Bernad, and J. A. Bueren.** 1996. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes into peripheral blood the complete clonal repertoire of hematopoietic precursors residing in the bone marrow of mice. *Blood* **88**:2495-2501.
244. **Vaz, F., H. Hanenberg, B. Schuster, K. Barker, C. Wiek, V. Erven, K. Neveling, D. Endt, I. Kesterton, F. Autore, F. Fraternali, M. Freund, L. Hartmann, D. Grimwade, R. G. Roberts, H. Schaal, S. Mohammed, N. Rahman, D. Schindler, and C. G. Mathew.** 2010. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nature genetics* **42**:406-409.
245. **Verfaillie, C. M.** 1998. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood* **92**:2609-2612.
246. **Verlinsky, Y., S. Rechitsky, W. Schoolcraft, C. Strom, and A. Kuliev.** 2001. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *Jama* **285**:3130-3133.
247. **Vermeulen, M., F. Le Pesteur, M. C. Gagnerault, J. Y. Mary, F. Sainteny, and F. Lepault.** 1998. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **92**:894-900.
248. **Virts, E. L., A. Jankowska, C. MacKay, M. F. Glaas, C. Wiek, S. L. Kelich, N. Lottmann, F. M. Kennedy, C. Marchal, E. Lehren, R. Scharf, C. Dufour, M. Lanciotti, P. Farruggia, A. Santoro, S. Savasan, K. Scheckenbach, J. Schipper, M. Wagenmann, T. Lewis, M. Leffak, J. L. Farlow, T. M. Foroud, E. Honisch, D. Niederacher, S. C. Chakraborty, G. H. Vance, D. Pruss, K. M. Timms, J. S. Lanchbury, A. F. Alpi, and H. Hanenberg.** 2015. AluY-mediated Germline Deletion, Duplication and Somatic Stem Cell Reversion in UBE2T Defines a New Subtype of Fanconi Anemia. *Hum Mol Genet.*
249. **Visnjic, D., Z. Kalajzic, D. W. Rowe, V. Katavic, J. Lorenzo, and H. L. Aguila.** 2004. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**:3258-3264.
250. **von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, and D. Trono.** 1994. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:6992-6996.
251. **Wagner, J. E., M. Eapen, M. L. MacMillan, R. E. Harris, R. Pasquini, F. Boulad, M. J. Zhang, and A. D. Auerbach.** 2007. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood* **109**:2256-2262.
252. **Waisfisz, Q., N. V. Morgan, M. Savino, J. P. de Winter, C. G. van Berkel, M. E. Hoatlin, L. Ianzano, R. A. Gibson, F. Arwert, A. Savoia, C. G. Mathew, J. C. Pronk, and H. Joenje.** 1999. Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nature genetics* **22**:379-383.
253. **Wakitani, S., T. Mitsuoka, N. Nakamura, Y. Toritsuka, Y. Nakamura, and S. Horibe.** 2004. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant* **13**:595-600.
254. **Wang, A. T., T. Kim, J. E. Wagner, B. A. Conti, F. P. Lach, A. L. Huang, H. Molina, E. M. Sanborn, H. Zierhut, B. K. Cornes, A. Abhyankar, C. Sougnez, S. B. Gabriel, A. D. Auerbach, S. C. Kowalczykowski, and A. Smogorzewska.** 2015. A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Molecular cell* **59**:478-490.
255. **Wang, L., L. Wang, X. Cong, G. Liu, J. Zhou, B. Bai, Y. Li, W. Bai, M. Li, H. Ji, D. Zhu, M. Wu, and Y. Liu.** 2013. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem cells and development* **22**:3192-3202.
256. **Whitney, M. A., G. Royle, M. J. Low, M. A. Kelly, M. K. Axthelm, C. Reifsteck, S. Olson, R. E. Braun, M. C. Heinrich, R. K. Rathbun, G. C. Bagby, and M. Grompe.** 1996. Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood* **88**:49-58.
