

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD VETERINARIA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**TRANSFERENCIA GÉNICA A PROGENITORES  
HEMATOPOYÉTICOS CANINOS**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Leticia González León

Bajo la dirección de la Doctora:

Concepción Tejero Ortego

**Madrid, 2005**

**ISBN: 84-669-2850-2**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV**



**TRANSFERENCIA GÉNICA A PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS**  
**CANINOS**

**TESIS DOCTORAL**

**LETICIA GONZÁLEZ LEÓN**

Madrid, 2005

La Dra. **Concepción Tejero Ortego**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que **Leticia González León**, licenciada con grado en Farmacia por la Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado "TRANSFERENCIA GÉNICA A PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS CANINOS", como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Marzo de 2005

VºBº DIRECTOR:

Dra. Concepción Tejero Ortego

La interesada: Fdo. Leticia González León

Madrid, 2005



Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria. Este estudio, así como la beca disfrutada, fue subvencionado por la Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. y se realizó bajo la dirección de la Dra. Concepción Tejero Ortego.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra han hecho posible la realización de esta tesis doctoral, especialmente a **Concha**, mi directora de tesis, por haberme aceptado en su grupo, en este proyecto, y por haberme apoyado y guiado en todo momento. Al Prof. **Hans Jochem Kolb** y su grupo, que desde Alemania me han apoyado brindándome valiosos consejos a lo largo de estos años.

Agradezco a **Luciana**, mi compañera no solo dentro del laboratorio, por su amistad, paciencia y saber hacer que han sido un gran apoyo cada día. *A melhor compaheira de laboratorio, nunca esquecerei os momentos que passamos juntas “pensando em nossas células verdes”, obrigadão pela força.*

Agradezco a **Marisa** y **Cristina** no haber perdido nunca la sonrisa, ni cuando las extracciones eran a las 8 de la mañana, además de su apoyo incondicional, y sus buenos consejos.

Agradezco a la gente del CIEMAT, al **Dr. Juan Bueren**, a **Guillermo**, **José Carlos**, **Israel**, **Sergio**, **Elena**, **José Antonio**, **África** por sus consejos y tiempo dedicado cuando realizábamos las irradiaciones, usábamos el FACS, el microscopio de fluorescencia, y contestaban a mis innumerables dudas.

Agradezco a la gente del Centro de Microscopia y Citometría, **Carmen**, **Amalia** y **Luis** los buenos momentos y consejos durante las medidas de citometría.

Agradezco a las chicas y chicos del departamento de sanidad animal las buenas sobremesas y buen ambiente compartido en las comidas.

Agradezco a **Ana** los buenos ratos pasados en el hospital entre citospin y tinción.

Agradezco a **Marga, Mar y Carlos** el buen ambiente del pasillo, además del perpetuo préstamo de la microfúga y granatário y especialmente a Carlos sus consejos informáticos.

Agradezco a **Sole** que me ayudó en mis primeros pasos en la cabina, a **Elvira** sus más que resistentes batas, a **Pilar** por presentarme a Concha y Sole.

Agradezco a **Antonio**, nuestro “teacher” por esas fantásticas horas intentando enseñarnos inglés, “siempre nos quedarán las preposiciones”.

Agradezco a las personas que fuera de la facultad me ha animado día a día y aguantado mis malos momentos con paciencia y buena cara, a mi familia, a mis amig@s, a **Eudes, Mónica, Noelia, Raquel, Ely, Isa, Esther**, etc. y a toda la gente del gimnasio J. Molina.

Agradezco especialmente a **AMGEN** el suministro de las citoquinas caninas utilizadas durante este estudio.

## ABREVIATURAS

**BFU-E:** Unidad formadora de *burst* eritroides

**CAFC:** Célula formadora de áreas *cobblestone*

**CFC:** Célula formadora de colonias.

**CSF:** Factor estimulante de colonias

**DMEM:** Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

**DHR:** Dihidrorodamina

**DMSO:** Dimetil Sulfóxido

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético

**EICH:** Enfermedad de injerto contra huésped

**hEPO:** Eritropoyetina humana

**FACS:** *Fluorescence activated cells sorting*

**FBS:** Suero fetal bovino

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**hFlt-3:** Ligando humano *fms-like* tirosina quinasa

**cG-CSF:** Factor canino estimulante de colonias de granulocitos

**hGM-CSF:** Factor humano estimulante de colonias granulo-macrofágicas

**Gy:** Unidad internacional de dosis de radiación absorbida (Gray)

**HC:** Hemisuccinato de hidrocortisona

**IMDM:** Medio de cultivo Dulbecco modificado por Iscove

**IP:** Ioduro de Propidio

**hIL-6:** Interleukina 6 humana

**kD:** KiloDalton

**Lin-:** Linaje negativo resultado de la inmunoselección negativa.

**Lin+:** Linaje positivo resultado de la inmunoselección negativa.

**LTBMC:** Cultivo de larga duración de médula ósea

**LTC-IC:** Célula iniciadora de cultivos de larga duración

**LTRC:** *Long term repopulating cells*

**MACS:** *Magnetic activated cells sorting*



**MMP-9:** Metaloproteinasa 9  
**MPM:** Marcador de peso molecular  
**PBS:** Solución salina tamponada con fosfato  
**PE:** Ficoeritrina  
**PMA:** *Phorbol myristate acetate*  
**Rh-123:** Rodamina 123  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**h/cSCF:** *Stem cell factor* humano y canino  
**SDS:** Dodecil sulfato sódico  
**SP:** Suero canino  
**SS:** Solución salina  
**hTPO:** Trombopoyetina k humana  
**Tris:** Tris-hidroximetil aminometano  
**UCI:** Unidad de cuidados intensivos  
**V/v:** Relación volumen/volumen

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<u>I.1. ESTRUCTURA DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO</u>	<b>3</b>
<b>I.1.1. Células madre y progenitores: el antígeno CD34</b>	<b>3</b>
<b>I.1.2. Células maduras: el neutrófilo</b>	<b>8</b>
<u>I.2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA HEMATOPOYESIS</u>	<b>10</b>
<u>I.3. UTILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EN LA CLÍNICA</u>	<b>13</b>
<u>I.4. EL PERRO COMO MODELO PRECLÍNICO</u>	<b>15</b>
<u>I.5. TRANSDUCCION DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS</u>	<b>16</b>
<b>I.5.1. Terapia génica</b>	<b>16</b>
<b>I.5.2. Vectores retrovirales</b>	<b>17</b>
I.5.2.1. Onco-retrovirus	<b>18</b>
I.5.2.2. Lentivirus	<b>21</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<u>III.1. MATERIAL BIOLÓGICO</u>	<b>31</b>
<b>III.1.1. Animales de experimentación</b>	<b>31</b>
<b>III.1.2. Líneas celulares</b>	<b>31</b>
III.1.2.1. Producción de sobrenadante viral	<b>32</b>
<u>III.2. MATERIAL DE LABORATORIO</u>	<b>33</b>
<u>III.3. PRODUCTOS UTILIZADOS</u>	<b>34</b>
<b>III.3.1. Medios de cultivo</b>	<b>34</b>
<b>III.3.2. Productos químicos</b>	<b>35</b>
<b>III.3.3. Citoquinas</b>	<b>35</b>
<b>III.3.4. Anticuerpos</b>	<b>36</b>
<b>III.3.5. Fluorocromos</b>	<b>36</b>
<u>III.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS</u>	<b>37</b>
<b>III.4.1. Obtención de médula ósea</b>	<b>37</b>
<b>III.4.2. Aislamiento de células mononucleares</b>	<b>37</b>

<b>III.4.3. Obtención de muestras de sangre periférica</b>	<b>38</b>
III.4.3.1. Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica	38
III.4.3.2. Obtención de suero canino	39
<b><u>III.5. TÉCNICAS</u></b>	<b>39</b>
<b>III.5.1. Cultivos de progenitores hematopoyéticos</b>	<b>39</b>
<b>III.5.2. Técnicas inmunomagnéticas</b>	<b>40</b>
III.5.2.1. Selección positiva	41
III.5.2.2. Selección negativa	43
<b>III.5.3. Análisis por citometría de flujo</b>	<b>45</b>
III.5.3.1. Separación por FACS	46
<b>III.5.4. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i></b>	<b>47</b>
III.5.4.1. Obtención de células de sobrenadante de cultivo	48
III.5.4.2. Aislamiento de granulocitos de cultivo	48
III.5.4.3. Obtención de células adherentes de cultivo	49
III.5.4.4. Irradiación de los sistemas <i>in vitro</i>	49
<b>III.5.5. Análisis de funcionalidad de células obtenidas de LT BMC</b>	<b>50</b>
III.5.5.1. Marcaje con CD 15	50
III.5.5.2. Zimografía	51
III.5.5.3. Marcaje con DHR	51
<b>III.5.6. Transducción</b>	<b>52</b>
III.5.6.1. Estudios de pre-estimulación	52
III.5.6.2. Protocolos de transducción	53
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b><u>IV.1. AISLAMIENTO DE UNA POBLACION ENRIQUECIDA DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS</u></b>	<b>59</b>
<b>IV.1.1. Condiciones para cultivos de progenitores Hematopoyéticos</b>	<b>59</b>
<b>IV.1.2. Selección positiva</b>	<b>62</b>
<u>IV.1.2.1. Aislamiento con 6C9</u>	<b>62</b>

<u>IV.1.2.2. Aislamiento con el anticuerpo comercial 1H6</u>	64
<b>IV.1.3. Inmunoselección negativa</b>	67
<u>IV.1.3.1. Estudio de anticuerpos utilizados</u>	67
<u>IV.1.3.2. Selección negativa</u>	70
IV.1.3.2.1. Cultivos de progenitores hematopoyéticos	70
IV.1.3.2.2. Estudio morfológico	73
IV.1.3.2.3. Marcaje de Lin- con Rh-123	75
<b><u>IV.2. CAPACIDAD DE ANIDAMIENTO, DIFERENCIACION Y</u></b>	
<b><u>PROLIFERACION DE LA POBLACIÓN AISLADA</u></b>	77
<b>IV.2.1. Sistema <i>in vitro</i> (LTBMC)</b>	77
<b>IV.2.2. Capacidad de anidar de Lin- (LTC-IC)</b>	79
<b>IV.2.3. Pruebas de funcionalidad de neutrófilos</b>	80
<u>IV.2.3.1. Cuantificación de células CD 15+</u>	80
<u>IV.2.3.2. Zimografía</u>	81
<u>IV.2.3.3. Capacidad de producir ROS</u>	82
<b><u>IV.3. TRANSDUCCIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS</u></b>	83
<b>IV.3.1. Estudios de pre-estimulación</b>	83
<b>IV.3.2. Protocolos de transducción</b>	86
<u>IV.3.2.1. Protocolo 1</u>	87
<u>IV.3.2.2. Protocolo 2</u>	88
<u>IV.3.2.3. Protocolo 3</u>	89
<b>V. DISCUSIÓN</b>	95
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	111
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	115

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. ESTRUCTURA DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

La Hematopoyesis es el proceso que tiene lugar en la médula ósea en un individuo adulto, por el cual se produce la formación de las células maduras que se encuentran en sangre circulante. Este proceso se describió en su momento como una progresión jerárquica de maduración, donde un pequeño grupo de células generan poblaciones amplificadas de células comprometidas hacia los distintos linajes de diferenciación. Es decir, las células sanguíneas derivan en última instancia, de una pequeña población de células denominadas “células madre”, conocidas por el término inglés “stem”.

El conocimiento de la estructura del sistema hematopoyético, comenzó a partir de los trabajos de Till y McCulloch (1961), Pluznick y Sanchs (1965), Metcalf y Moore (1971). Según estos estudios las poblaciones hematopoyéticas se subdividieron en tres compartimentos: células madre hematopoyéticas y progenitores pluripotentes; progenitores comprometidos y células maduras (Dexter y Spooncer, 1987; Lord y Testa, 1988). Nuevas técnicas de análisis, han profundizado en la estructura del sistema hematopoyético (Fig.I.1), definiendo de forma mas exhaustiva cada uno de estos compartimientos (Szilvassy, 2003; Smith, 2003; Mukhopadhyay y col., 2004).

### **I.1.1. Células madre y progenitores hematopoyéticos: el antígeno CD34**

Una de las primeras definiciones sobre la célula madre hematopoyética la realizaron Till y McCulloch (1961), y Dexter y col (1977). Estos autores la describieron como “una célula con alta tasa de autorenovación, pluripotencialidad y capacidad para mantener la hematopoyesis durante largos periodos de tiempo”.

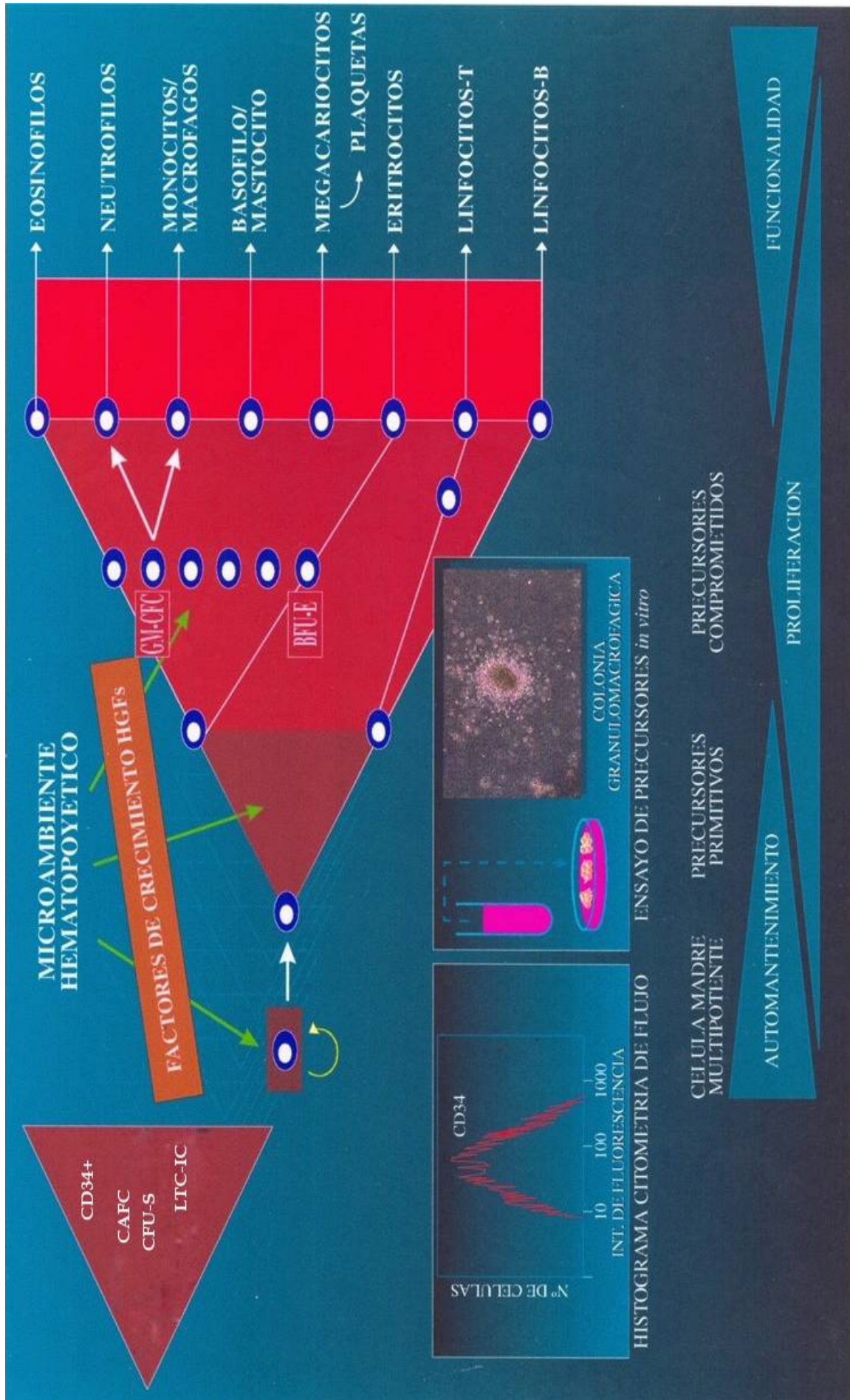


Figura.I.1. Esquema del sistema hematopoyético



Desde entonces innumerables estudios sobre este tipo de células han llevado a definir las por sus tres características fundamentales: su capacidad pluripotente, dando lugar a todos los linajes celulares que se encuentran en sangre circulante; su alto potencial proliferativo, siendo capaces de repoblar completamente un sistema hematopoyético dañado ya sea por tratamientos con quimioterapia y/o radioterapia o enfermedades malignas. Sin embargo, la característica más importante de esta población celular es la capacidad de auto mantenimiento, fundamental para asegurar un número mínimo de células madre que permita sustentar la hematopoyesis del individuo a lo largo de toda su vida (Szilvassy, 2003; Uher y col., 2003; Wognum y col., 2003; Sauvageau y col., 2004).

Como es obvio, se requiere un equilibrio entre el automantenimiento y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas que permita mantener la homeostasis del sistema.

Se han descrito dos modelos de regulación de la hematopoyesis, según se haya dado más importancia a los procesos genéticos intrínsecos de las células, modelo estocástico (Till y McCulloch, 1964), o a la acción del microambiente hematopoyético sobre dichas células, modelo determinista (Trentin, 1970). En cualquier caso estos dos modelos propuestos no son excluyentes entre sí, llegando a existir una interrelación entre el microambiente hematopoyético y los procesos genéticamente intrínsecos de las células, mediante mecanismos altamente coordinados.

Se pueden considerar dos componentes constitutivos del microambiente hematopoyético; uno humoral, en el cual se engloban las citoquinas (Golde, 1984; Metcalf, 1984; Dexter y White, 1990), y factores inhibidores (Moore, 1991; Mayani y col., 1995; Sauvageau y col., 2004), y otro celular donde se encuentran las células estromales y la matriz extracelular (Dexter y col., 1977; Testa y Dexter, 1977; Dexter y col., 1981; Mukhopadhyay y col., 2004). Ambos

componentes actúan simultáneamente y en cooperación durante la regulación de la hematopoyesis.

El aislamiento y manejo de las células madre hematopoyéticas es una herramienta muy eficaz para el diseño de nuevos tratamientos terapéuticos. Hasta hace dos décadas el aislamiento de estas células estaba dificultado en parte, por su baja proporción dentro de la médula ósea, entre 0,01 y 0,005% del total de células, y fundamentalmente por no existir una metodología adecuada para ello. Sin embargo, el gran desarrollo en el campo de la inmunología, produciendo anticuerpos monoclonales específicos para estas células ha permitido el aislamiento de estas poblaciones.

En este sentido, una de las aportaciones más importantes ha sido la descripción de antígenos asociados a progenitores hematopoyéticos, específicamente el CD34 en el hombre (Civin y col., 1984; Satterhwaite y col., 1992; Simmons y col., 1992), el Sca-1 y c-kit en el ratón (Spangrude y col., 1988). Estos hallazgos permitieron la producción de anticuerpos monoclonales específicos en estas especies. En la especie canina, la descripción del antígeno CD34 se ha realizado en los últimos años por McSweeney y col (1998), y el correspondiente anticuerpo monoclonal apenas lleva comercializado cuatro años.

El antígeno CD34 es una glicoproteína integral de membrana, de 90-120 kD, que regula la adhesión de las células madre hematopoyéticas al estroma (Civin y col., 1984; Satterhwaite y col., 1992; Sutherland y Keating, 1992; Healy y col., 1995; McSweeney y col., 1996; Mayani y col., 2003). La expresión del antígeno CD34 en células hematopoyéticas está regulada durante el proceso de diferenciación, perdiéndose a lo largo de este.

Es bien conocido que la población de células CD34+ representa una población heterogénea que incluye una amplia variedad de células. El clon de

células CD34+ más primitivas se caracteriza por la ausencia o baja expresión de marcadores de diferenciación, como CD38, CD33, CD45RA (Bruger, 1993; Engelhardt y col., 2002; Szilvassy, 2003). Las células madre hematopoyéticas, expresan una P-glicoproteína que actúa como una bomba transmembrana capaz de mediar el flujo de colorantes vitales como Rodamina-123 (Rh-123) en sus mitocondrias. Las células más inmaduras se caracterizan por presentar una baja intensidad de fluorescencia con la Rh-123, mientras que las más maduras presentan una alta intensidad de fluorescencia. Esta población celular con baja intensidad aparece tanto en el ratón (Bertoncello y col., 1985; Mulder y Visser, 1987), como en humano (Udomsakdi y col., 1991; Uchida y col., 1996; Liu y Verfaillie, 2002), y en el perro (Niemeyer y col., 2001).

Una aportación más reciente al aislamiento y estudio de progenitores hematopoyéticos ha sido la descripción del antígeno de superficie CD133 en células humanas, (Falzetti y col., 2002; Forraz y col., 2004; Lang y col., 2004).

Por otro lado, la descripción de antígenos que se expresan en células que han entrado en el proceso de diferenciación hacia un linaje celular concreto, ha permitido, mediante sus correspondientes anticuerpos, y haciendo uso de técnicas de inmunoselección negativa, la discriminación de estas poblaciones celulares, permitiendo un gran avance en el proceso de purificación de células hematopoyéticas (Neuner y col., 1997; Astori y col., 2001; Niemeyer y col., 2001; Flores-Guzmán y col., 2002; Forraz y col., 2004).

Dentro del compartimiento de progenitores comprometidos se engloban las células que ya están definidas hacia uno o dos linajes de diferenciación. En este compartimiento se encuentran los progenitores megacariocíticos, Meg-CFC (Levin, 1983; Chatelain y col., 1988), los progenitores granulo-macrofágicos, GM-CFC (Bradley y Metcalf, 1966), y los progenitores eritroides, BFU-E (Axelrad y col., 1973; Gregory, 1976). Estos progenitores expresan antígenos específicos de sus linajes respectivos (Astori y col., 2001; Mason y col., 2001;

Mayani y col., 2003) y se caracterizan por poseer una capacidad de auto-mantenimiento baja, pero un gran potencial proliferativo.

### **I.1.2. Células maduras: el neutrófilo.**

Dentro de este grupo se encuentran englobadas hasta el 95% del total de las células hematopoyéticas. Las células maduras se caracterizan por ser morfológicamente reconocibles y no presentar potencial de auto-mantenimiento (Metcalf y Moore, 1971).

Como ejemplo de célula madura se encuentran los neutrófilos, que son los encargados de los mecanismos de defensa inespecíficos mediante su activación frente a estímulos quimio-tácticos (McEver y Cummings, 1997; Moore y col., 1995; Ward, 1999; Witko-Sarat y col., 2000). Estas células tienen un tiempo máximo de supervivencia en el torrente sanguíneo de entre 6 y 8 horas para neutrófilos humanos y entre 5,5 y 7,6 horas para neutrófilos caninos (Deubeleiss y col., 1975), se encuentran, por tanto, en continua renovación siendo un buen reflejo de la funcionalidad de las células madre hematopoyéticas y la hematopoyesis.

Los granulocitos neutrófilos son glóbulos blancos que se forman durante el proceso de la granulopoyésis (Elghetany, 2002). Este proceso comienza a partir de las células madre hematopoyéticas que se van diferenciando hacia progenitores granulomacrofágicos, y siguen una línea de diferenciación hasta la formación del granulocito maduro.

Durante este proceso de diferenciación, se van formando en el interior de los neutrófilos una serie de gránulos imprescindibles para cumplir su función (Borregaard y Cowland, 1997); gránulos primarios o azurófilos (Fouret y col., 1989; Egesten y col., 1994), secundarios o específicos, terciarios o de gelatina y las vesículas secretoras. Estos gránulos contienen en su interior lisozimas,

metaloproteinasas, proteinasas, (Weiss y Peppin, 1986; Weersink y col., 1993; Elsbach, 1998; Shapiro, 1998; Owen y Campbell, 1999; Witko-Sarat y col., 2000) responsables de los mecanismos no oxidativos que son fundamentales para la destrucción de los tejidos en los procesos de inflamación.

Su capacidad para atravesar las distintas barreras biológicas y llegar al foco de infección se debe a las metaloproteinasas (MMPs) (Sánchez-López y col., 1988; Wilhelm y col., 1989; Middelhoven y col., 1997), las cuales poseen un papel fundamental en la degradación de la matriz. Estas enzimas se encuentran en forma latente dentro de los gránulos de gelatina, de tal manera que cuando los neutrófilos son activados, las enzimas pasan a su forma activa. La presencia de estas MMPs, en concreto la MMP-9, puede ser utilizada para detectar posibles alteraciones en el proceso de maduración del neutrófilo (Borregaard y col., 1995; Bu y Purmotabbed, 1995; Makowski y Ramsby, 1996; Pugin y col., 1999; Ries y col., 1999; Lindsey y col., 2001).

Otra de las características principales de estas células es su capacidad de reducir el oxígeno enzimáticamente gracias al sistema de la NADPH-oxidasa, produciendo anión superóxido  $O_2^-$  y otras especies reactivas de oxígeno (ROS). El proceso de formación de estas especies se conoce como “explosión respiratoria” (Babior, 1984; Nathan, 1987). La capacidad para producir este anión superóxido es un índice de funcionalidad de los neutrófilos maduros, por lo que se han desarrollado diversas metodologías para su detección. Entre ellas, una de las más empleadas en estos momentos, es la utilización de la dihidrorodamina (DHR), derivado no fluorescente de la Rh-123. El anión superóxido producido por la oxidasa es metabolizado a peróxido de hidrógeno, siendo este el responsable de la oxidación de la DHR a Rh-123, que puede ser analizada por citometría de flujo (Lieberman y col., 1996; Richardson y col., 1998; Eeden y col., 1999; Bassøe y col., 2000).

En el proceso de diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas se producen cambios en la expresión de sus antígenos de superficie. Las moléculas de CD15 consisten en un grupo de carbohidratos fucosilados que constituyen el antígeno reconocido por las selectinas del endotelio (Ohana-Malka y col., 2003). Este marcador celular se expresa en la membrana de neutrófilos desde el estadio de pro-mielocito a célula madura (Elghetany, 2002), y juega un papel fundamental, al unirse a las células endoteliales, y producir incrementos en la expresión de las  $\beta 2$  integrinas (CD11a/CD18) (Berman y Muller, 1995; Pellegatta y col., 1998; Witko-Sarat y col., 2000; Elghetany, 2002), lo que facilita la migración transendotelial de los neutrófilos para alcanzar el foco de inflamación. (Fischer y col., 1983; Anderson y col., 1984; Steeber y col., 1997; Yago y col., 1999).

## I.2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA HEMATOPOYESIS

Se han descrito un gran número de ensayos *in vivo* e *in vitro* que han servido para caracterizar progenitores hematopoyéticos.

Los primeros ensayos *in vivo* fueron realizados, en el ratón, en los años sesenta por Till y McCulloch, estos ensayos se consideran como los primeros trasplantes de médula ósea. Las células inyectadas, a un animal sinérgico previa irradiación para eliminar la hematopoyesis endógena, anidan en el bazo del receptor donde proliferan y dan lugar a colonias macroscópicas de células mieloides y eritroides. Durante muchos años se ha considerado a la unidad formadora de colonias en bazo (CFU-S), como representante de la célula madre hematopoyética (Till y McCulloch, 1961; McCulloch, 1980).

En humanos y grandes animales, la capacidad de repoblación de las células madre hematopoyéticas esta siendo estudiada mediante modelos xenogénicos de ratones inmunodeficientes, NOD/SCID (Shultz col., 1995, Laroche y col., 1996; Barquinero y col., 2000; Güenechea y col., 2000). Otros modelos de ratones utilizados han sido los SCID (Bosma y col., 1983) y los BXH (Andriole y col., 1985).

Como equivalente a los experimentos *in vivo*, en los últimos años se han utilizado ensayos *in vitro* que identifican a la población de células madre. Entre ellos, cabe destacar el de células iniciadoras de cultivos de larga duración (LTC-IC) (Lemieux y col., 1995), y el de células formadoras de áreas *cobblestone* (CAFC) (Craddock, 2000). Ploemacher y col., (1989) relacionan las LTC-IC con las LTIC (long term repopulation cells) de los ensayos *in vivo*.

Por otro lado, los cultivos de larga duración de médula ósea, LTBMFC descritos por Dexter, reproducen *in vitro* la hematopoyesis. Estos cultivos han demostrado ser un elemento crucial para definir la importancia de las células del estroma, y se han utilizado, para mostrar el valor de las interacciones entre células hematopoyéticas y estroma (Dexter y col., 1977; Kodoma y col., 1984; Spooner y col., 1986; Whitlock y col., 1987; Roberts y col., 1988; Itoh y col., 1989). Este sistema ha servido para el estudio de la capacidad que tienen las células precursoras para anidar "*in vitro* homing" (Frimberger y col., 2001). Las células madre en presencia de estroma pueden auto-mantenerse y conservar su pluripotencialidad (Fraser y col., 1992).

Los ensayos *in vitro*, de progenitores comprometidos se vienen realizando tanto en la especie humana como murina desde los años sesenta. En la especie canina estos ensayos se iniciaron a finales del los setenta (Porvaznik y MacVittie, 1979). Estas células pueden estimularse *in vitro* mediante factores de crecimiento hematopoyéticos, dando lugar a colonias de células diferenciadas. Las colonias compuestas de granulocitos y macrófagos GM-CFC (Bradley y

Metcalf, 1966), junto con las de células eritroides BFU-E (Axelrad y col., 1973, Gregory, 1976), y megacariocitos Meg-CFC (Metcalf y col., 1975), son en estos momentos herramientas fundamentales para el estudio y caracterización de poblaciones hematopoyéticas (Niemeyer y col., 2001, Engelhardt y col., 2002, Mayani y col., 2003, Yan y col., 2003).

Debido a la importancia clínica de las células madre hematopoyéticas, las técnicas para su aislamiento y estudio han ido renovándose y perfeccionándose a lo largo de las últimas décadas. El gran esfuerzo para caracterizar el fenotipo de las células madre hematopoyéticas, ha supuesto un gran avance en el perfeccionamiento de las técnicas de aislamiento basadas en la selección de estas células por sus antígenos de superficie.

Actualmente las técnicas de inmunoselección magnética desarrolladas por Miltenyi Biotec (MACS®, *magnetic activated cells sorting*) y las técnicas de selección por fluorescencia (FACS, *fluorescence activated cells sorting*), están siendo ampliamente utilizadas. Estas técnicas han sido desarrolladas por importantes compañías de investigación clínica y tecnológica.

Las técnicas de inmunoselección magnética (MACS®) se basan en la unión de una microesfera metálica a las células, y estas al pasar por un imán son retenidas. De esta forma, se puede aislar una población determinada de células, selección positiva, o por el contrario purificar una población separando las células no deseadas, selección negativa. Esta metodología permite una muy buena recuperación celular, sin por ello, disminuir la pureza de las poblaciones aisladas, que pueden ser de hasta el 96%. Esta metodología es rápida, y de gran reproducibilidad (Wynter y col., 1995).

Para el aislamiento de las células por FACS, es necesario unir a la célula diana, además del anticuerpo de elección, un fluorocromo, que permite su identificación por fluorescencia, y su aislamiento en base a esta. En algunos



casos, se pueden separar dos poblaciones marcadas con el mismo fluorocromo, pero que emiten con distinta intensidad. La selección por fluorescencia permite una gran pureza de las poblaciones aisladas, aunque esta metodología requiere gran cantidad de tiempo y es costosa.

### I.3. UTILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS EN CLINICA

El aislamiento y caracterización de las células madre hematopoyéticas constituye un área de investigación en la que se están centrando gran número de estudios en los últimos treinta años. Las investigaciones sobre la célula madre buscan, en última instancia, una terapia más eficaz para las enfermedades de la sangre y del sistema inmune (Golde, 1991).

Sin embargo, para apreciar la importancia de estas células en la clínica, hay que remontarse hasta finales de los años sesenta y mediados de los setenta, cuando se comenzaron los primeros ensayos de trasplantes de médula ósea en clínica humana. Desde entonces, los avances producidos en este campo, han progresado de tal manera, que hoy en día, se puede considerar como una terapia estándar para determinadas enfermedades (Storb, 2003).

Uno de los campos en los que se han utilizado más ampliamente las células madre hematopoyéticas ha sido en los trasplantes autólogos y alogénicos. En el trasplante autólogo (Lamana, 1996), las células madre aisladas y posteriormente transplantadas son las de un mismo individuo; como consecuencia de ello, no aparece el problema de la enfermedad injerto contra huésped (EICH), sin embargo, se pierde el efecto de injerto contra la leucemia. Para ampliar el campo de posibles beneficiarios se desarrolló el trasplante alogénico, en este caso, las células madre transplantadas proceden de un

individuo histocompatible (Kolb, 1999; Kolb y col., 1999). Debido a las diferencias en los antígenos del sistema leucocitario entre los dos individuos, uno de los posibles problemas es la aparición de la EICH (Gaspar y Thrall, 2000), aunque por otro lado se favorece el efecto de injerto contra la leucemia.

Teniendo en cuenta este efecto beneficioso, se han desarrollado, en los últimos años, los llamados “minialotransplantes”. En este tipo de trasplante, el acondicionamiento es menos agresivo para el paciente y no elimina totalmente su sistema hematopoyético, el cual coexiste inicialmente con el inóculo alogénico. Esta situación se conoce como quimerismo hematopoyético mixto, este quimerismo favorece a su vez, el efecto de injerto contra leucemia. La utilización de estos minialotransplantes supone una gran ampliación en el abanico de pacientes susceptibles de beneficiarse del trasplante de médula ósea (Diez Martín, 2000).

Otro gran paso en la utilización clínica de las células madre hematopoyéticas, ha sido la descripción de evidencias indicando, que las células madre adultas no solo son capaces de regenerar el tejido al que pertenecen, sino también de dar lugar a células de otros tejidos diferentes derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias. La plasticidad de estas células permitiría su utilización para el desarrollo de terapias regenerativas. Esta posibilidad abre el camino a la transferencia de genes de interés a células madre hematopoyéticas, y su posterior diferenciación hacia el tejido diana dañado. Hoy en día, esta es una de las áreas de investigación en Biomedicina más prometedora para el tratamiento de enfermedades incurables (Keller, 2002; Lemischka, 2002; Verfaillie, 2002).

Por otra parte, las promesas clínicas basadas en terapias con células madre embrionarias abren inmensas esperanzas para la curación de enfermedades crónicas humanas. Sin embargo, la utilización de estas células con fines terapéuticos es todavía prematura. Tanto en su mantenimiento, como

en su diferenciación hacia la obtención de los distintos tejidos, pueden sufrir transformaciones malignas. Por lo tanto, es fundamental un seguimiento científico exhaustivo de su comportamiento, previo a su utilización con fines terapéuticos, que permita solventar problemas de seguridad y eficacia.

#### I.4. EL PERRO COMO MODELO PRECLÍNICO

Entre los años sesenta y setenta, se comenzó la utilización del perro como modelo preclínico para estudios de trasplantes alogénicos de médula ósea y reconocimiento de individuos histocompatibles (Storb y Thomas, 1972). Desde entonces, ha sido una herramienta fundamental en el desarrollo de nuevas estrategias en este tipo de trasplantes (Ladiges y col., 1990; Kolb y col., 1999; Niemeyer y col., 2001; Storb, 2003). Principalmente, el perro ha permitido hacer un seguimiento y prevención de la EICH, uno de los grandes inconvenientes de los trasplantes alogénicos. Como es sabido, este problema se manifiesta considerablemente más violento en el hombre y grandes animales que en roedores (van Bekkum, 1967).

El quimerismo mixto en perros, después del trasplante, se observó por primera vez a finales de los años sesenta. Este quimerismo mixto ha servido, a su vez, como base para el desarrollo de tratamientos de inmunoterapia adoptiva con infusiones retardadas de Linfocitos T del donante (Kolb y col., 2004).

Algunas de las ventajas más destacadas en la utilización del perro como modelo preclínico de grandes animales son:

- El perro es una especie muy manejable que permite el seguimiento del trasplante, mediante biopsias, muestras de sangre y otros análisis, a lo largo de varios años.

- Posee una gran diversidad genética, solo comparable a humanos (Morell, 1997).
- Es una especie que permite hacer un seguimiento de los antecedentes genéticos, para buscar familiares y hermanos con DLA idéntico, como posibles donantes.
- Probablemente, la fisiología de las células madre caninas es muy semejante a la humana en lo que respecta a la tasa de renovación y capacidad de reconstitución (Wagner y Strob, 1996).

## I.5. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

### **I.5.1. Terapia génica**

La terapia génica tiene como propósito la sustitución de los genes causantes de enfermedades por otros que sean funcionales, siendo esencial que su integración sea estable y segura.

El hallazgo de la base molecular de gran parte de los trastornos hematopoyéticos hereditarios, hace que en patologías del sistema hematopoyético, las células madre sean una diana excelente para la terapia génica; la capacidad de estas células para auto-mantenerse, diferenciarse y expandirse, asegura de esta manera, que los genes transferidos a una pequeña población celular puedan corregir el daño genético. De ahí, que la transducción de células del sistema hematopoyético haya sido, en los últimos tiempos, un objetivo primordial para muchos investigadores (Cavazzana-Calvo y col., 2000; Goerner y col., 2001; Kühlcke y col., 2002; Li y col., 2003; Barquinero y col., 2004; Kiem y col., 2004).

Además de estas ventajas, la transducción de células madre hematopoyéticas supone una diana de fácil acceso, debido al gran número de

técnicas desarrolladas, en las últimas décadas, para su obtención y aislamiento. Los actuales estudios de terapia génica abordan el aislamiento y manejo *in vitro* de las células madre transducidas, el estudio de la funcionalidad de su progenie, así como la estabilidad y nivel de persistencia del transgen dentro de las mismas (Kleim y Baum, 2004; Bueren y col., 2003).

El desarrollo de la transferencia génica se ha sustentado, fundamentalmente, en estudios realizados en la especie murina, en la que se han descrito muy altos porcentajes de transducción de células madre del sistema hematopoyético. Sin embargo, los estudios de transducción génica de células hematopoyéticas, en humanos y grandes animales, no están lo suficientemente perfeccionados, por lo que su utilización en clínica es todavía muy limitada (Hematti, 2003).

Como se ha comentado anteriormente, el perro ha sido utilizado como modelo para el estudio de enfermedades hematológicas, cuyos resultados han sido aplicadas a la clínica humana satisfactoriamente. Esto ha sido posible ya que gran número de enfermedades caninas tienen la misma base genética que las humanas. Sobre esta base, el estudio de la eficacia de la terapia génica en células hematopoyéticas caninas ofrece una oportunidad única en el tratamiento de este tipo de enfermedades. Por el momento, los mejores datos de transducción se han descrito utilizando lentivirus (Horn y col., 2004a), otros autores que han descrito transducción en células hematopoyéticas caninas utilizando onco-retrovirus han sido Goerner y col (1999), Goerner y col (2001) y Thomasson y col (2003).

### **I.5.2. Vectores retrovirales**

Los Retrovirus son los vectores más utilizados en terapia génica, esto se debe a su alta capacidad para introducirse en la mayoría de las células, además de que su integración en el genoma es eficiente.

La familia de los Retrovirus comprende tres grandes grupos; los onco-retrovirus, lentivirus y espumavirus. Sobre la base de su estructura genómica estos tres grupos se pueden dividir en virus simples, y virus complejos, ambos tipos contienen una serie de genes comunes en su estructura, como **gag** (codifica para las proteínas implicadas en la encapsidación y ensamblaje), **pro** (codifica para la formación de proteasa viral), **pol** (codifica para proteínas implicadas en la síntesis e integración del DNA viral), **env** (codifica para la formación de la envuelta glicoproteica) y además la señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ) (Gallego y col., 1996; Kay y col., 2001; Brenner y Malech, 2003). Los lentivirus y espumavirus son virus complejos, que expresan además de estos, una serie de genes accesorios. Sin embargo, la mayor parte de los onco-retrovirus son virus simples.

#### I.5.2.1. Onco-retrovirus

Los vectores onco-retrovirales de tipo C (Virus de la leucemia murina, MLV) han sido ampliamente descritos y utilizados a la hora de asegurarse una transferencia estable y segura en células somáticas de mamíferos. Las células madre hematopoyéticas son conocidas por su quiescencia. Sin embargo, este tipo de vectores necesita que las células diana se encuentren en fase de división, ya que para la pre-integración completa del vector es necesario atravesar la membrana nuclear y solo puede hacerse cuando esta se está fragmentando durante el proceso de mitosis. Este contratiempo ha sido superado, en parte, mediante la manipulación *ex vivo* de estas células, empleando citoquinas específicas para su expansión. Hay que recordar que, en el caso de la especie canina, ha existido un retraso, con respecto a otras especies, en la disponibilidad de citoquinas específicas. De hecho, algunas de ellas no están comercializadas.

En los últimos años, se han introducido mejoras en los estudios de transducción, tales como la utilización del fragmento CH-296 de la fibronectina

tanto en células humanas (Hananberg y col., 1996; Dao y col., 1998), como en primates no humanos (Kiem y col., 1998) y en perro (Goerner y col., 2001); la adición de citoquinas específicas para progenitores hematopoyéticos y la utilización del pseudotipo GALV (*Gibbon Ape Leukemia Virus*), como envuelta para las partículas virales (von Kalle y col., 1994), que también ha sido descrita para la especie canina (Goerner y col., 2001), han hecho progresar considerablemente la transferencia génica.

Desde los primeros estudios de terapia génica, se ha observado que el uso de citoquinas ayuda a mejorar los porcentajes de transferencia génica. En gran número de trabajos se ha descrito la importancia de la utilización de SCF, Flt-3, IL-6, IL-3, TPO, G-CSF, a la hora de transducir células madre hematopoyéticas (Abonour y col., 2000; Cavazzana-Calvo y col., 2000; Kurre y col., 2001; Aiuti y col., 2002, Thomasson y col., 2003). La combinación adecuada de estas citoquinas permite un aumento de los porcentajes de transducción en estas células, sin que por ello se vea mermada su tasa de auto-renovación (Zielske y Braum, 2004). En la actualidad, existe un gran número de combinaciones de estas citoquinas descritas como “las más adecuadas”, sin embargo, no existe consenso entre los investigadores (Horn y col., 2004b).

Por otra parte, los actuales protocolos de transducción cuentan con un periodo de pre-estimulación de entre 24 y 72 horas; en este tiempo, se mantienen las células en contacto con una combinación de citoquinas que favorece que las células entren en fase de división, lo que facilita la posterior transferencia génica a las mismas. Además de una combinación de citoquinas adecuada, es muy importante tener en cuenta que los tiempos de pre-estimulación no sean excesivamente largos para evitar su diferenciación, y que se vea, por tanto, afectada su capacidad para reconstituir el sistema a largo plazo (Tisdale y col., 1998; Berrinos y col., 2001; Horn y col., 2004b). Actualmente, los protocolos de transducción tienen una duración de uno a dos

días, resultando entre pre-estimulación y transducción una duración total de tres a cuatro días.

Uno de los puntos más importantes, para la transducción con vectores onco-retrovirales, es la unión de la envuelta viral con los receptores de la superficie de la célula diana. Esta interacción determina el rango así como el tipo de células que pueden ser transducidas por el vector.