257. **Wilson, A., and A. Trumpp.** 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* **6**:93-106.

258. **Woodbury, D., E. J. Schwarz, D. J. Prockop, and I. B. Black.** 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61**:364-370.
259. **Wu, Y., Y. Cao, X. Li, L. Xu, Z. Wang, P. Liu, P. Yan, Z. Liu, J. Wang, S. Jiang, X. Wu, C. Gao, W. Da, and Z. Han.** 2014. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia: successful engraftment and mild GVHD. *Stem Cell Res* **12**:132-138.
260. **Wu, Y., Z. Wang, Y. Cao, L. Xu, X. Li, P. Liu, P. Yan, Z. Liu, D. Zhao, J. Wang, X. Wu, C. Gao, W. Da, and Z. Han.** 2013. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells with a myeloablative regimen for refractory/relapsed hematologic malignancy. *Ann Hematol* **92**:1675-1684.
261. **Xu, H., B. G. Exner, P. M. Chilton, C. Schanie, and S. T. Ildstad.** 2004. CD45 congenic bone marrow transplantation: evidence for T cell-mediated immunity. *Stem Cells* **22**:1039-1048.
262. **Yanez, R., M. L. Lamana, J. Garcia-Castro, I. Colmenero, M. Ramirez, and J. A. Bueren.** 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* **24**:2582-2591.
263. **Yanez, R., A. Oviedo, M. Aldea, J. A. Bueren, and M. L. Lamana.** 2010. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Experimental cell research* **316**:3109-3123.
264. **Yang, L., D. Bryder, J. Adolfsson, J. Nygren, R. Mansson, M. Sigvardsson, and S. E. Jacobsen.** 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)*kit*(+)CD34(+)*Flt3*- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* **105**:2717-2723.
265. **Yang, Y., Y. Kuang, R. Montes De Oca, T. Hays, L. Moreau, N. Lu, B. Seed, and A. D. D'Andrea.** 2001. Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, *Fancg/Xrcc9*. *Blood* **98**:3435-3440.
266. **Young, R. G., D. L. Butler, W. Weber, A. I. Caplan, S. L. Gordon, and D. J. Fink.** 1998. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* **16**:406-413.
267. **Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li.** 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**:836-841.
268. **Zhang, X., X. Shang, F. Guo, K. Murphy, M. Kirby, P. Kelly, L. Reeves, F. O. Smith, D. A. Williams, Y. Zheng, and Q. Pang.** 2008. Defective homing is associated with altered *Cdc42* activity in cells from Fanconi anemia group A patients. *Blood*.
269. **Zlotnik, A., and O. Yoshie.** 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**:121-127.
270. **Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz, and M. H. Hedrick.** 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**:211-228.



Las células estromales mesenquimales (MSCs) son un componente esencial del nicho hematopoyético, tienen importantes propiedades inmunosupresoras y capacidad de diferenciación hacia células de varios tejidos. En esta tesis doctoral se ha demostrado que el co-trasplante de las MSCs junto con un bajo número de células madre hematopoyéticas (CMHs) mejora el injerto hematopoyético a corto y largo plazo en trasplantes congénicos con acondicionamiento de baja intensidad. Además, también se ha demostrado que el contacto directo entre CMHs y MSCs es imprescindible para la mejora del injerto. Estos hallazgos se han visto confirmados en un modelo de trasplante con relevancia clínica y alto riesgo de fallo de injerto, en ratones *Fanca*^{-/-}. En este modelo, la co-in-fusión de MSCs con CMHs *Fanca*^{-/-} corregidas genéticamente evitó el fallo de injerto observado en trasplantes de CMHs *Fanca*^{-/-} corregidas sin MSCs. Tomados en conjunto, los resultados expuestos en esta tesis doctoral demuestran el potencial de las MSCs para la mejora del injerto de CMHs en trasplantes autólogos.