A partir de 1983, y para evitar los graves efectos que se podían producir por el uso directo de los retrovirus en terapia génica, se diseñaron lo que hoy se conoce como líneas de células empaquetadoras (*packaging cell lines*). Las células empaquetadoras proveen al virus de las proteínas necesarias, tales como gag-pol o env, para la formación de una partícula viral funcional (Gallego y col., 1996). Una de las primeras líneas utilizadas fue la que producía la envuelta basada en el virus de la leucemia murina (MLV). De hecho, hasta principios de los años noventa, la mayoría de los estudios de transducción de células de mamíferos se realizaba con vectores onco-retrovirales que llevaban la envuelta “anfotrópica” de MLV (Miller y col., 1986; Schuening y col., 1991; Barquinero y col., 2004). Esta envuelta se une selectivamente a los receptores Pit-2, proteína transportadora dependiente de sodio, que se encuentra en las células hematopoyéticas humanas, murinas, caninas y de primates no humanos.

Sin embargo, una buena transducción requiere una alta expresión de los receptores de la envuelta viral en las células diana. Por lo tanto, la baja expresión del receptor Pit-2 en células hematopoyéticas, ha sido la razón principal para la búsqueda de nuevos pseudotipos (Brenner y Malech, 2003; Horn y col., 2004b). Una línea empaquetadora alternativa es PG13, que expresa las proteínas necesarias para la formación de la envuelta GALV. Se está utilizando esta envuelta mayoritariamente debido a los prometedores resultados obtenidos en células humanas (Barquinero y col., 2000), caninas (Thomasson y col., 2003), y de primates no humanos (Horn y col., 2002).



Además, estudios en perro y primates no humanos han demostrado que el uso de la envuelta GALV, favorece la transducción de células hematopoyéticas. Esta afirmación se basa en la observación de que el Receptor Pit-1 para GALV se expresa en mayor número, que el Receptor Pit-2 “anfotrópico”, en las células CD34+ (Kanavanaugh, 1994; Goerner y col., 2001). Otra envuelta con la que se han obtenido resultados prometedores es la envuelta RD114, envuelta del virus de la leucemia felina (Goerner y col., 2001; Nelly y col., 2001).

El fragmento CH-296 de la fibronectina favorece la unión de las partículas virales con las células diana. Diferentes trabajos, han descrito una importante mejora en cuanto al porcentaje de células transducidas usando fibronectina (Dao y col., 1998; Hanazono y col., 2001), en comparación con otros métodos utilizados hasta el momento como cocultivo o BSA (Kiem y col., 1998; Goerner y col., 1999). Además de esta mejora en los porcentajes de células transducidas, se ha descrito un aumento de la estabilidad del transgen en dichas células. Esta estabilidad se ha observado a corto plazo, una vez finalizados los ciclos de transducción, a través de PCR o cultivos clonogénicos, y a largo plazo, mediante el análisis de células transplantadas en ratones NOD/SCID (Barquinero y col., 2000; Güenechea y col., 2000).

#### 1.5.2.2. Lentivirus

Los vectores lentivirales derivan del virus de inmunodeficiencia humana (SIDA), y se caracterizan por su capacidad de infectar células quiescentes; por este motivo, se están llevando a cabo estudios con este tipo de vectores para transducir células madre hematopoyéticas. En este sentido, se han publicado transducciones con alto grado de eficacia en células hematopoyéticas humanas de médula ósea y cordón, determinadas mediante un seguimiento de estas células en ratones NOD/SCID transplantados (Guillermo y col., 2000).

Otra de las características de estos vectores es la eficacia de la preintegración del vector, lo que hace que los tiempos de integración se reduzcan, evitando la necesidad de largos periodos de contacto entre las partículas virales y las células diana. Esto evita que disminuya la capacidad de las células para regenerar el sistema hematopoyético (Horn y col., 2004b). En la especie canina se han referido protocolos de transducción de 18 horas (Horn y col., 2004a), y en células humanas esta fase se ha llegado a reducir a 5 horas (Miyoshi y col., 1999).

Por último, comentaremos algunas de las consideraciones que han de tenerse en cuenta a la hora de realizar experimentos de transducción.

- En cuanto a la expresión génica, hay que tener en cuenta el número de partículas virales por volumen de sobrenadante, es decir el título viral. Cuanto mayor sea el número de proteínas virales que las células empaquetadoras pueden producir mayor será el título viral. Es importante por tanto, que las células empaquetadoras tengan una buena expresión de estas proteínas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que alguna de las proteínas virales pueden ser citotóxicas, para la célula empaquetadora. Así mismo, en la construcción del vector, es importante elegir bien el tipo de promotor, ya que de esta elección dependerá la expresión del gen de interés, tanto en células empaquetadoras, como en células diana. La capacidad del promotor puede variar según la naturaleza de las células. Además, se debe extremar la precaución para que, durante la formación del vector, las secuencias de regulación no se vean afectadas (Hu y Pathahk, 2000).

- Para mejorar las interacciones receptor-envuelta, se han diseñado pseudo-tipos, esto quiere decir que se han utilizado distintas células "helper" para dar lugar a una línea empaquetadora que reúna unas características determinadas para el tipo de célula diana. Cada una de las células "helper" produce una de

las proteínas virales, **gag**, **pro**, **pol** o **env** que se ensamblan para formar el vector. Otra mejora, consiste en aumentar los títulos virales, por concentración de partículas u otros métodos físicos. Es importante tener en cuenta que hay ocasiones en las que al aumentar el título viral, desciende la capacidad de infección (Hu y Pathahk, 2000).

- Hablar de bio-seguridad, es hablar de la estabilidad en la expresión de los vectores y control de los sitios de inserción previstos. Es muy importante a la hora de usar este tipo de vectores, evitar que se de una replicación de los componentes virales por recombinación; para ello las células empaquetadoras han tenido que ser modificadas, así como los vectores, reduciendo las homologías entre ambos y evitando así la posibilidad de recombinación (Brenner y Malech, 2003). El desarrollo de leucemias acontecido en niños tratados frente a la inmunodeficiencia adquirida (Hacein-Bey-Abina y col., 2003), pone de manifiesto que, la mutagénesis por inserción es uno de los principales problemas en la aplicación de la terapia génica. La prevención y control de los sitios de inserción del transgen es uno de los problemas más acuciantes, dada su difícil determinación a la hora de utilizar tratamientos de terapia génica. Otro factor a tener en cuenta es el número de copias provirales por célula diana, ya que al aumentar el numero de estas, aumenta el riesgo de mutagénesis por inserción.

## **II. OBJETIVOS**

El contexto global de las investigaciones de nuestro grupo en los últimos años, consiste en elaborar un protocolo de inmunoterapia adoptiva para la leucemia aguda mieloblástica (LAM), utilizando al perro como modelo preclínico.

La transformación previa del receptor de un trasplante de médula ósea en una quimera es un requisito imprescindible para el éxito de este tipo de terapia celular. Por otro lado, los estudios de transducción de células hematopoyéticas humanas no están lo suficientemente perfeccionados como para su aplicación en protocolos de terapia génica, por lo que su optimización en grandes animales, sería de gran utilidad con fines terapéuticos.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo concreto de esta memoria consistirá en la transferencia génica, a una población de progenitores hematopoyéticos caninos, de un gen marcador, en nuestro caso el gen responsable de la expresión de la proteína verde fluorescente, GFP. Para alcanzar este objetivo se han abordado diversas aproximaciones experimentales compendiadas en los siguientes objetivos parciales.

- \* Aislamiento, caracterización e identificación de una población enriquecida en progenitores hematopoyéticos caninos.
  
- \* Evaluación de la capacidad de la población enriquecida, para anidar, proliferar y diferenciarse; poniendo una atención especial en los estudios de funcionalidad de la progenie proveniente.
  
- \* Por último, se optimizarán las condiciones previas y se ensayarán diferentes protocolos de transferencia génica hasta conseguir un porcentaje idóneo de células transducidas que nos permita, en posteriores estudios, el seguimiento del quimerismo y el abordaje de patologías mediante terapia génica.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### III.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### **III.1.1. Animales de experimentación**

Los animales utilizados fueron perros (*canis familiaris*) de la raza Beagle (hembras castradas de entre 2 y 5 años de edad). Para la obtención de muestras se emplearon métodos paliativos, de forma que la extracción de médula ósea se realizó bajo anestesia general, aplicando una inyección intravenosa de medetomidina (18 µg/kg) y diazepam (0,4 mg/kg). Las muestras de médula ósea se recogieron en jeringas estériles con heparina 5% (1 ml/10 ml de muestra). Las extracciones se realizaron mediante punción-aspiración en la cresta ilíaca con una aguja Rosenthal (16 g x 35 mm). Para evitar que los animales sufrieran estrés, debido a las donaciones, estas se realizaron cada 5 ó 6 semanas.

Las extracciones se llevaron a cabo en la UCI para pequeños animales del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. La colonia de Beagles, utilizada como donantes de médula ósea, se dispuso en cheniles de (2 m de ancho x 4 m de largo) con disposición de agua *ad libitum*. Esta colonia de Beagles estuvo bajo estricto control de su estado de salud, mediante examen físico, hemograma y perfil bioquímico sanguíneo.

Los animales fueron tratados de acuerdo con la normativa legal vigente (Real Decreto 223/1988 y Orden del 13 de Octubre de 1989), sobre protección de los animales utilizados para experimentación.

#### **III.1.2. Líneas celulares**

**HeLa.** (Chen TR, Cell. Genet; 1988). Esta línea celular proviene del adenocarcinoma de las células epiteliales del cuello del útero humano. El medio de cultivo utilizado fue DMEN enriquecido con 10% FBS, 1% de L-glutamina,

1% de penicilina/estreptomicina (60U/ml y 60µg/ml) y 0,4% de tylosina. Esta línea celular se utilizó para titular el sobrenadante retroviral.

**Pg-MEG-5ab:** Línea empaquetadora que fue amablemente cedida por el Dr. José Antonio Casado Olea y desarrollada por el Dr. Helmut Hanenberg (Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Neurology, Heinrich-Heine University Medical Center, Dusseldorf, Alemania). Esta línea contiene el gen que expresa la proteína verde fluorescente (GFP). El medio de cultivo utilizado fue el descrito para la línea celular HeLa. El título de esta línea celular fue de  $6 \times 10^5$  partículas virales/ml. La titulación se realizó preparando 6 diluciones del sobrenadante a testar, en medio IMDM enriquecido con suero canino (SP) al 20%, penicilina y estreptomicina al 1% y glutamina al 0,5%. Se añadieron 200 µl de cada dilución a los pocillos donde se encontraban las células HeLa, y se incubaron durante 24 horas. Los resultados obtenidos se analizaron por citometría de flujo para realizar el cálculo del título viral, mediante la fórmula:

**Virus/ml = % de fluorescencia x dilución del sobrenadante x número de células x 5/100.**

#### III.1.2.1. Producción de sobrenadante viral

Las células de la línea empaquetadora, se resuspendieron en medio DMEN enriquecido como se ha descrito anteriormente, y se añadieron a botellas de (25-75 cm<sup>3</sup>), manteniéndose los cultivos a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, hasta que las células se encontraron al 90% de confluencia. Cuando los cultivos estuvieron confluentes, se realizó un cambio de medio en las botellas, sustituyendo el DMEN por IMDM enriquecido con SP al 20%, L-glutamina al 1% y tylosina al 0,4%. Se dejaron las botellas 12 horas con este medio y posteriormente se recogió el sobrenadante y se filtró con una membrana de un tamaño de poro de 0,45µm.



### III.2. MATERIAL DE LABORATORIO

La extracción de médula ósea y sangre periférica se realizó con material quirúrgico estéril. Las suspensiones y cultivos celulares se manipularon en cabina de flujo laminar vertical (mod. AV-100<sup>®</sup>, de Telstar).

Las suspensiones celulares se cuantificaron en microscopio óptico (Laborlux S<sup>®</sup>, Leitz), mediante cámara de Neubauer. Las colonias granulocíticas y eritroides se observaron y cuantificaron mediante una lupa estereoscópica (H011<sup>®</sup>, Olympus). Para la visualización de los cultivos de larga duración, se utilizó un microscopio invertido (Labovert Fs, Leitz). La cuantificación de colonias que expresaban el transgen se llevó a cabo mediante microscopio invertido de fluorescencia (Leica DC 350F<sup>®</sup>); Las fotografías digitales se realizaron con el programa de Leica IM50<sup>®</sup> versión 1.2. Las fotografías de los cultivos clonogénicos se realizaron con la cámara; Minolta X-370s.

La incubación de los cultivos celulares caninos y el crecimiento de la línea empaquetadora Pg-MEG-5ab se realizó en estufas (Napco<sup>®</sup>, modelos 7100-01<sup>®</sup> y 7100-220<sup>®</sup> de Iberlabo) con CO<sub>2</sub>, humedad y temperatura controladas de 38°C y 37°C, respectivamente. Para las incubaciones con agitación se utilizó un baño termostatzado (Tempette Junior TE-8J<sup>®</sup>, Techne).

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida, se utilizó una cubeta de electroforesis (LKB modelo SE 250<sup>®</sup>). Los geles se escanearon con el modelo hp scanjet 3500c de Hewlett Packard.

Las separaciones de las células hematopoyéticas, mediante sistemas inmunomagnéticos se realizaron utilizando el tipo de soporte VarioMACS<sup>®</sup> (Miltenyi Biotec). Se utilizaron las columnas MS<sup>®</sup> y su adaptador

correspondiente, en selección positiva. Para la selección negativa, se utilizaron las columnas LD<sup>®</sup> con su correspondiente adaptador.

Las medidas de citometría de flujo se realizaron en un citómetro FACScan<sup>®</sup> (Beckton Dickinson). Los aislamientos mediante FACS se realizaron en un Coulter EPIC ELITE-ESP<sup>®</sup> (Beckman Coulter). El análisis de los datos obtenidos en citometría de flujo y FACS se realizó utilizando el programa WinMDI 2.8. Las representaciones de estos resultados se realizaron por medio de histogramas y gráficos de puntos "Dot Pots".

Las células se centrifugaron en una centrífuga de mesa (P Selecta modelo Meditronic<sup>®</sup>); para muestras de menor tamaño se utilizó una microcentrífuga (Force 7<sup>®</sup>, Denver Instrument); para las placas de cultivo, la centrífuga utilizada fue el modelo Laborzentrifugen Sigma 3K10<sup>®</sup> de Selecta.

El mantenimiento de las muestras a -80°C se realizó en un congelador modelo U41085<sup>®</sup> -85°C ultra low freezer (New Brunswick scientific).

Las membranas para la filtración de los medios utilizados fueron suministradas por Millipore, modelos Millex<sup>®</sup>-HV (membrana PVDF de 0,45 µm) y Millex<sup>®</sup>-GS (membrana MCE de 0,22 µm). Para mayores volúmenes de medio se utilizó el modelo Stericup<sup>®</sup> GP ExpressPLUS con membrana de 0,22 µm.

### III.3. PRODUCTOS UTILIZADOS

#### **III.3.1. Medios de cultivo**

El medio de cultivo IMDM pertenece a Sigma Chemical. Este medio liofilizado de composición definida, se reconstituyó al doble de su concentración (2x) y se suplementó con antibióticos (penicilina/estreptomicina) y bicarbonato sódico. Se esterilizó mediante filtración con membrana, de

tamaño de poro 0,22 $\mu$ m (Millipore) y se conservó a -20°C, la osmolaridad se ajustó a 660mOs. Antes de su utilización se diluyó 1/2 con agua desionizada estéril.

Se utilizó el medio de cultivo DMEM, comercializado por GibcoBRL®, a concentración 1x. El material de plástico usado para los cultivos fue de NUNC.

El suero fetal bovino empleado (FBS), fue suministrado por GibcoBRL®; previa utilización, se inactivó en baño de agua a 56°C durante 30 minutos.

### **III.3.2. Productos químicos**

Parte de los productos utilizados, como EDTA, Tripsina, gelatina de cerdo, PMA, DMSO, hemisuccinato de hidrocortisona (HC), Gentamicina y Tylosina, fueron suministrados por los laboratorios de Sigma Chemical.

Otros productos usados en este trabajo han sido: L-glutamina (Flow laboratories), PBS (GibcoBRL®), Tris-hidroximetil aminometano de (Panreac), Acrilamida/Bisacrilamida (Bio-Rad), Agar (Difco), tampón de disociación (GibcoBRL®), Ficoll-Paque™ (Amersham Pharmacia Biotech), Líquido de Turk (Panreac), colorante Azul de Tripán (Biochrom) y Retronectina™ (Takara).

### **III.3.3. Citoquinas**

Los factores de crecimiento utilizados fueron: factor estimulante de células madre humano (hSCF), factor estimulante de colonias granulomacrofágicas humano (hGM-CSF), Interleuquina 6 humana (hIL-6), Ligando Flt-3 humano (hFlt-3) y Trombopoyetina k humana (hTPO); todos estos factores liofilizados fueron provistos por (Biosource International). La eritropoyetina humana (hEPO) fue de Roche Diagnostics. Los factores de crecimiento caninos; factor estimulante de células madre (cSCF) y factor estimulante de colonias granulocíticas (cG-CSF) fueron cedidos por AMGEN, gracias a un acuerdo de transferencia de material firmado con esta empresa.

### III.3.4. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron los siguientes: el anticuerpo comercial 1H6 (ratón anti-**CD34** canino) comercializado por Beckton Dickinson; el anticuerpo monoclonal (sobrenadante de hibridoma) 6C9 (IgG2a rata anti-**CD34** canino). Este anticuerpo fue producido en rata contra células de la línea ML3 humana y analizado por PCR utilizando los “primers” descritos por McSweeney y col., (1996). Para la obtención de la población Lin<sup>-</sup> se utilizó, una combinación de anticuerpos monoclonales (sobrenadantes de hibridoma), que marcaban distintos tipos de células comprometidas. Estos anticuerpos fueron: Dog 13 (IgG2a rata anti-**Thy-1** canino), Dog 15 (IgG2a rata anti-**CD15** canino), Dog 17 (IgG2a rata anti-**CD5** canino), Dog 22 (IgG2a rata anti-**IgG** canino), Dog 26 (IgG2a rata anti-**MHCII** canino).

Estos anticuerpos fueron desarrollados por el grupo del Prof. H.J. Kolb que dirige el Institut für Klinische Haematologie GSF de Munich (Alemania), y cedidos amablemente a nuestro grupo. Estos anticuerpos están definidos en el First Canine Leukocyte Antigen Workshop (Cobbold y Metcalf, 1994).

### III.3.5. Fluorocromos

Los fluorocromos usados en esta memoria, fueron: FITC, Isotiocianato de fluoresceína conjugado a conejo (IgG anti-rata conejo-FITC) con un espectro de excitación en verde-azul a 488 nm y el de emisión en verde a 525 nm, (Serotec). PE, Ficoeritrina con un espectro de excitación en verde-azul a 488 nm y de emisión en amarillo a 575 nm. Este fluorocromo se utilizó con diferente especificidad sobre la base de los diferentes anticuerpos primarios utilizados; por un lado se utilizó (IgG anti-**rata** conejo-PE) de Serotec y por otro (IgG anti-**ratón** F(ab')-burro-PE) desarrollado por Jackson ImmunoResearch.

La discriminación de células muertas por citometría de flujo se llevo a cabo mediante el marcaje con Ioduro de Propidio (IP), capaz de introducirse en el DNA de células muertas y emitir a una longitud de onda de 620 nm (Sigma Chemical).

La Rodamina-123 (Sigma Chemical) (Rh-123) es un catión lipofílico que es retenido selectivamente por la membrana mitocondrial, se utilizó como indicador de la actividad celular. Emite fluorescencia en verde a 529 nm, y es excitado a 488 nm. La Dihidrorodamina (DHR) (Sigma Chemical), es un derivado no activo de la Rh-123.

#### III.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

##### **III.4.1. Obtención de muestras de médula ósea**

Para la obtención de las suspensiones de médula ósea, se procedió como se indica en el apartado III.1.1. Una vez obtenida la médula ósea (10-20 ml), se diluyó 1/3 con PBS.

##### **III.4.2. Aislamiento de células mononucleares**

La obtención de la capa de células mononucleares se realizó por centrifugación con Ficoll-Paque™ ( $d = 1,077\text{g/cm}^3$ ) a 1290 g, durante 20 minutos y sin freno. Obteniéndose cuatro capas: Una capa superior de plasma; una capa intermedia de células mononucleares; y por debajo de esta, una capa inferior de granulocitos; al fondo quedó una capa de eritrocitos. La capa de plasma se eliminó con una pipeta pasteur estéril. La capa de células mononucleares se recogió, mediante cánula estéril (0,9x25 mm, 22Gx1") y se descartó el resto de las fracciones. Las células se lavaron con solución salina (SS) y FBS al 20% y se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Las células

obtenidas fueron resuspendidas en medio IMDM o tampón de MACS según se fuera a proceder.

Posteriormente al proceso de obtención, se cuantificó la viabilidad de estas células con Azul Tripan, y se hizo un recuento entre 150-200 células. La viabilidad obtenida en todos los casos superó el 90%.

### **III.4.3. Obtención de muestras de sangre periférica**

Las muestras de sangre se obtuvieron por venipunción en la yugular, recogiendo en tubos de heparina-litio o por sistema de extracción al vacío (Vacutainer), dependiendo del procedimiento a seguir, obtención de granulocitos o suero, respectivamente.

#### III.4.3.1. Aislamiento de granulocitos de sangre periférica

La sangre periférica obtenida en tubos de heparina-litio, se diluyó al 50% con PBS. La separación de granulocitos se realizó mediante gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque™ ( $d = 1,077 \text{ g/cm}^3$ ). Las muestras se centrifugaron a 1290g durante 20 minutos y sin freno. Se obtuvieron 4 capas, como se describe en el apartado III.4.2; en este caso se recogió la capa de granulocitos, mediante pipeta pasteur estéril, evitando en la medida de lo posible, la contaminación con eritrocitos. Los neutrófilos se lavaron con SS y FBS al 20% y se centrifugaron durante 10 minutos a 400 g.

Una vez resuspendidos los granulocitos en 200 $\mu$ l de SS, se eliminaron los eritrocitos contaminantes, mediante lisis hipotónica, con agua destilada estéril (20s) y se reconstituyó la isotonicidad con NaCl al 3,5%.

Las células se lavaron una segunda vez, y se centrifugaron 10 minutos a 400g; en el caso de que los granulocitos continuasen contaminados con la hemoglobina liberada, se repitió este paso. Finalmente se resuspendieron en

PBS. Las células obtenidas fueron identificadas con una tinción de May-Grunwald Giemsa.

#### III.4.3.2. Obtención del suero canino

El SP fue obtenido a partir de nuestra colonia de beagles. La sangre se extrajo mediante venipunción, recogándose en tubos vacutainer sin heparinizar. Estos tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación se centrifugaron a 1400 g durante 15 minutos, para separar el coágulo sanguíneo del suero. El suero se recogió con pipeta pasteur estéril en cabina de flujo laminar vertical. Antes de su utilización, este suero se inactivó, manteniéndose a 56 °C durante 30 minutos.

### III.5. TÉCNICAS

#### **III.5.1. Cultivos de progenitores hematopoyéticos**

La presencia de progenitores hematopoyéticos (CFC) se estudió en las siguientes poblaciones celulares: células mononucleares, células CD34+, células Lin-, células Lin+, células Lin- transducidas, células adherentes de LTBMCM, células Lin-/Rh123<sup>baja</sup>, células Thy-1+ y células MHCII+. El número de células utilizado en los ensayos varió entre  $5 \times 10^4$ - $2 \times 10^5$  células/ml, dependiendo del tipo de células usadas en el cultivo. Todas las suspensiones celulares se prepararon en IMDM.

Los cultivos se realizaron en matriz semisólida de agar. El medio de cultivo IMDM, fue enriquecido con SP al 20%, y L-glutamina 1,4mM. A este medio enriquecido se añadió la suspensión celular y distintas citoquinas como fuente estimuladora. La concentración utilizada fue de 100 ng/ml para: hGM-CSF, hSCF, hIL-6, hFlt-3, hTPO, cG-CSF y cSCF, y de 1 U/ml para hEPO. Las

combinaciones de citoquinas utilizadas dependieron del tipo celular y han sido descritas en los correspondientes apartados de resultados.

Finalmente se adicionó el agar (0,3% de concentración final), y la mezcla se repartió en tres pocillos por ensayo, añadiéndose 0,3 ml/pocillo, en placas de 24 pocillos. Los pocillos restantes se rellenaron de agua, evitando así que el agar se secase. Con el fin de facilitar la gelificación del agar, las placas se mantuvieron a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente los cultivos se incubaron a 38°C, con 5% de CO<sub>2</sub>.

Entre los 9-11 días siguientes se contaron las colonias granulomacrofágicas y eritroides, considerándose como tales sólo aquellas agrupaciones que contaban con más de 50 células. Las LTC-IC y las CFC de células Lin-/Rh123<sup>baja</sup> se contaron entre los 14-16 días. En todos los casos, el número de colonias obtenido se expresó en CFCs/10<sup>5</sup> células.

### **III.5.2. Técnicas inmunomagnéticas**

Se utilizó la metodología desarrollada por Miltenyi Biotec (MACS®) para la separación inmunomagnética de las células madre y progenitores hematopoyéticos, usando tanto la selección positiva como la negativa.

Para los dos tipos de aislamiento, se utilizó el modelo de soporte Vario MACS® (Fig.III.1). Este modelo consta de un potente imán sobre una base de metacrilato, al que pueden acoplarse diferentes tipos de adaptadores. Estos adaptadores permiten el uso de diferentes tipos de columnas inmunomagnéticas.

Para todo el proceso de separación se utilizó el tampón recomendado por Miltenyi Biotec (PBS, EDTA 2mM y FBS al 5%), al que se denominó tampón de MACS.



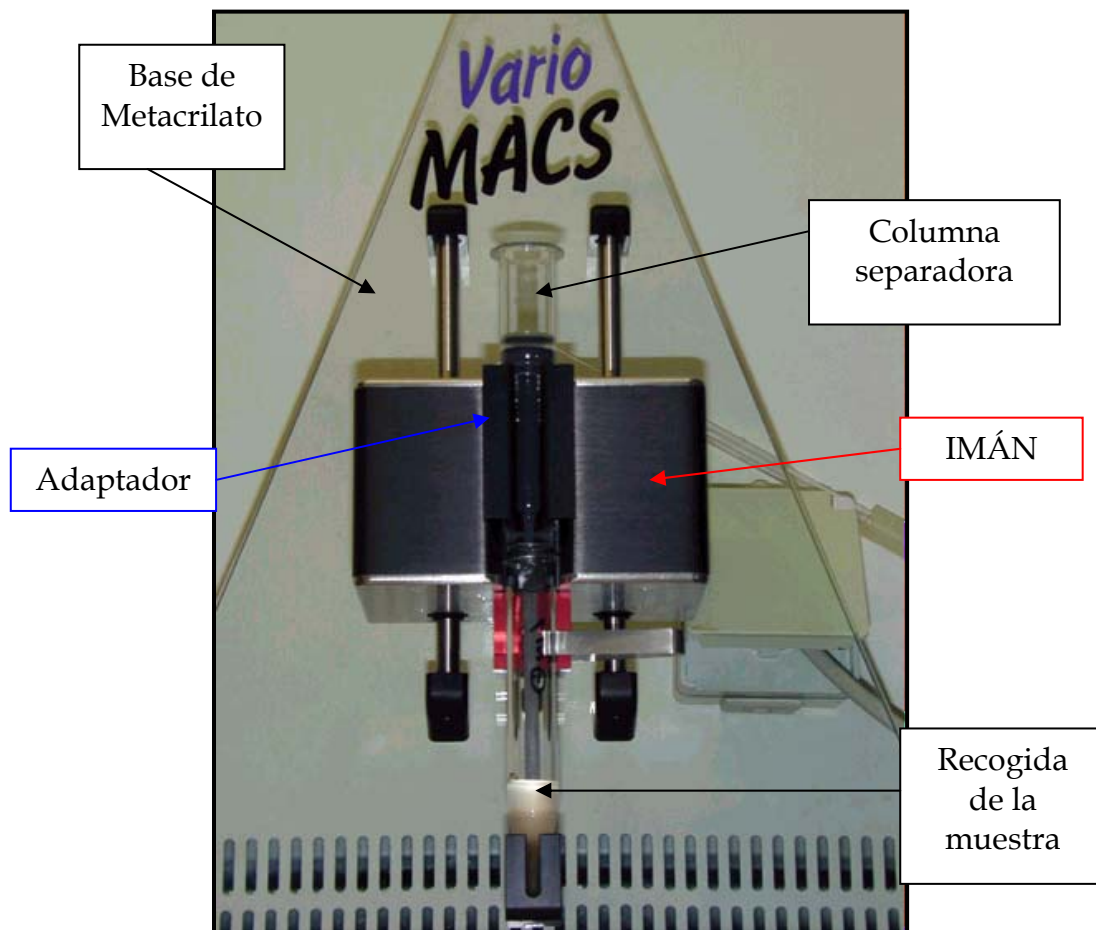


Figura. III.1. Fotografía del soporte Vario MACS utilizado para la selección positiva y negativa, se señalan en la fotografía donde se encuentran los imanes, el soporte (base de metacrilato), el adaptador con la columna y el tubo de recogida de las células aisladas.

### III.5.2.1. Selección positiva

Esta técnica consiste en marcar la población que se quiere aislar con un anticuerpo monoclonal específico (anticuerpo primario), y con un anticuerpo secundario, que queda unido al primario mediante una unión específica, y que lleva acoplada una pequeña bolita metálica (microesfera), responsable de que las células marcadas queden retenidas por el imán dentro de la columna.

Para el aislamiento de células madre hematopoyéticas, se utilizó el anticuerpo monoclonal 6C9 (rata anti-CD34 canino) y el anticuerpo comercial 1H6 (ratón anti-CD34 canino).

La purificación de las células CD34<sup>+</sup> se realizó partiendo de una población de 10<sup>8</sup> de células mononucleares resuspendidas en tampón de MACS. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario 6C9 (300 µl/10<sup>8</sup> células) y con el 1H6 a 20 µg/ml (concentración recomendada por la casa comercial), durante 30 minutos a 4°C, agitando la suspensión de forma periódica.

Posteriormente se lavaron las células, añadiendo tampón MACS y se centrifugaron 10 minutos a 400 g; a continuación, se resuspendieron en 400 µl de tampón de MACS y se añadió a esta suspensión el anticuerpo secundario, (IgG microesfera anti-rata) (20 µl/10<sup>7</sup> de células totales), en el caso del 6C9 y (IgG microesfera anti-ratón) (20 µl/10<sup>7</sup> de células totales) en el caso del 1H6. Se incubó la suspensión a 4°C durante 15 minutos. Después de la incubación, se lavaron las células con tampón de MACS y se centrifugaron nuevamente 10 minutos a 400 g; finalmente se resuspendieron en 1ml de tampón de MACS.

Se utilizó el tipo de columna MS<sup>®</sup>. Antes de comenzar la separación se acondicionó esta con 500 µl de tampón de MACS. Para comenzar la purificación, se añadió la suspensión celular a la columna. Las células que no llevan acoplada la microesfera, fluyeron a través de la columna sin quedar retenidas. Se lavó la columna, añadiendo en 3 veces 1,5 ml de tampón de MACS (3x500 µl), para eliminar las células no marcadas. Esta primera fracción de células fue recogida en un tubo estéril y se denominaron células CD34<sup>-</sup>.

Para recuperar las células retenidas, se desacopló la columna del imán y se añadió 1 ml de tampón de MACS. Las células con la microesfera ya no están retenidas magnéticamente y fluyeron ayudadas por la presión realizada con un embolo. En esta fracción se encontraban las células denominadas CD34<sup>+</sup>. Las células CD34<sup>+</sup> y CD34<sup>-</sup> se lavaron y se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos y se resuspendieron en IMDM.

Posteriormente al proceso de aislamiento se realizó un recuento de las células en cámara de Neubauer y se cuantificó la viabilidad de las mismas con Azul Tripán, la viabilidad obtenida fue en todos los casos superior al 97%.

La selección positiva para Thy-1 y MHCII se realizó en las mismas condiciones descritas para el anticuerpo 6C9, con las diferencias:

- Para cada aislamiento, se partió de  $40 \times 10^6$  células.
- Se marcaron las células con 600  $\mu$ l de cada anticuerpo.

Se recogieron las fracciones Thy-1+, Thy-1-, MHCII+ y MHCII- para hacer un recuento y realizar cultivos clonogénicos.

#### III.5.2.2. Selección negativa

Este tipo de aislamiento se basa en la discriminación celular, marcando con anticuerpos monoclonales específicos, las poblaciones de células que se quieren excluir de la población celular objeto de estudio.

Se partió de una población de  $6 \times 10^7$  de células mononucleares resuspendidas en tampón de MACS. Se utilizó la combinación de anticuerpos monoclonales, específicos para antígenos caninos descritos en el apartado III.3.4. Se utilizó para el marcaje de las células 600  $\mu$ l de cada uno de los anticuerpos por cada  $6 \times 10^7$  células. Se incubaron durante 30 minutos a 4°C, agitando periódicamente la suspensión. Se lavaron las células con tampón de MACS y se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Las células fueron resuspendidas en 500  $\mu$ l de tampón de MACS y se añadió el anticuerpo secundario, 140  $\mu$ l de IgG2a microesfera anti-rata. El anticuerpo secundario se une específicamente al primario, actuando como se ha descrito para selección positiva. La incubación se realizó a 4°C durante 15 minutos. Al terminar la incubación, se lavaron las células añadiendo tampón de MACS y se centrifugaron durante 10 minutos a 400 g. Finalmente quedan resuspendidas en 1ml de tampón de MACS.

Para selección negativa se utilizó la columna LD<sup>®</sup>. Antes de comenzar la purificación, se acondicionó la columna con 2 ml de tampón de MACS. La suspensión celular se añadió a la columna. Las células no unidas a la microesfera fluyeron por gravedad y fueron recogidas en un recipiente estéril. Se lavó la columna añadiendo 2 ml de tampón de MACS en dos veces (2x1 ml). Esta primera fracción de células fue denominada Lin<sup>-</sup>, y es donde se encuentran los progenitores hematopoyéticos.

Para recuperar la fracción de células retenidas, se desacopló la columna del imán y se añadieron 3 ml de tampón de MACS. Las células fluyen, al no estar retenidas magnéticamente. Esta recuperación se mejoró, presionando con un embolo. La fracción de células fue recogida en un recipiente estéril y son las denominadas Lin<sup>+</sup>, que reúne distintos tipos de células comprometidas. Por ultimo, las dos fracciones recuperadas se lavaron, se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos, y se resuspendieron en IMDM.

Posteriormente al proceso de selección negativa, se realizó un recuento del número de células en cámara de Neubauer y se cuantificó la viabilidad de las células Lin<sup>-</sup> y Lin<sup>+</sup> con Azul Tripan. La viabilidad obtenida fue del 93%.

### **III.5.3. Análisis por citometría de flujo**

Para el análisis mediante citometría de flujo fue necesario añadir, a las células marcadas con el anticuerpo primario, un anticuerpo secundario que lleva unido un fluorocromo. Para las células marcadas con el anticuerpo 6C9 se utilizó el fluorocromo (anti-**rata** conejo-PE) y para las células marcadas con el anticuerpo 1H6 se usó (anti-**ratón** burro-PE). Para el estudio de las poblaciones Lin<sup>-</sup> y Lin<sup>+</sup>, se utilizó como fluorocromo (anti-**rata** conejo-PE). Para el estudio de los anticuerpos utilizados para selección negativa, se marcaron las células mononucleares con cada uno de los anticuerpos, y posteriormente se adicionó

el fluorocromo (anti-**rata** conejo-PE). Las células mononucleares, se marcaron en primer lugar con el anticuerpo primario, 6C9, 1H6 o la combinación utilizada en selección negativa, según el ensayo, y a continuación el fluorocromo correspondiente.

En todos los casos, después de adicionar el fluorocromo, la suspensión celular se incubó durante 15 minutos a 4 °C y en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron añadiendo PBS, y se centrifugaron 10 minutos a 400 g. Esto evita que queden restos del fluorocromo que darían un falso porcentaje de fluorescencia.

Dependiendo del número de células, éstas se resuspenden entre 300-600 µl de PBS.

Para determinar retención de Rh-123 en las células mononucleares y Lin-, se partió de una suspensión de 10<sup>6</sup> células, y se adicionó la Rh-123 (100 ng/ml de concentración final). Las células se incubaron a 38°C durante 20 minutos, en oscuridad. A continuación, se lavaron y se centrifugaron durante 5 minutos a 600 g, y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se incubaron nuevamente en las mismas condiciones. Después de la segunda incubación las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendieron entre 300-600 µl de PBS, para su análisis.

Todas las medidas de citometría de flujo se realizaron en el citómetro FACScan, y su análisis se llevó a cabo mediante el programa winMDI 2.8.

#### III.5.3.1. Separación por FACS

Este tipo de aislamiento se realizó en un citómetro de flujo con un dispositivo separador de células. Es una variante de la citometría de flujo tradicional que permite la separación física de las células analizadas (FACS).

Esta separación se basa en la división del flujo continuo, mediante vibración, en pequeñas gotas de diferentes tamaños. Se puede controlar el tamaño y frecuencia de las gotas hasta conseguir que en cada gota se encuentre una sola célula. En el momento que se forma la gota, se aplica una descarga que deja la gota con carga positiva o negativa. A la salida del flujo continuo, se encuentran unas placas cargadas, que harán que la gota se desplace hacia uno u otro lado, para recogerlas en placas de cultivo o tubos estériles.

Durante el estudio por citometría de flujo de la población de células marcadas con 6C9, apartado III.5.3, se observaron dos poblaciones con distinta intensidad de fluorescencia. La diferente intensidad de fluorescencia entre las poblaciones se utilizó como referencia para su separación por FACS.

Como en el caso anterior, durante el estudio por citometría de flujo de las células marcadas Lin-/Rh-123+, apartado III.5.3, se observaron dos poblaciones con distinta intensidad de fluorescencia. Se utilizó esta misma metodología FACS, para separar las poblaciones con baja intensidad de fluorescencia (Lin-/Rh-123<sup>baja</sup>) y alta intensidad de fluorescencia (Lin-/Rh-123<sup>alta</sup>).

En ambos procedimientos las poblaciones aisladas se recogen en tubos estériles para su posterior análisis. La separación por FACS se realizó en un Coulter, EPICS ELITE-ESP®.

#### **III.5.4. Sistemas de cultivo *in vitro***

Los ensayos *in vitro*, de cultivos de larga duración de médula ósea (LTBMC), se establecieron según el método descrito por Dexter y col., (1977) y modificado posteriormente por nosotros para médula ósea canina. (Fermín y col., 2004).

Estos cultivos se establecieron con  $8 \times 10^6$  células mononucleares, en botellas de  $25 \text{ cm}^3$  a las que se añadió 10 ml de medio IMDM, enriquecido con SP al 20% , L-glutamina 1,4 mM, gentamicina 3 mg, hemisuccinato sódico de hidrocortisona (HC) $10^{-7}$  M y penicilina/estreptomicina (60 U/ml y 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los cultivos se gasearon con una mezcla de  $\text{CO}_2/\text{O}_2/\text{N}_2$  (5/20/75)%, y se incubaron a  $38^\circ\text{C}$  y 90% de humedad.

Al cabo de la primera semana (7 días) se retira todo el medio de la botella y se añade a los cultivos  $4 \times 10^6$  de células mononucleares en 10 ml de medio IMDM fresco, enriquecido de igual forma que para el establecimiento de los cultivos. A los 14 días los cultivos se irradiaron en las condiciones descritas en el apartado III.5.4.4; se retiró el sobrenadante de la botella, y a continuación se reinocularon con  $10^6$  células de Lin- en 10 ml de medio IMDM enriquecido. A partir de los 21 días del inicio del cultivo, se comenzaron los ensayos de funcionalidad con las células maduras liberadas al sobrenadante.

En estas condiciones de cultivo hay un predominio de la diferenciación granulopoyética sobre las demás líneas celulares, por lo que las células liberadas fueron fundamentalmente granulocitos neutrófilos.

#### III.5.4.1. Obtención de las células de sobrenadante de cultivo

A partir de los 21 días del establecimiento del cultivo, en cada cambio semanal de medio, se recogieron las células presentes en el sobrenadante. Para ello, se agitaron suavemente las botellas desprendiendo las células de los nichos hematopoyéticos. Se recogió el sobrenadante con una pipeta estéril, inclinando la botella para evitar dañar el estroma. El sobrenadante se centrifugó a 400g durante 10 minutos.

Se realizó un recuento de las células obtenidas, cuantificando la viabilidad y analizando la morfología mediante la tinción de May-Grunwald Giemsa.

Una vez realizado el recuento, se procedió a realizar distintas pruebas de funcionalidad.

#### III.5.4.2. Aislamiento de granulocitos de cultivo

Para aislar los granulocitos, el sobrenadante de los cultivos se añadió a Ficoll-Paque™ y se centrifugó durante 20 minutos a 1290 g sin freno, obteniéndose tres capas, una superior con el medio, una intermedia de células mononucleares y un precipitado de granulocitos. Se recogió el precipitado, se lavó con SS y FBS al 20%, y se centrifugó 10 minutos a 400 g. Se realizó un recuento de los granulocitos obtenidos, cuantificando su viabilidad y analizando su morfología con la tinción May-Grunwald Giemsa.

Una vez realizado el recuento, los granulocitos fueron resuspendidos en diferentes medios, dependiendo de las pruebas de funcionalidad a realizar.

#### III.5.4.3. Obtención de células adherentes de cultivo

Entre los días 35-49 de cultivo, se recogieron las células adherentes. Para ello, se quitó previamente el sobrenadante de cultivo. El estroma adherido al fondo del frasco se lavó con medio IMDM, agitando suavemente la botella, se retiró el medio y se añadió 1 ml de tripsina-EDTA, suficiente para que el estroma quede cubierto, se mantuvo la botella 30 segundos a 38°C. Cuando el estroma comenzó a desprenderse de la botella, se añadió medio IMDM enriquecido con FBS al 10%, agitando con una pipeta estéril para ayudar a las células a terminar de desprenderse.



Se recogió esta suspensión y se centrifugó a 400g durante 10 minutos. Posteriormente se resuspendieron en IMDM y se realizó un recuento, y un estudio de viabilidad con Azul Tripan.

#### III.5.4.4. Irradiación de los sistemas *in vitro*

La irradiación de los cultivos de larga duración, se llevó a cabo con un equipo de rayos-X MG324 de Philips, en la instalación radiactiva IR-04 del CIEMAT, siguiendo los criterios y normas de Protección Radiológica que recoge la legislación (Reglamento sobre Instalaciones Nucleares y Radiactivas, 21/7/72; Reglamento sobre protección sanitaria contra radiaciones ionizantes 12/8/82-25/11/87).

La medida de exposición, necesaria para determinar la tasa de dosis absorbida en tejido, se realizó con el dosímetro Farmer 2570 de Nuclear Enterprises y la cámara de ionización de 0,6 cm<sup>3</sup> modelo 2571 de la misma firma. La cámara fue calibrada en el laboratorio de Nuclear Enterprises y posteriormente, en el Laboratorio Oficial de Calibración de la División de Metrología del CIEMAT, a una unidad de 100KV y capa hemirreductora de 4,03 mm Al. La estabilidad de la cámara se comprobó mensualmente, mediante una fuente de Sr90 tipo 2503/3 (Nuclear Enterprises).

Para los cultivos de larga duración las condiciones de irradiación fueron 300kV y 10mA, consiguiéndose una tasa de dosis uniforme de 86,61 rad/min, durante 17min20s

### **III.5.5. Análisis de funcionalidad de células obtenidas de LT BMC**

#### III.5.5.1. Marcaje con CD 15

Para este ensayo se partió de neutrófilos aislados de sangre periférica y de 21 y 28 días de cultivos de larga duración. Los neutrófilos se marcaron con

un anticuerpo monoclonal específico de granulocitos caninos; CD15 (Cobbold y Metcalf, 1994; Neuner y col., 1997), descrito anteriormente en el apartado III.3.4.

Una vez adicionado el anticuerpo primario, CD 15, la suspensión celular se incubó durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos. Se resuspendieron en PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo (anti-rata conejo-PE), la incubación se realizó durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos, eliminando el exceso de fluorocromo. Finalmente se resuspendieron en PBS (600-300 µl), para su análisis por citometría de flujo.

#### III.5.5.2. Zimografía

La presencia de metaloproteinasa-9 (MMP-9) existente en los gránulos de gelatinasa de neutrófilos maduros se detectó según los métodos descritos por Borregaard y col., (1995); Bu y Pourmotabbed, (1995); Makowski y Ramsby, (1996); Pugin y col., (1998) y las modificaciones realizadas por nosotros.

Los neutrófilos aislados se resuspendieron en el tampón de muestra (Tris 62,4 mM, pH 6,8; SDS al 5%, glicerol al 20% y azul de bromofenol al 0,05%). Para la electroforesis, se utilizó un gel de poliacrilamida al 10% y de gelatina de cerdo al 0,1%. Las condiciones para la electroforesis fueron de 20 mA durante una hora. Una vez terminada la electroforesis, el gel se incubó a temperatura ambiente en Tritón X-100 al 2,5% de durante una hora, realizando un cambio de medio a los 30 minutos.

Posteriormente el gel se mantuvo en un tampón de digestión (Tris 50 mM, pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 200 mM y ZnCl<sub>2</sub> 1 µM), durante 18 horas a 37°C y en agitación. Como control, a este tampón de digestión se añadió EDTA (5mM), para inhibir la actividad de la metaloproteinasa. El gel se tiñe con Azul de Coomasie R-250 al 0,5%, en metanol al 30% y ácido acético al 10%. Una zona

de digestión sobre fondo azul, a 92 kD indica la actividad de la enzima MMP-9. Los geles resultantes fueron escaneados en un hp sacnjet 3500c.

### III.5.5.3. Marcaje con DHR

Este análisis se basó en la oxidación intracelular de Dihidrorodamina (DHR) a Rh-123 en neutrófilos activados con PMA (Lieberman y col., 1996; Richardson y col., 1998; Bassøe y col., 2000).

Se partió de 100  $\mu$ l de una suspensión de  $7 \times 10^5$  neutrófilos que se incubaron en primer lugar con PMA (0,6  $\mu$ g/ml) a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió la DHR (5  $\mu$ g/ $\mu$ l de concentración final) y se realizó una segunda incubación de 5 minutos a la misma temperatura. Después de la segunda incubación, se lavaron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 600g. Finalmente fueron resuspendidas entre 300-600 $\mu$ l de PBS al 1% de Paraformaldehído.

Para descartar el fondo producido por la posible fluorescencia inespecífica de neutrófilos no activados, se utilizó como blanco una suspensión de neutrófilos, a la cual se adicionó DHR sin la activación previa con PMA; este procedimiento confirmó que la fluorescencia de la muestra pertenece únicamente a neutrófilos maduros activados.

## **III.5.6. Transducción**

### III.5.6.1. Estudios de pre-estimulación

Estos estudios se efectuaron en cultivos de medio líquido con la población de células Lin-. Los cultivos se realizaron en placas de 6 pocillos (35 mm $\varnothing$ ) a las que se añadió  $5 \times 10^5$  células/ml resuspendidas en 2-3 ml de medio

IMDM suplementado con SP al 20%, L-glutamina 1,4mM y gentamicina al 1%. A esta mezcla de ensayo se añadieron diferentes factores de crecimiento: hGM-CSF, hSCF, hIL-6, hFlt-3, hTPO, cG-CSF y cSCF, a una concentración de 100 ng/ml cada uno y en diferentes combinaciones. Estas combinaciones están descritas en el apartado de resultados IV.3.1 y Fig.IV.19. Los cultivos se incubaron a 38°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Las células se recogieron mediante un tampón de disociación que se añadió al pocillo (1 minuto a 38°C), para realizar recuentos celulares y cultivos clonogénicos, utilizando cSCF, cG-CSF (100 ng/ml) y hEPO (1U/ml) a los días que se indican en la Fig.IV.19.

Una vez determinada la combinación de citoquinas, se estudio los tiempos de pre-estimulación más adecuados. Para ello, se recogieron las células de estos cultivos a las 24, 48 y 72 horas y se cuantifico el número total de células, el grado de diferenciación y el número de CFCs.

Las células fueron marcadas con la combinación de anticuerpos primarios (apartado III.5.2.2.), a lo largo de los días de pre-estimulación. A continuación se añadió el fluorocromo (anti-rata conejo-PE) y se procedió como se ha descrito en el apartado III.5.3, para su análisis por citometría de flujo. Para eliminar del recuento las células muertas se añadió IP a la suspensión celular.

Los cultivos clonogénicos se realizaron con  $5 \times 10^4$  células/ml a los diferentes días de pre-estimulación, en matriz semisólida de agar, como se describe en el apartado III.5.1. Las citoquinas utilizadas fueron cSCF, cG-CSF (100 ng/ml) y hEPO (1U/ml).

#### III.5.6.2. Protocolos de transducción

Antes de comenzar los protocolos de transducción, se realizó una pre-estimulación de las células Lin-, durante 24 horas con la combinación de

citoquinas cG-CSF, cSCF, hTPO-K y hFlt-3 a 100 ng/ml. La concentración de células de partida fue  $5 \times 10^5$  células/ml. Así mismo en todos los protocolos, se acondicionaron los pocillos, añadiendo 2 ml de fibronectina ( $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) durante 12 horas. Las incubaciones se realizaron a  $38^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  al 5% y humedad al 95%.

En todos los protocolos se utilizó como control, una población de células Lin- no transducidas. Esta población se mantuvo de forma paralela a las células Lin- transducidas.

**Protocolo 1;** Este protocolo consta de 2 ciclos de infección de 24 horas cada uno. Una vez acondicionados los pocillos, se retiró la fibronectina y se adicionó el sobrenadante viral filtrado ( $0,45 \mu\text{m}$ ), centrifugándose durante 60 minutos a 1000 g. A continuación, se retiró el sobrenadante viral y se adicionaron las células Lin- pre-estimuladas en IMDM fresco enriquecido con la combinación de citoquinas ya mencionada. La placa se incubó durante 24 horas.

Una vez transcurridas las 24 horas, se repitió el ciclo de infección en las mismas condiciones. Finalmente se recogieron las células del pocillo, mediante un tampón de disociación, y se centrifugaron a 400g durante 10 minutos. Las células se añadieron en IMDM suplementado, a un pocillo y con las citoquinas mencionadas anteriormente. El cultivo se incubó, durante 20 días, a lo largo de los cuales se analizó la expresión del transgen.

**Protocolo 2;** Este protocolo consta de cuatro ciclos de infección que se realizaron en 48 horas. En este caso, el sobrenadante viral filtrado ( $0,45 \mu\text{m}$ ), se centrifugó durante 1 hora 30 minutos a 1100 g y  $38^\circ\text{C}$  en contacto con las células Lin- pre-estimuladas y se mantuvo en incubación durante 12h. Para comenzar el segundo ciclo de infección, se recogió el sobrenadante del pocillo y se centrifugó 10 minutos a 400 g. Las células recuperadas se trataron como en el ciclo anterior. Se procedió de la misma manera para los ciclos 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup>.

Al finalizar los ciclos de infección se recuperaron todas las células del cultivo, utilizando un tampón de disociación. Se centrifugó la suspensión a 400 g durante 10 minutos y finalmente fueron resuspendidas en medio IMDM. Las células se mantuvieron en cultivos líquidos 10 días donde se realizaron distintas pruebas de la expresión del transgen.

**Protocolo 3;** Como en el protocolo 1, consta de dos ciclos de infección, con cuatro precargas en cada ciclo. El proceso se inicia añadiendo el sobrenadante viral filtrado (0,45  $\mu\text{m}$ ), durante 30 minutos a 38°C, para que la capa de fibronectina se “cargue” de partículas virales. Pasados los 30 minutos, se retiró el medio del pocillo y fue sustituido por nuevo sobrenadante viral filtrado. Estas “cargas”, sobre la capa de fibronectina, se repitieron hasta cuatro veces por ciclo de infección. Al finalizar la cuarta pre-carga, se retiró el sobrenadante viral y se añadieron las células Lin-, en IMDM y con la combinación de citoquinas descrita. A las 24 horas se inicio el segundo ciclo en una nueva placa acondicionada con fibronectina. Pasadas las 24 horas de incubación del segundo ciclo, se recogieron las células del cultivo, mediante un tampón de disociación, y se realizaron diferentes pruebas para constatar los porcentajes de transducción.

## **IV. RESULTADOS**

Los primeros estudios realizados en esta memoria se encaminaron hacia la obtención y purificación de una población enriquecida en células madre y progenitores hematopoyéticos caninos.

A continuación del aislamiento y caracterización de esta población, se abordaron diversos ensayos de funcionalidad para establecer la capacidad de anidamiento, diferenciación y proliferación de estas células, utilizando el sistema *in vitro* de los cultivos de larga duración (LTBMC), que mimetiza la hematopoyesis.

Por último, se realizó la transducción de un gen marcador, mediante vectores retrovirales, a los progenitores indiferenciados de la población aislada.

#### **IV.1. AISLAMIENTO DE UNA POBLACIÓN ENRIQUECIDA EN CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS**

Como primer objetivo de esta memoria, nos propusimos conseguir el aislamiento y caracterización de una población enriquecida en células madre y progenitores hematopoyéticos. Para lograr este objetivo se comenzaron los experimentos de aislamiento siguiendo la metodología de separación inmunomagnética desarrollada por Miltenyi Biotec (MACS®).

##### **IV.1.1. CONDICIONES PARA CULTIVOS DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS**

El cultivo *in vitro* de progenitores hematopoyéticos es una herramienta de trabajo que permite evaluar el grado de enriquecimiento en progenitores con capacidad de diferenciación y proliferación en una médula ósea. Las



condiciones de cultivo, tanto hacia la línea granulo-macrofágica (GM-CFC) como hacia la línea eritroide (BFU-E), se establecieron a partir de células mononucleares de médula ósea.

En la puesta a punto de esta metodología, se analizó la capacidad de respuesta de los progenitores hematopoyéticos, ante diferentes citoquinas, mediante variaciones en el número y combinación de las mismas.

Para la puesta a punto de estos experimentos se utilizaron tanto citoquinas humanas como caninas. En la tabla.IV.1 se han descrito las distintas combinaciones de citoquinas humanas utilizadas para los cultivos de progenitores hematopoyéticos caninos. Estos experimentos se iniciaron con células mononucleares y los resultados obtenidos, en cuanto a la combinación de citoquinas, fueron aplicados posteriormente en los estudios de las distintas poblaciones aisladas, CD34+ y Lin-. El número de CFC esta expresado por n° de colonias/10<sup>5</sup> células.

La concentración utilizada para las citoquinas humanas fue de 100 ng/ml para hSCF, hTPO, hGM-CSF, hIL-6 y hFlt-3 y para hEPO fue de 1U/ml. En todos los casos se añadieron 7,5x10<sup>4</sup> células/ml de partida.

Los resultados obtenidos permitieron establecer las condiciones óptimas en cuanto a combinación de citoquinas que fueron: hSCF + hGM-CSF + hEPO y hGM-CSF + hEPO, (100ng/ml) para hGM-CSF y hSCF y (1U/ml) para hEPO. El número de células de partida que se utilizó en el ensayo fue 7,5x10<sup>4</sup>células/ml.

A partir del acuerdo comercial adquirido con AMGEN, respecto al suministro por parte de esta compañía, de cSCF y cG-CSF, se ensayaron estas citoquinas a 100 ng/ml junto con hEPO a una concentración de 1U/ml. En estos ensayos se variaron el número de células de partida.

Tabla.IV.1. Combinaciones de citoquinas humanas utilizadas para la puesta a punto de cultivos clonogénicos, con células mononucleares. La diferencia encontrada entre las combinaciones de hGM-CSF + hEPO y hSCF + hGM-CSF + hEPO no es significativa ( $P > 0,8$ ).

Citoquinas humanas	CFCs/10 <sup>5</sup> células
hGM-CSF + hEPO	120 ± 23 (n =7)
hGM-CSF + hSCF + hEPO	125 ± 2,4 (n =3)
hGM-CSF + hIL-6 + hEPO	99 ± 5,8 (n =3)
hGM-CSF + hFlt-3 + hEPO	76 ± 12,2 (n =3)
hGM-CSF + hTPO + hEPO	32 ± 8,3 (n =3)
hSCF	6
hIL-6	-----
hFlt-3	5
hTPO	-----

En la tabla IV.2, se muestran los resultados obtenidos en número de CFCs/10<sup>5</sup> células dependiendo del número de células de partida. La combinación de citoquinas fue: cSCF + cG-CSF + hEPO.

Como se puede observar en estos resultados las condiciones óptimas para el cultivo *in vitro* de progenitores hematopoyéticos caninos, son independientes del número de células añadidas al ensayo.

Sin embargo, sí existen diferencias significativas en el número de CFCs obtenidas ( $P < 0,001$ ) dependiendo del origen humano o canino de los factores.

Tabla. IV.2. Combinación de citoquinas caninas utilizada para la puesta a punto de los cultivos clonogénicos, con células mononucleares. La diferencia entre los resultados obtenidos con  $7,5 \times 10^5$  células/ml y  $5 \times 10^4$  células /ml no es significativa ( $P > 0,7$ ).

Número de células de partida	CFCs/ $10^5$ células
$7,5 \times 10^4$ células/ml	$399 \pm 57$ (n =6)
$5 \times 10^4$ células/ml	383 (n =2)
$3,5 \times 10^4$ células/ml	311 (n =2)

#### IV.1.2. SELECCIÓN POSITIVA

El gran avance en la obtención de anticuerpos que reconocen antígenos de membrana asociados a progenitores hematopoyéticos, ha mejorado la capacidad para aislar este tipo de células mediante el empleo de anticuerpos asociados a microesferas metálicas o fluorocromos. Sin embargo, en el perro la caracterización de los antígenos asociados a progenitores hematopoyéticos y de sus anticuerpos correspondientes no ha sido tan extensa como la descrita para ratón y humano.

##### **IV.1.2.1. Aislamiento con 6C9**

La selección positiva de células madre hematopoyéticas caninas se comenzó con la utilización del anticuerpo monoclonal 6C9, producido en rata contra células de la línea ML3 humana. Este anticuerpo desarrollado en Munich, nos fue cedido gracias a la colaboración que se mantiene con el grupo que dirige el Prof. Kolb. Los resultados obtenidos, mediante el aislamiento inmunomagnético con este anticuerpo, se han representado en (Fig.IV.1). Para células mononucleares marcadas con 6C9 se obtuvo un porcentaje de células positivas de  $6,9 \pm 2,3\%$ , (n=9). Una vez realizada la selección positiva el

porcentaje de células marcadas pasó a ser un  $58,5 \pm 6,3\%$  ( $n=9$ ), correspondiente a un incremento de 8,5 veces, mostrando dos picos bien diferenciados.

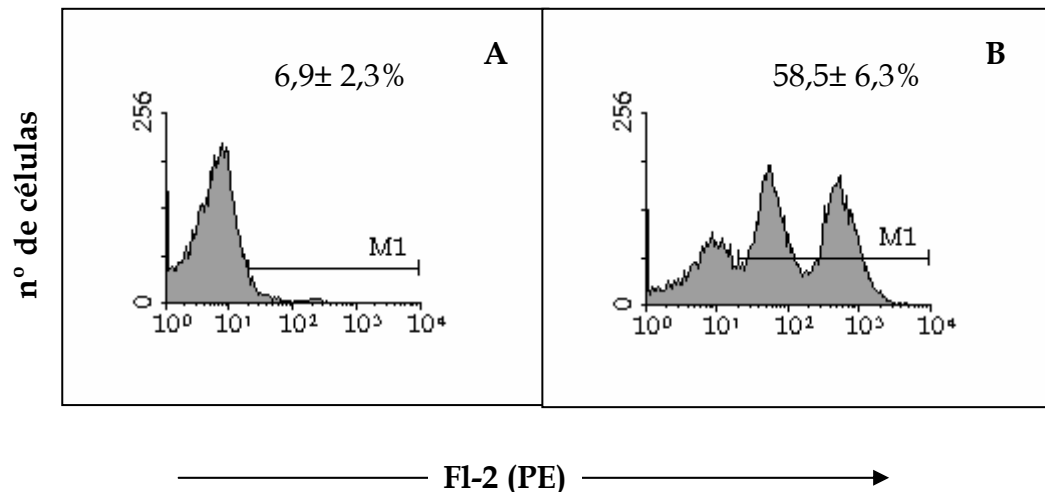


Figura.IV.1. Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo. Representación del número relativo de células frente a la fluorescencia. (A) Células mononucleares marcadas con 6C9 y (B) Células marcadas con 6C9 después de la separación inmunomagnética ( $P < 0,001$ ). En ambos casos se utilizó, como anticuerpo secundario, el fluorocromo (anti-rata conejo-PE).

Así mismo, se analizó en la población aislada el tamaño y complejidad de las células que se unen al anticuerpo 6C9. Del resultado de este análisis, se obtuvieron los "dot plot" que se muestran a continuación (Fig.IV.2.). La población acotada corresponde a las células  $CD34^{+baja}$ .

La diferencia en cuanto a intensidad de fluorescencia dentro de la población de células unidas a 6C9, nos permitió abordar el aislamiento mediante FACS, de las poblaciones que hemos denominado como  $CD34^{+baja}$  y  $CD34^{+alta}$ . La Figura IV.3 muestra los porcentajes obtenidos de estas poblaciones, 32,8% para  $CD34^{+baja}$  con una pureza de 83,2%, y 67,2% para  $CD34^{+alta}$  con una pureza de 96%, respecto al total de células unidas al anticuerpo 6C9 que emiten fluorescencia.

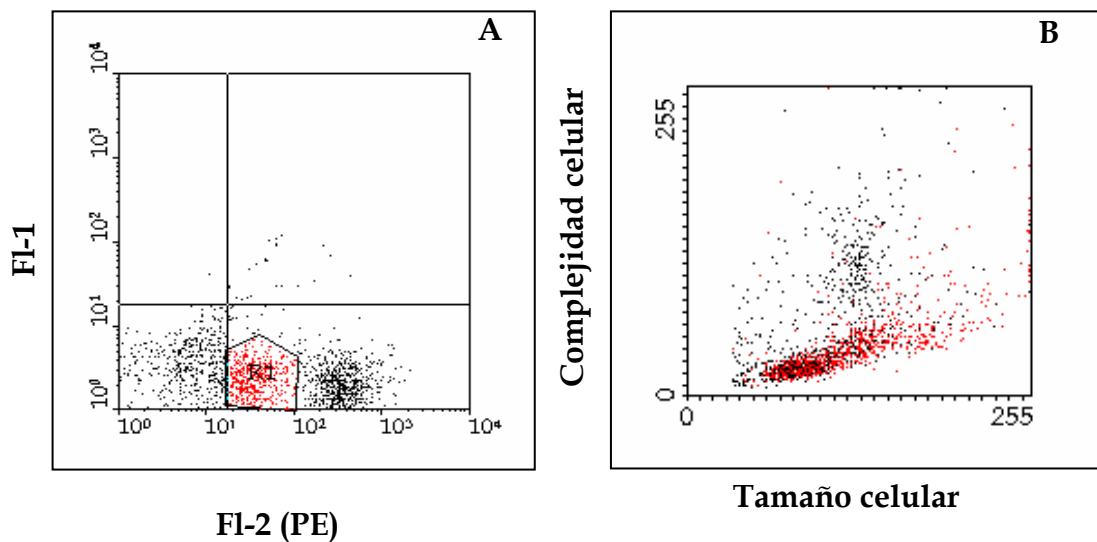


Figura.IV.2.: “Dot plot” de las células CD34+ unidas al anticuerpo 6C9. (A) En esta representación se analizó la fluorescencia de las células CD34+, apreciándose dos poblaciones con diferente intensidad, CD34+<sup>baja</sup> y CD34+<sup>alta</sup>. En (B) se representa la población celular analizada en base a su tamaño y complejidad. La población CD34+<sup>baja</sup> aparece representada por puntos rojos.

A pesar de los alentadores resultados que se obtuvieron en el análisis por citometría de flujo, los datos obtenidos en cuanto al enriquecimiento en progenitores hematopoyéticos no se corresponden con lo esperado. El número de colonias procedentes de la población celular CD34+ fue de  $87 \pm 1 / 10^5$  células, mientras que el número obtenido a partir de células mononucleares fue  $120 \pm 23 / 10^5$  células, ( $p > 0,1$ ). En todos los casos, la combinación de citoquinas utilizada fue, h-GM-CSF (100ng/ml) + hEPO (1U/ml).

El estudio morfológico de la población aislada con el anticuerpo 6C9, no indica ningún incremento en las poblaciones de progenitores comprometidos, confirmándose los resultados obtenidos mediante los cultivos de CFCs.

#### IV.1.2.2. Aislamiento con el anticuerpo comercial 1H6

De forma paralela al aislamiento con el anticuerpo 6C9, se realizaron ensayos utilizando el anticuerpo comercial 1H6. El resultado obtenido con el

marcaje de este anticuerpo para células mononucleares fue de  $4,3 \pm 1,1\%$ , y una vez realizado el aislamiento el porcentaje de células marcadas con 1H6 pasó a ser de un  $13,2 \pm 2,6\%$ . Estos resultados implican un enriquecimiento en el número de células marcadas de 3,8 veces (Fig.IV.4).

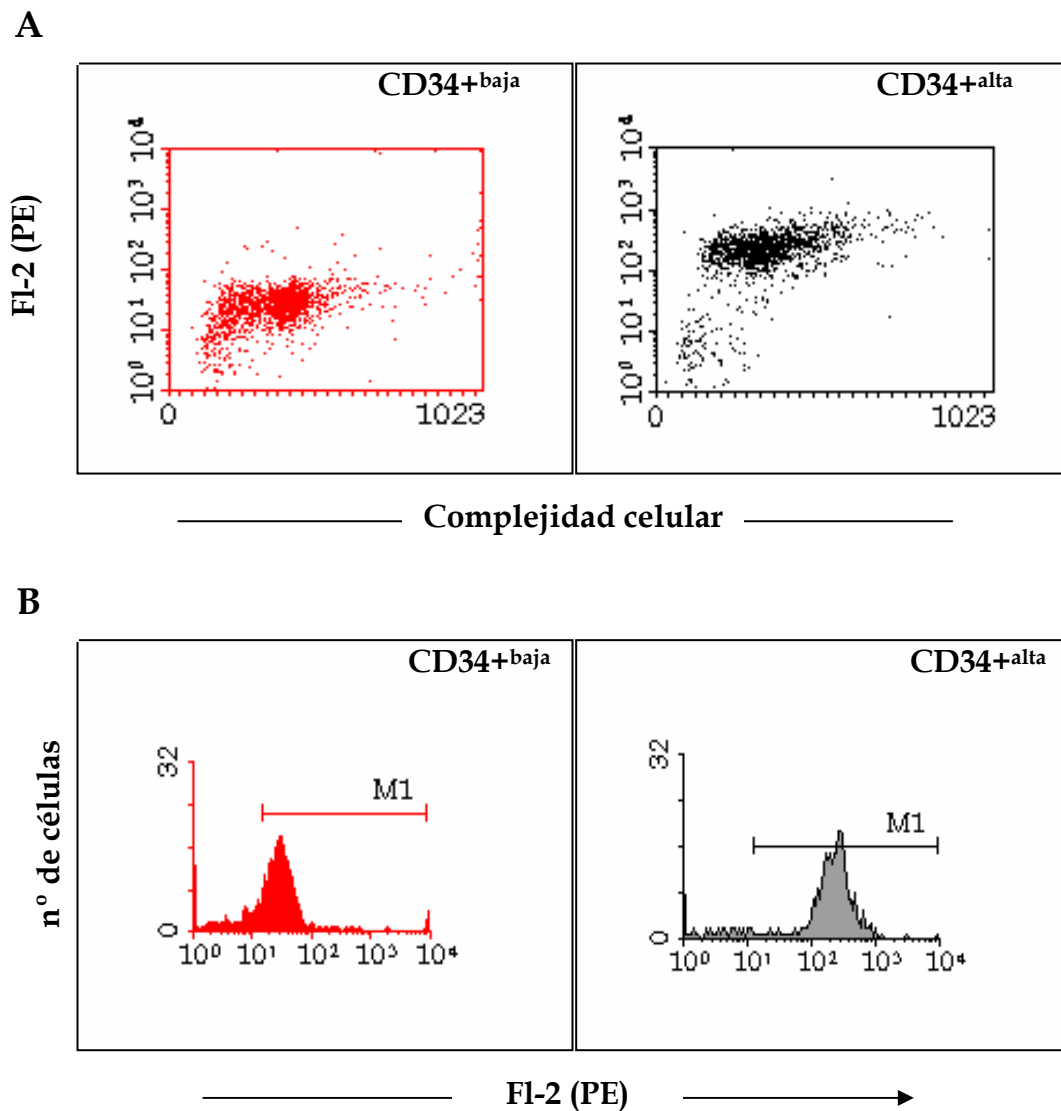


Figura.IV.3.: "Dot plot" e Histogramas de las poblaciones CD34+baja y CD34+alta. Después de la selección positiva se llevó a cabo la separación física de las poblaciones mediante FACS, como se describe en el apartado III.5.3.1. En (A) se representó la fluorescencia frente a la complejidad de las células de las dos poblaciones, apreciándose variación entre ambas. En (B) está representado el número relativo de células frente a la intensidad fluorescencia.

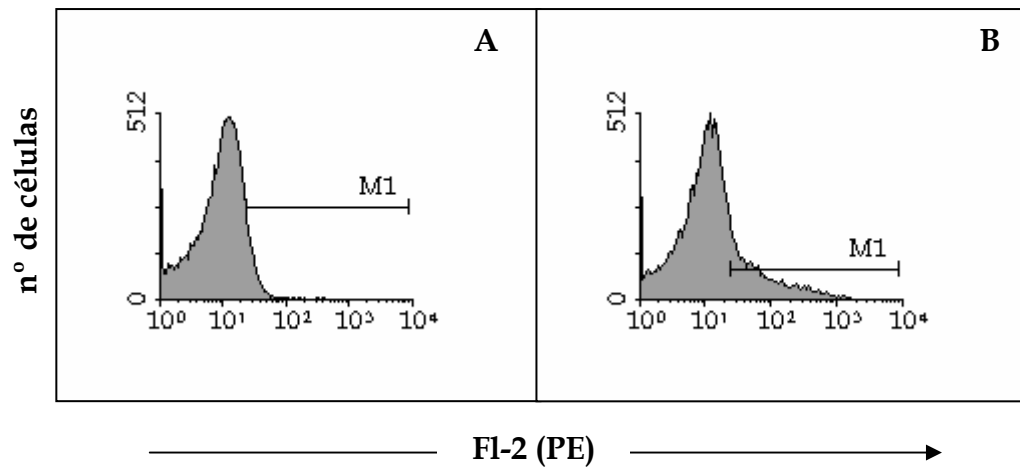


Figura.IV.4.: Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo. Representación del número relativo de células frente a la fluorescencia. (A) Células mononucleares marcadas con 1H6. (B) Células marcadas con 1H6 después de la separación inmunomagnética ( $P > 0,3$ ). En ambos casos el fluorocromo utilizado fue (anti-ratón burro-PE).

Se realizaron cultivos de progenitores a partir de las células CD34+ aisladas con el anticuerpo 1H6. El número de colonias, tras el aislamiento con 1H6, fue  $390 \pm 30$  CFC/ $10^5$  células,  $n = 3$ . Dato, que al compararlo con el obtenido con células mononucleares ( $120 \pm 23$  CFC/ $10^5$  células,  $n = 7$ ), supone un incremento de 3,3 veces (Fig.IV.5.).

#### CFC a partir de 1H6

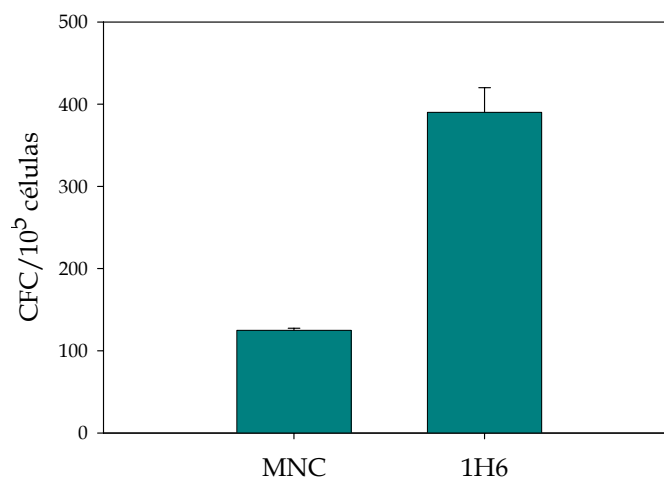


Figura.IV.5.: CFCs obtenidas de células mononucleares y células aisladas con 1H6 utilizando la combinación de citoquinas, hGM-CSF 100ng/ml y hEPO 1U/ml, en cultivo semisólido de agar. Se puede apreciar un incremento de 3,3 veces en el número de colonias de células CD34+ respecto al de células mononucleares ( $P < 0,001$ ).

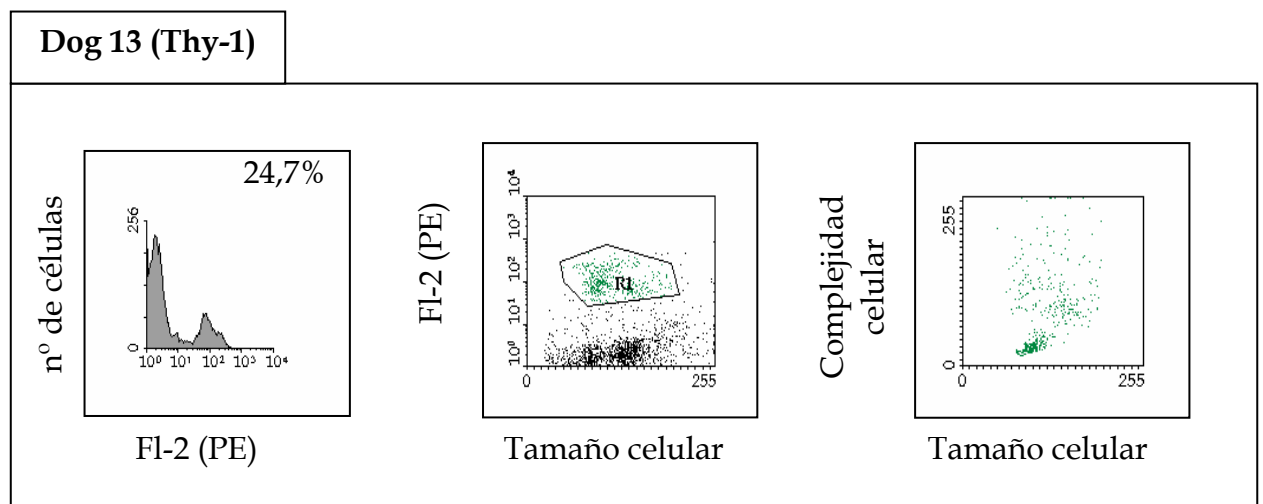
Los resultados obtenidos con el anticuerpo 6C9, sugieren que por el momento, no es una herramienta adecuada para la purificación y aislamiento de progenitores hematopoyéticos. Por otro lado, el bajo porcentaje de enriquecimiento obtenido al utilizar el 1H6, nos decidió a abordar la selección negativa como alternativa para el aislamiento y purificación de progenitores hematopoyéticos caninos.

#### IV.1.3. INMUNOSELECCIÓN NEGATIVA

La selección negativa se abordó mediante la utilización de una combinación de anticuerpos monoclonales que reconocen distintas poblaciones de células comprometidas: Thy-1+, CD15+, CD5+, IgG+ y MHCII+.

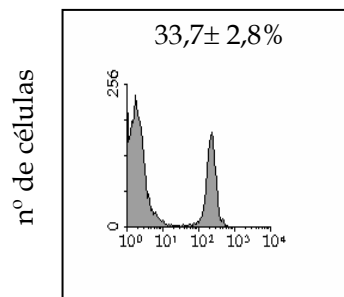
##### **IV.1.3.1. Estudio de los anticuerpos utilizados**

Antes de abordar la selección negativa, las células mononucleares fueron marcadas, por separado, con cada uno de los anticuerpos usados para la selección negativa, y con una combinación de los mismos; posteriormente se adicionó un fluorocromo (PE). Mediante citometría de flujo, se cuantificó el número de células marcadas y se analizó cada población respecto a su tamaño y complejidad. Los resultados muestran que el porcentaje de la población de células Thy-1+ fue de 24,7%; de CD15+ fue de  $33,7 \pm 2,8\%$ ; de CD5+ fue de 12,2%; de IgG+ fue de  $26,8 \pm 6,3\%$ ; y de MHCII+ fue de  $18 \pm 4,3\%$ . (Fig.IV.6.)

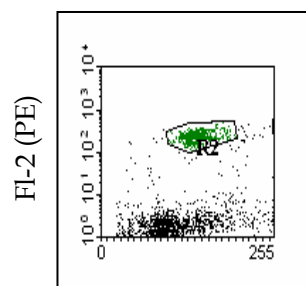




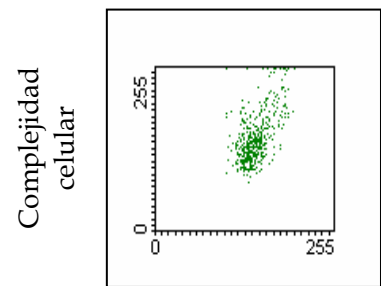
**Dog 15 (CD 15)**



FI-2 (PE)

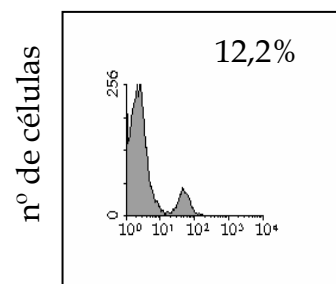


Tamaño celular

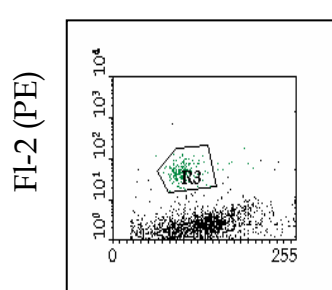


Tamaño celular

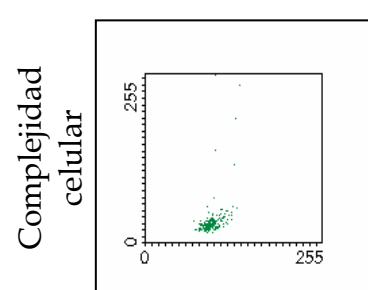
**Dog 17 (CD 5)**



FI-2 (PE)

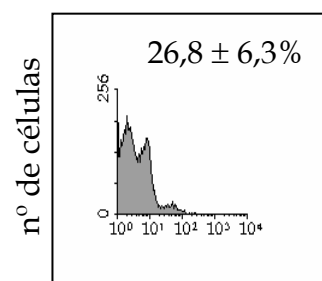


Tamaño celular

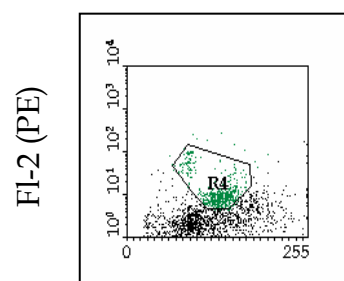


Tamaño celular

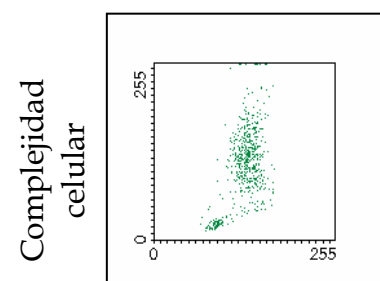
**Dog 22 (IgG)**



FI-2 (PE)



Tamaño celular



Tamaño celular

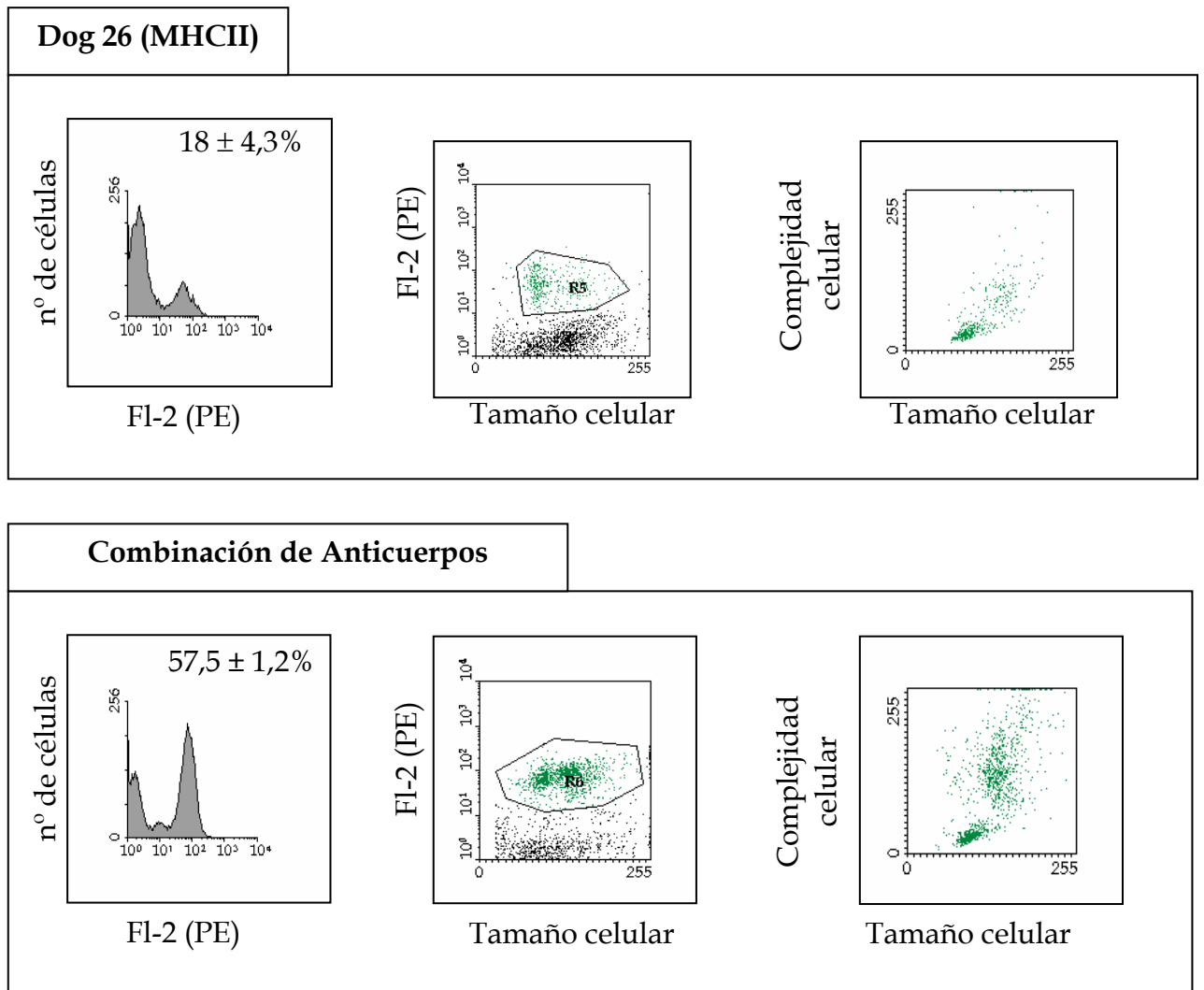


Figura.IV.6.: “Dot plots” e histogramas obtenidos mediante citometría de flujo. Se ha representado el porcentaje de células marcadas con cada anticuerpo, la intensidad de fluorescencia y el tamaño y complejidad de cada población aislada. Para este estudio se marcaron las células mononucleares con cada uno de los anticuerpos específicos de células comprometidas, así como con una combinación de los mismos, y posteriormente se adicionó el fluorocromo (anti-rata conejo-PE).

Debido a la controversia sobre si las poblaciones Thy-1+ y MHCII+ caninas que expresan los antígenos Thy-1 y MHCII pertenecen a la población de progenitores hematopoyéticos; decidimos esclarecer este punto, realizando el aislamiento de estas poblaciones celulares mediante selección positiva, y determinando su capacidad para producir CFCs en cultivos clonogénicos.

En la población que expresa Thy-1 no hubo crecimiento de colonias, y en el caso de las células MHCII+, se obtuvo un número de colonias de 99,6 CFC/10<sup>5</sup> células, inferior al obtenido a partir de células mononucleares, 120 ± 23 CFC/10<sup>5</sup> células, n =7.

#### **IV.1.3.2. Selección negativa**

La selección negativa permite, mediante discriminación celular, enriquecer una población en progenitores hematopoyéticos marcando con anticuerpos específicos de células comprometidas.

Después del aislamiento por selección negativa se obtuvo en la fracción Lin- un porcentaje de 16,3 ± 0,5% (n=15) de las células de partida. La fracción Lin+ supuso un 57,5 ± 1,2% (n=3) del total de células mononucleares. Se marcaron las fracciones Lin- y Lin+ con un fluorocromo (PE) y se analizó la pureza de ambas poblaciones por citometría de flujo. La pureza de la fracción Lin- fue 94% y la de la Lin+ 95,6% (Fig.IV.7).

##### IV.1.3.2.1. Cultivos de progenitores hematopoyéticos

Para confirmar el enriquecimiento en progenitores de la población Lin- aislada, se realizaron cultivos clonogénicos utilizando como fuente estimuladora citoquinas humanas y citoquinas caninas, a las condiciones descritas en el apartado III.5.1.

En la Fig.IV.8 se muestran los resultados obtenidos al utilizar citoquinas humanas, donde se observa un incremento de 6 ± 0,3 y 4,3 ± 0,7 veces en BFU-E y GM-CFC respectivamente, frente al número de colonias obtenido con células mononucleares.

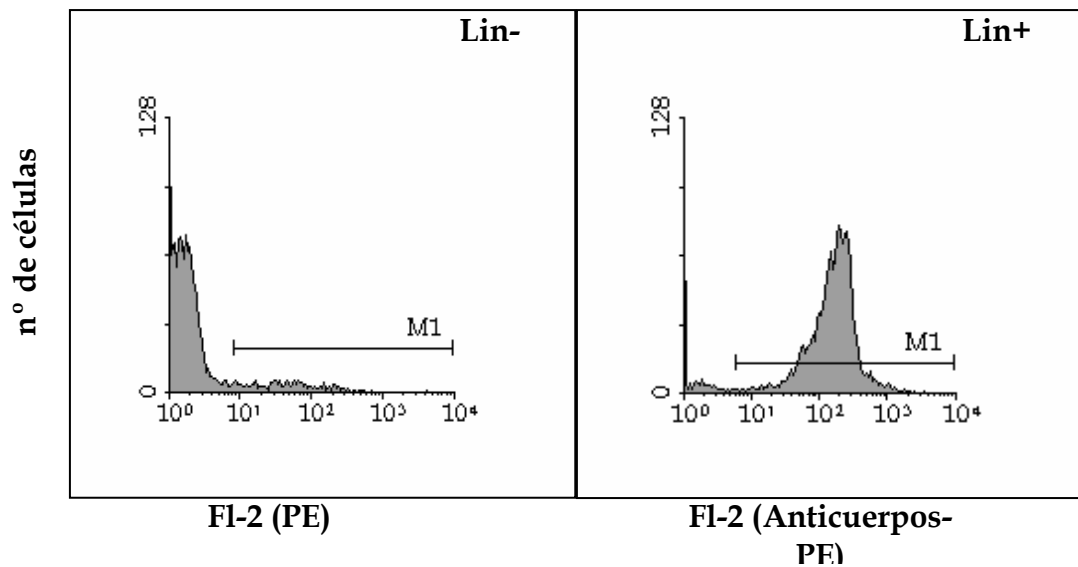
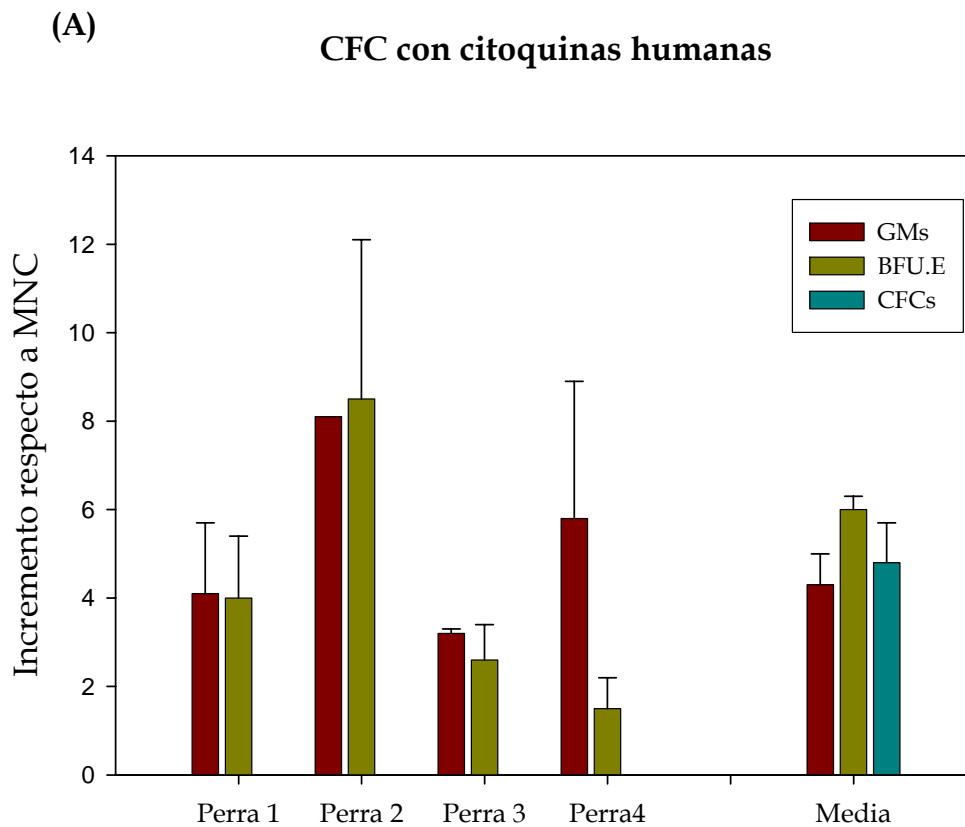
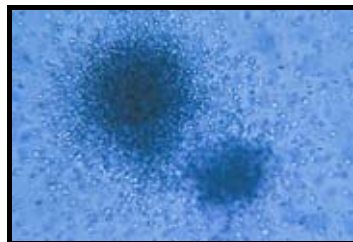


Figura.IV.7.: Histogramas obtenidos por citometría de flujo de las poblaciones Lin- y Lin+. Representan el número de células analizado frente a la fluorescencia emitida. Después de la selección negativa se marcaron ambas poblaciones con el fluorocromo (anti-rata conejo-PE), para determinar el grado de pureza de cada población.

En la Fig.IV.9 están representados los datos obtenidos con la combinación citoquinas caninas, cSCF, cG-CSF y hEPO. Se realizó una media de los resultados encontrados para cada animal individualmente. El incremento encontrado fue de  $4,7 \pm 0,7$  veces en el total de CFCs,  $n = 5$ , con una diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) frente a células mononucleares.



(B)



(C)

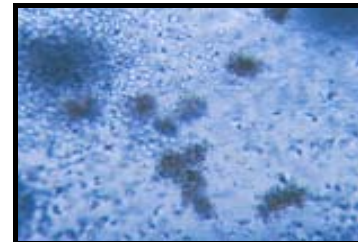


Figura. IV.8. Colonias granulo-macrofágicas y eritroides obtenidas de poblaciones Lin-. (A) Los datos se expresan en incrementos respecto de células mononucleares en animales individuales  $n= 2-4$  y en una media de todos ellos. Los cultivos clonogénicos se realizaron en matriz semisólida de agar, la combinación y concentración de citoquinas humanas utilizada fue: hGM-CSF (100ng/ml) y hEPO (1U/ml). El recuento de colonias se realizó entre los 9-11 días siguientes. Fotografías de los cultivos clonogénicos donde se observan colonias (B) Granulo-macrofágicas y (C) Eritroides (250x aumentos).

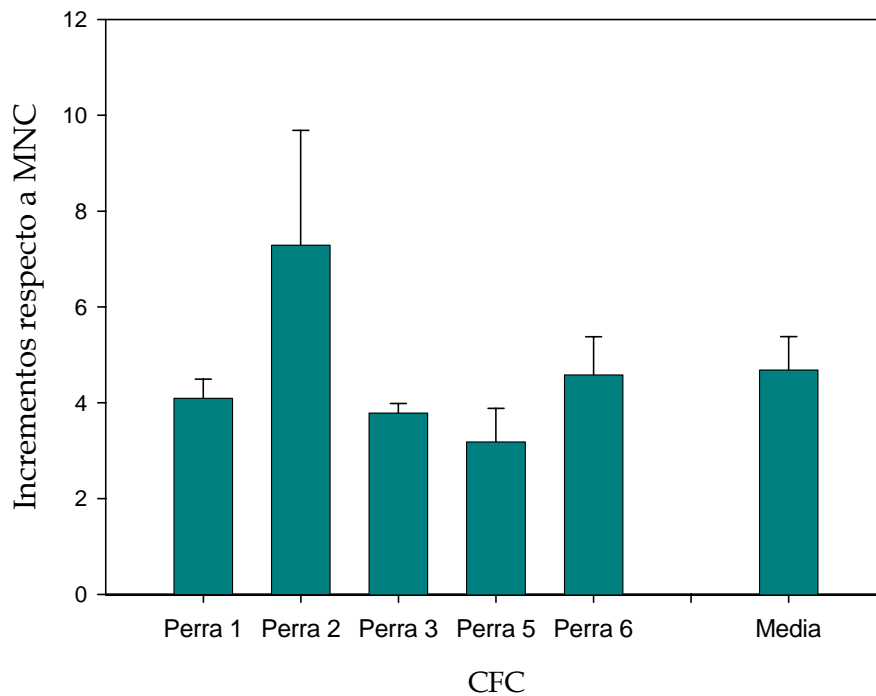
**CFC con citoquinas caninas**

Figura.IV.9.: Colonias de progenitores hematopoyéticos (CFCs), obtenidas de poblaciones Lin-. Los datos se expresan en incrementos respecto de células mononucleares en animales individuales n= 2-4 y en una media de todos ellos. Los cultivos clonogénicos se realizaron en matriz semisólida de agar, y la combinación y concentración de citoquinas fue; cSCF y cG-CSF (100ng/ml) y hEPO (1U/ml). Se realizó el recuento de las colonias entre los 9-11 días siguientes al establecimiento del cultivo.

**IV.1.3.2.2. Estudio morfológico**

El estudio morfológico, a partir de preparaciones realizadas por citocentrifugación de la población Lin- y células mononucleares, confirma el enriquecimiento en el número de progenitores respecto a las células mononucleares, (Fig.IV.10).

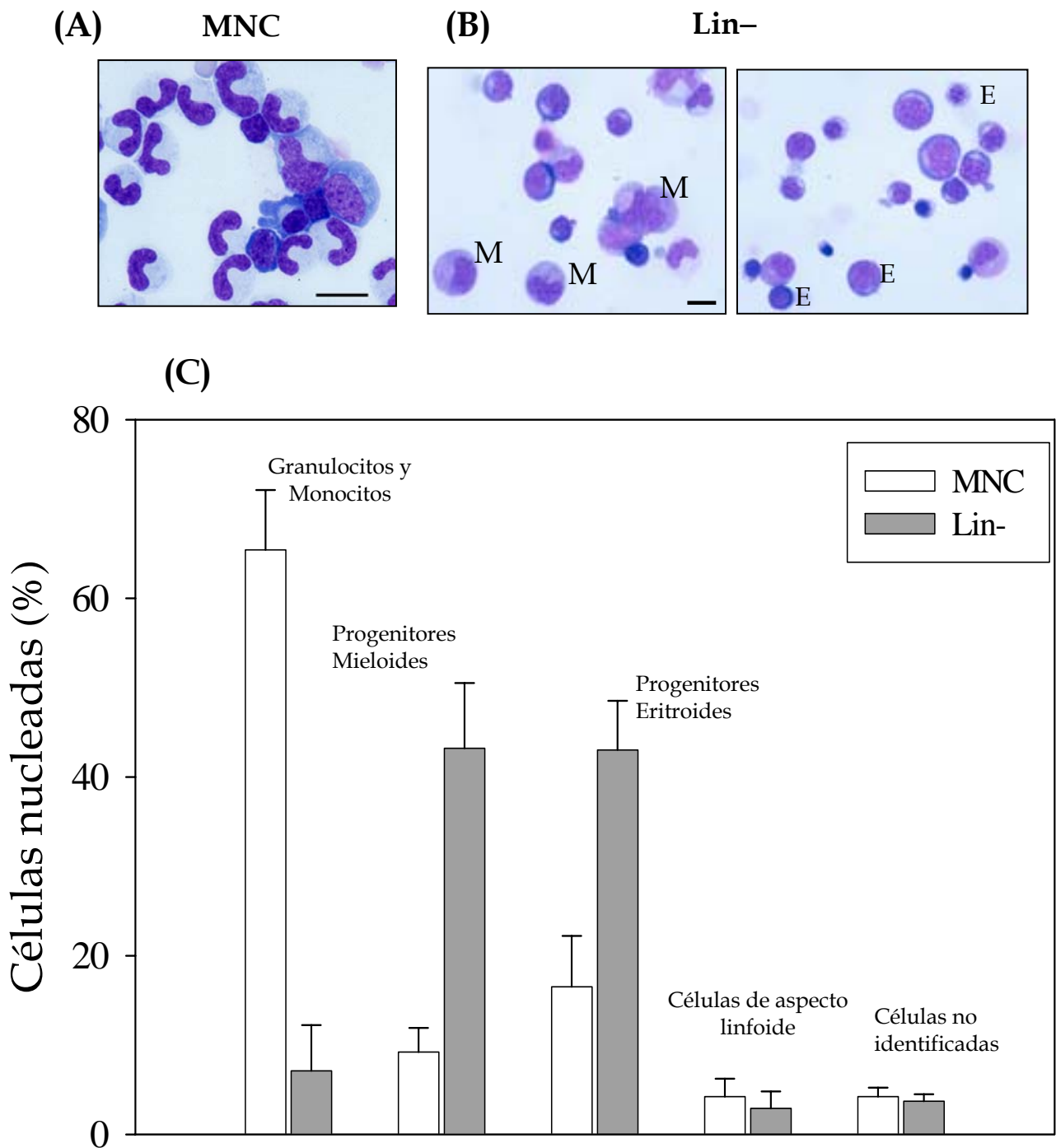


Figura.IV.10.: Gráfica y fotografías del estudio morfológico de las poblaciones de células mononucleares y Lin-. La población Lin- esta enriquecida en progenitores mieloides (M) ( $P < 0,001$ ) y eritroides (E) ( $P < 0,001$ ), frente a células mononucleares. Las fotografías se realizaron a 1000x (MNC) y 600x (Lin-).

#### IV.1.3.2.3. Marcaje de la población Lin- con Rodamina-123

La utilización de la Rodamina-123 (Rh-123) en estudios de médula ósea de ratón y humano, ha demostrado ser una excelente herramienta para la identificación de células precursoras hematopoyéticas.

En la Fig. IV.11 se puede apreciar, tanto en células mononucleares como en Lin-, dos poblaciones bien diferenciadas en cuanto a intensidad de fluorescencia. La población de células con baja intensidad de fluorescencia Lin-/Rh-123<sup>baja</sup> (R1) ( $21,2 \pm 3\%$ ) se vio incrementada en 2 veces respecto a MNC/Rh-123<sup>baja</sup> (R1) ( $11,3 \pm 1,6\%$ )

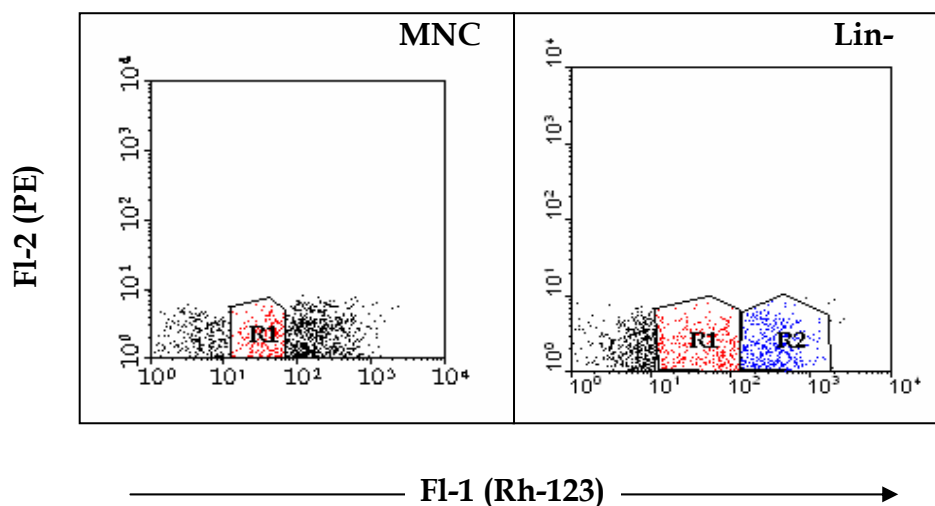


Figura.IV.11: "Dot plots" obtenidos por citometría de flujo al marcar con Rh-123 las poblaciones de células mononucleares y Lin-. La población Lin-/Rh-123<sup>baja</sup> (R1) se ve incrementada en dos veces respecto a la población MNC/Rh-123<sup>baja</sup> (R1) ( $P < 0,002$ ).

Las poblaciones Lin-/Rh-123<sup>baja</sup> y Lin-/Rh-123<sup>alta</sup> se separaron mediante FACS. La pureza de estas dos poblaciones aisladas fue  $78 \pm 5\%$  ( $n=3$ ) para Lin-/Rh-123<sup>baja</sup> y  $83 \pm 3\%$  ( $n=3$ ) para Lin-/Rh-123<sup>alta</sup>. Asimismo, entre estas poblaciones se observaron diferencias de tamaño y complejidad, siendo la Lin-/Rh-123<sup>baja</sup> una población celular más homogénea (Fig.IV.12).



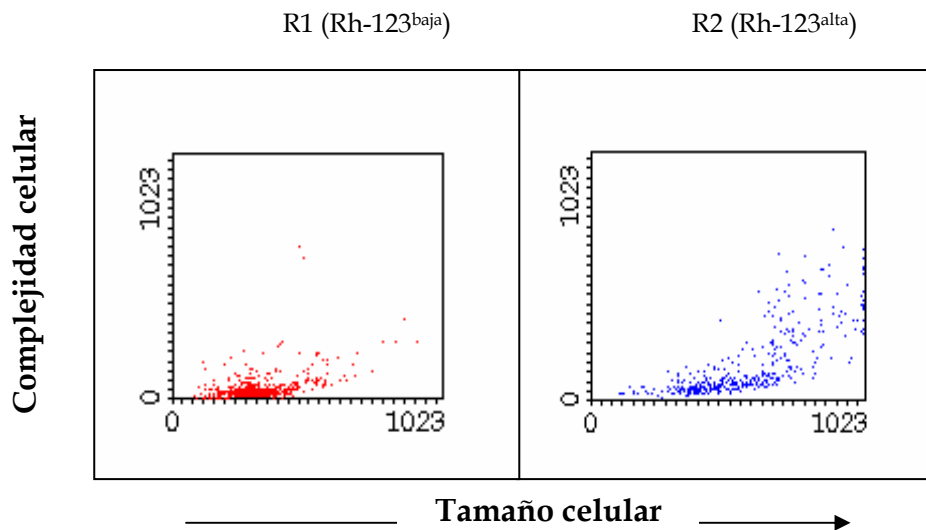


Figura.IV.12.: "Dot plots" obtenidos por citometría de flujo. Las poblaciones Lin-/Rh-123<sup>baja</sup> ( $21,2 \pm 3\%$ ,  $n = 4$ ) y Lin-/Rh-123<sup>alta</sup> ( $46,2 \pm 8,8\%$ ,  $n=4$ ) aisladas mediante FACS, se han representado en cuanto a su tamaño y complejidad celular, existiendo gran diferencia entre las dos poblaciones.

El estudio morfológico de la población Lin-/Rh-123<sup>baja</sup> indicó que el 50% de las células nucleadas son de aspecto mielo-limfoblastoide con ausencia de gránulos diferenciados.

Los cultivos de progenitores de esta población se realizaron con: cSCF y cG-CSF (100 ng/ml), hEPO (1 U/ml). Se observaron colonias a los 16 días (Fig.IV.13). Las colonias encontradas presentaban un aspecto compacto característico, y estaban compuestas por células de pequeño tamaño.

Por ultimo, se realizó un marcaje de las células Lin- con el anticuerpo comercial 1H6, con el cual se obtuvo una población marcada, Lin-/CD34<sup>+</sup> de un 13,3%.



Figura. IV.13: Colonia obtenida del cultivo clonogénico realizado a partir de células Lin-/Rh-123<sup>baja</sup>. Estos cultivos se realizaron en matriz semisólida de agar, la combinación de citoquinas fue cSCF, cG-CSF (100 ng/ml) y hEPO (1 U/ml). Fotografía realizada en un microscopio invertido a 250 aumentos, a los 16 días de cultivo.

## IV.2. CAPACIDAD DE ANIDAMIENTO, DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LA POBLACION AISLADA

El segundo objetivo de esta memoria consistió en la elaboración de una serie de ensayos de funcionalidad encaminados a determinar la capacidad de diferenciación, proliferación y anidamiento de las poblaciones enriquecidas en progenitores hematopoyéticos.

Para lograr este objetivo se utilizó el modelo *in vitro* de los LTBMCM, sistema que mimetiza la hematopoyesis.

### IV.2.1. SISTEMAS *IN VITRO* (LTBMCM)

Para la puesta a punto de este sistema *in vitro*, nos hemos basado en nuestra experiencia previa sobre cultivos de larga duración con médula ósea canina (Fermín y col., 2004). Una vez establecidos los cultivos se irradiaron con

15 Gy para eliminar la hematopoyesis endógena, como se describe en apartado III.5.7. Este sistema *in vitro* nos permitió llevar a cabo estudios, donde evaluamos el potencial de la población Lin<sup>-</sup> para anidar y diferenciarse dando una población de células maduras funcionales.

En el siguiente esquema (Figura.IV.14) se detalla la cronología del establecimiento y desarrollo de los sistemas *in vitro*, para la obtención de las muestras utilizadas en las distintas pruebas de funcionalidad.

#### IV.2.2. CAPACIDAD DE ANIDAR DE LIN<sup>-</sup> (LTC-IC)

Para determinar la presencia de progenitores LTC-IC (Fig.IV.15), las células adherentes de los LTBMCM se recogieron a los 35 y 49 días y se realizaron cultivos clonogénicos, El número de LTC-IC fue de 823 CFC/10<sup>5</sup> células y 341 ± 101 CFC/10<sup>5</sup> células, n=3, respectivamente.

Para comprobar la funcionalidad de la progenie procedente de la población Lin<sup>-</sup> obtenida de los LTBMCM, se escogió al neutrófilo como modelo de célula madura.

La ontogenia de las células mieloides conlleva una serie de acontecimientos encaminados a la adquisición o secreción de determinadas sustancias que permiten a los neutrófilos maduros llegar a los sitios de inflamación y actuar en primera línea en los mecanismos de defensa inespecíficos.

En este trabajo se eligieron los siguientes parámetros indicativos de la madurez de los neutrófilos: estudio morfológico; expresión del antígeno CD15; contenido de metaloproteinasa (MMP) en los gránulos de gelatinasa y capacidad de estas células para producir especies activadas de oxígeno.

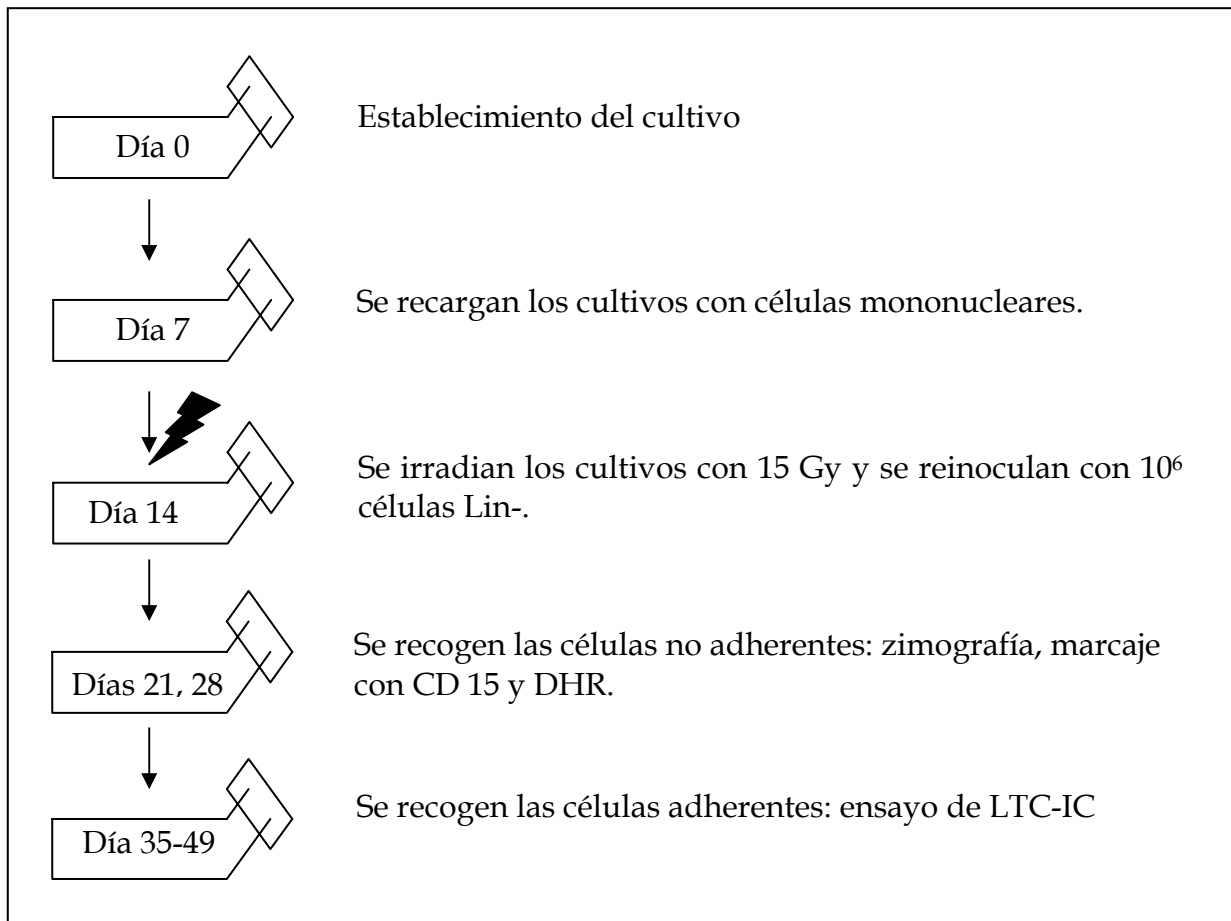


Figura.IV.14: Descripción cronológica del establecimiento y desarrollo de los sistemas *in vitro*, para la obtención de muestras utilizadas en las distintas pruebas de funcionalidad.



Figura.IV.15.: Colonias formadas a partir de células adherentes de LTBMBC a los 35 y 49 días de cultivo. Estos cultivos clonogénicos se realizaron en matriz semisólida de agar, con un número de células adherentes de  $1-2 \times 10^5$  células/ml y utilizando hGM-CSF (100 ng/ml) y hEPO (1 U/ml) como fuente estimuladora. Fotografía realizada en un microscopio invertido a 250 aumentos, a los 14 días de cultivo

### IV.2.3. PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD DE NEUTRÓFILOS

Como se ha detallado en el esquema (Fig.IV.14), se realizaron diferentes pruebas de funcionalidad en los neutrófilos recogidos de los LT BMC a los 21, 28 y 32 días. De forma paralela, se aislaron neutrófilos de sangre periférica para utilizarlos como control positivo, en cada uno de los ensayos.

#### IV.2.3.1. Cuantificación de células CD15+

La expresión de antígenos específicos de granulocitos se determinó en las poblaciones celulares procedentes de los cultivos *in vitro*, así como en neutrófilos obtenidos de sangre periférica (apartado III.4.3.1). El marcaje, se realizó con el anticuerpo monoclonal específico para granulocitos caninos (CD15), y se analizaron los resultados mediante citometría de flujo, (Fig.IV.16).

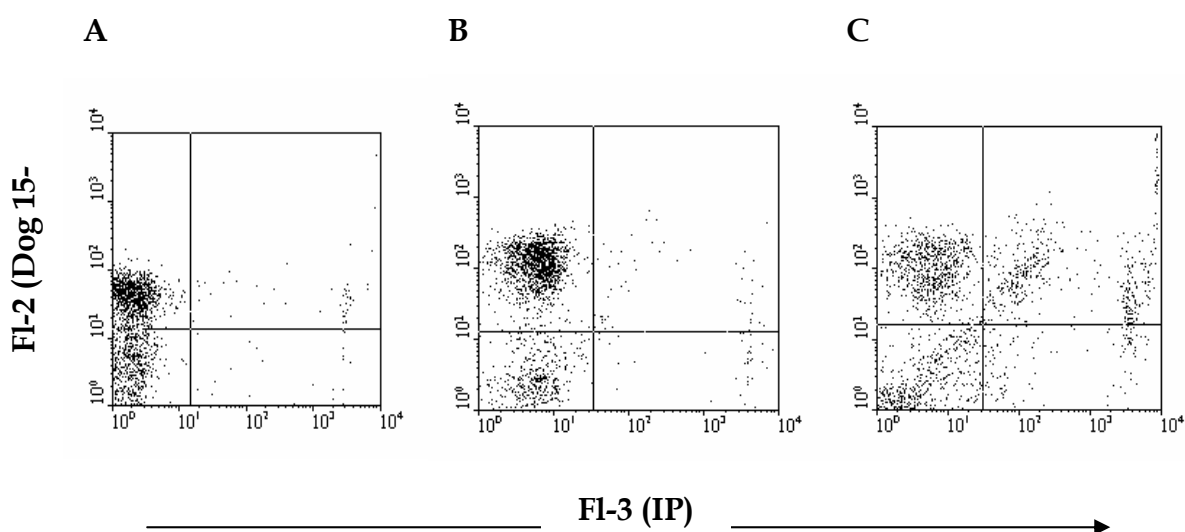


Figura.IV.16.: Dot plots obtenidos por citometría de flujo. En el eje X esta representada la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio, utilizado para eliminar las células muertas. Las células marcadas con el anticuerpo Dog 15, dieron los siguientes resultados; (A) Neutrófilos de sangre periférica utilizados como control positivo 70%, (B y C) células no adherentes de 21 y 28 días de cultivos  $60,9 \pm 4,8\%$  (n=6) y  $22,1 \pm 8\%$  (n=4), respectivamente.

Se hicieron estudios morfológicos mediante citocentrifugación y tinción con May Grunwal-Gyemsa, de las células no adherentes recogidas de los mismos cultivos a los 21 y 28 días. Los porcentajes de granulocitos obtenidos fueron de  $62 \pm 1,5\%$  (n =9) y  $37 \pm 23,2\%$  (n= 2) respectivamente.

#### IV.2.3.2. Zimografía

Poblaciones celulares de neutrófilos procedentes de sangre periférica y del cultivo, así como la población Lin-, se trataron según las condiciones descritas en el apartado III.5.5.2. Después de la electroforesis, y una vez re-naturalizadas las proteínas, se incubó el gel en el tampón de digestión. En este tampón las proteínas re-naturalizadas actúan degradando la gelatina, y dando lugar a la aparición de una banda de 92 kD, específica de la MMP-9. En los análisis de neutrófilos de sangre se observó la aparición de otra banda de 72 kD. El estudio en la muestra Lin-, dio como resultado la ausencia de banda a 92 kD, característica de MMP-9 (Fig.IV.17).

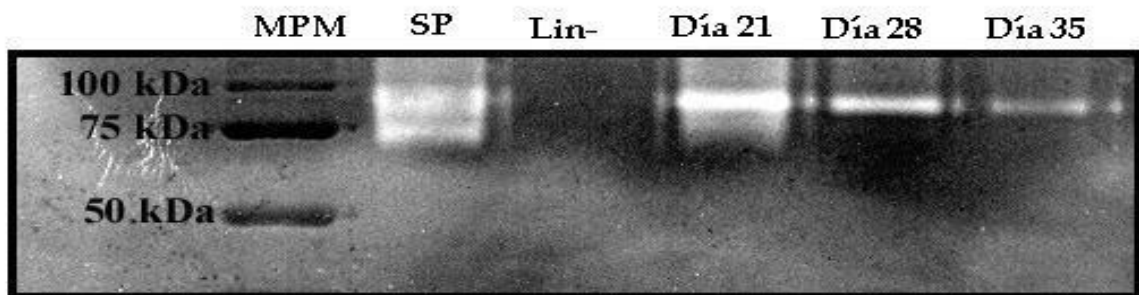


Figura.IV.17.: Expresión de MMP-9 en neutrófilos procedentes de sangre periférica (SP), de 21, 28 y 35 días de cultivo y en células Lin-. Los resultados se obtuvieron mediante zimografía, en geles de 10% de poliacrilamida con un 0,1% de gelatina. Se utilizaron entre 1000 y 5000 células por muestra. MPM, marcadores de peso molecular.

#### IV.2.3.3. Capacidad de producir ROS

Los neutrófilos maduros y funcionales en respuesta a factores quimiotácticos producen especies reactivas de oxígeno (ROS), entre ellas el peróxido de hidrógeno, capaz de transformar la DHR en su derivado fluorescente, Rh-123. Para este ensayo, los neutrófilos de 21 y 28 días de LT BMC y de sangre periférica se activaron con PMA y posteriormente se añadió la DHR a las suspensiones celulares.

Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de neutrófilos capaces de transformar la DHR y emitir fluorescencia. Este porcentaje fue de 19,5% y 13% para las poblaciones de 21 y 28 días de cultivo respectivamente. El porcentaje que se obtuvo en neutrófilos de sangre periférica fue de un 87,3%. Las células muertas se excluyeron del conteo mediante un marcaje con yoduro de propidio (IP) (Fig.IV.18).

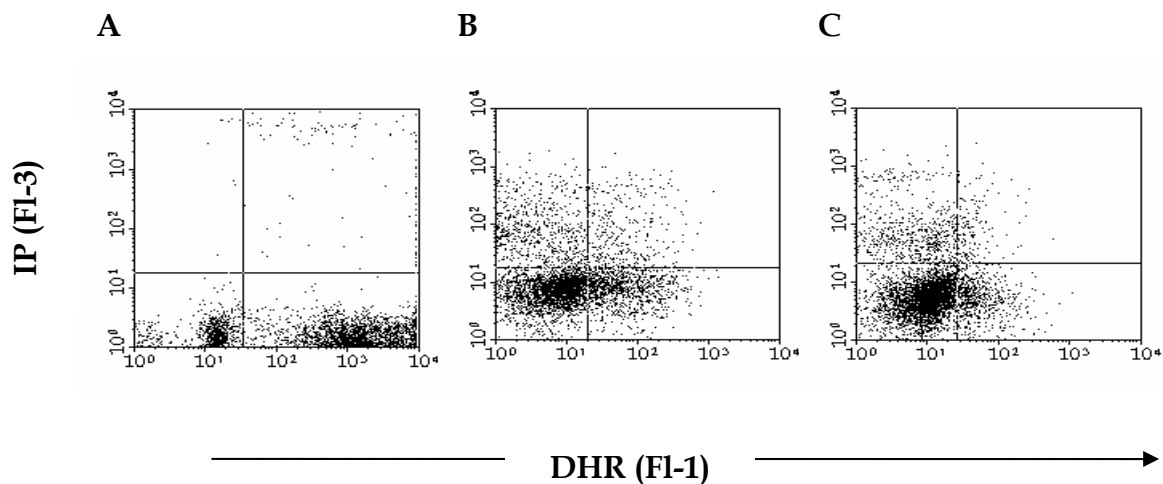


Figura.IV.18.: Dot plots obtenidos por citometría de flujo. En el eje Y esta representada la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio. (A) Neutrófilos de sangre periférica, utilizados como control positivo (87,3%). (B y C) Neutrófilos procedentes de 21 (19,5%) y 28 días (13%) de LT BMC.

### IV.3. TRANSDUCCION DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

La última parte de esta memoria consistió en el estudio de las condiciones óptimas que permitieran la transducción de los progenitores hematopoyéticos presentes en la población aislada. Este objetivo se abordó utilizando la línea celular empaquetadora (Pg-MEG-5ab), que porta el gen que expresa la proteína verde fluorescente, GFP.

#### IV.3.1. ESTUDIOS DE PRE-ESTIMULACIÓN

Nuestro primer paso fue, obtener una combinación de citoquinas adecuada así como el tiempo necesario de pre-estimulación de las células Lin- por estas moléculas, para obtener un equilibrio entre capacidad de proliferación, diferenciación y auto-mantenimiento. El establecimiento de estas condiciones nos permitió abordar posteriormente los ensayos de transducción en los progenitores hematopoyéticos de la población Lin-.

Se utilizaron cultivos líquidos con una concentración de células de partida de ( $5 \times 10^5$  células/ml), a los que se añadieron las distintas combinaciones de citoquinas para encontrar la óptima. (Figura.IV.19). En A, se muestran los incrementos en el número total de células, respecto del control, a lo largo de los días de cultivo, con las distintas combinaciones de citoquinas humanas. Los mejores resultados se lograron al añadir el factor cG-CSF canino, a la combinación hFlt-3, hIL-6, hTPO y hSCF. Con esta combinación se obtuvo un incremento de 4,1 veces en el número de células a los 16 días de cultivo. En B, se muestran los resultados obtenidos, en cuatro experimentos independientes, utilizando la combinación de citoquinas caninas y humanas (hFlt-3, hTPO, cSCF, cG-CSF). Los incrementos obtenidos varían entre 4,3-7,7 veces en el número de células respecto al control. Desde los primeros días del cultivo se puede observar este incremento en el número de células.



Por ultimo, en (C) se representa el incremento en el número de CFCs, obtenido con las distintas combinaciones de citoquinas. De todas las combinaciones analizadas, los mayores incrementos se encontraron cuando en el ensayo había citoquinas caninas.

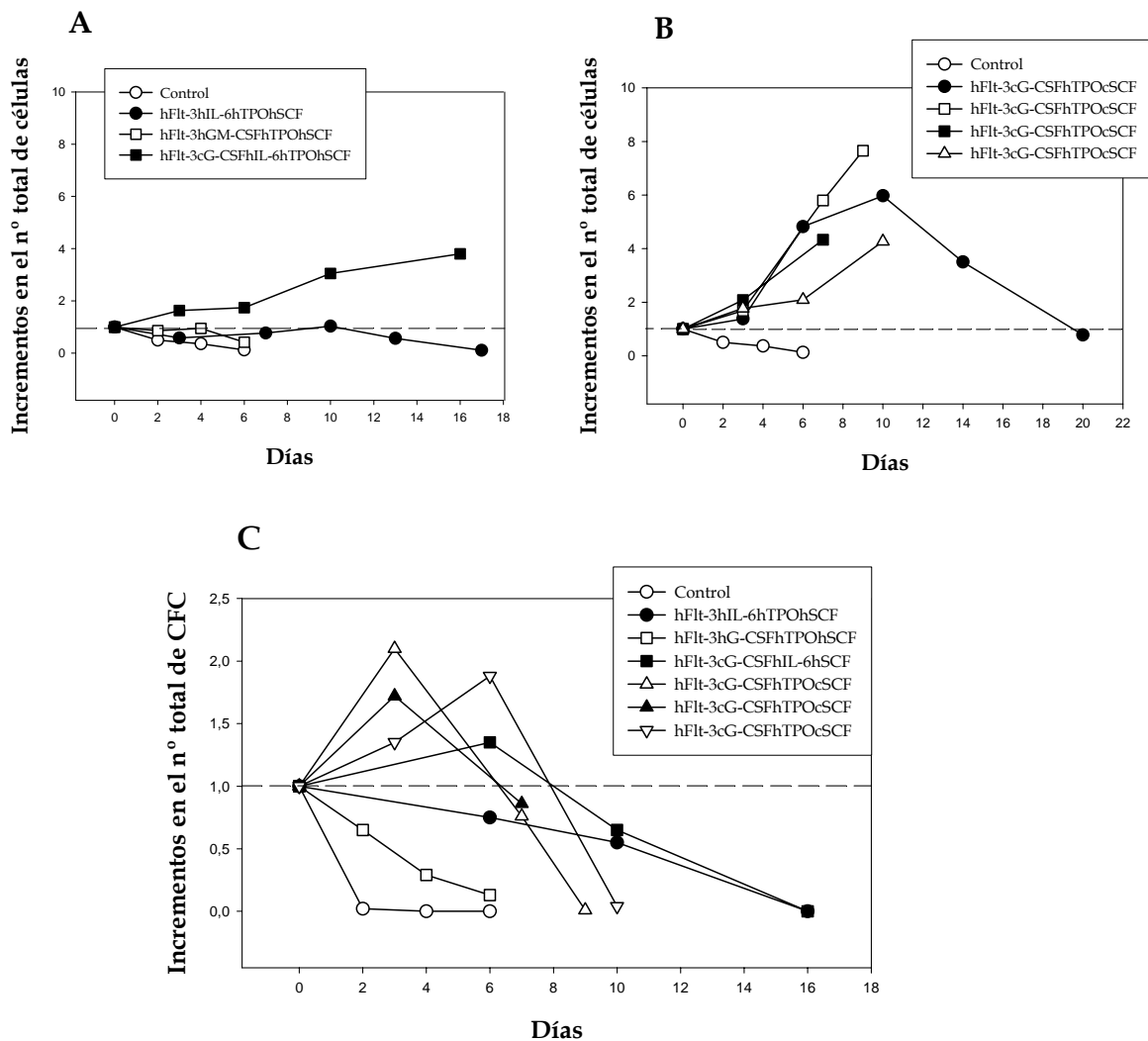


Figura.IV.19. Cultivos líquidos de células Lin- con las diferentes combinaciones de citoquinas. En (A) y (B) Se han representado los incrementos de células frente a los días en los que se realizó el ensayo. En todos los casos se utilizó una concentración de 100 ng/ml. En (C) se representan los incrementos de CFCs (procedentes de los distintos cultivos líquidos) a los días que se indica en el ensayo. Las distintas combinaciones de citoquinas se encuentran insertas en la gráfica

Una vez establecida la combinación de citoquinas más adecuada, los cultivos se mantuvieron 24, 48 y 72 horas a 38°C para determinar las condiciones óptimas en cuanto al tiempo de pre-estimulación más adecuado, (Figura.IV.20).

En la Figura IV.20.A se muestra el estudio por citometría de flujo del grado de diferenciación de la población de Lin<sup>-</sup>. En los “dot plots”, se puede observar el incremento que se produce en el porcentaje de células marcadas con la combinación de anticuerpos para células comprometidas (Thy-1+, CD15+, CD5+, IgG+ y MHCII+); este porcentaje de diferenciación fue de 12,9% a las 24 horas, de 22,9% a las 48 horas y de 39,4% a las 72 horas. Así mismo se realizó un estudio morfológico de las células del cultivo a los distintos días de pre-estimulación. En las fotografías de la Fig.IV.20.B se aprecia el grado de diferenciación. A las 24 horas se observa un predominio en el número de progenitores eritroides 38,1% y mielomonocíticos 48,7%, mientras que a las 72 horas el número estos progenitores ha disminuido a 16,5% y 39,3% respectivamente, y se produce un aumento en el número de células maduras, granulocitos segmentados y monocitos.

En la Figura.IV.21.A, está representado el incremento obtenido en el número total de células del cultivo a las 24, 48 y 72 horas. En B, se han representado los porcentajes de progenitores mieloides y eritroides a los distintos días de cultivo, obtenidos a partir del estudio morfológico representado en la Figura.IV.20.B. Como se observa, el porcentaje de progenitores mieloides se ve incrementado en las primeras 24 horas (día 1), y a partir de estas se produce un descenso. El porcentaje de progenitores eritroides va disminuyendo en el cultivo, sin embargo esta disminución es menos acentuada durante las primeras 24 horas (día 1) de pre-estimulación.

A través de estos ensayos se determinaron las 24 horas de pre-estimulación, y la combinación de citoquinas (cSCF, cG-CSF, hTPO-k y hFlt-3 a

100ng/ml) como los parámetros mas adecuados para abordar los ensayos de transducción.

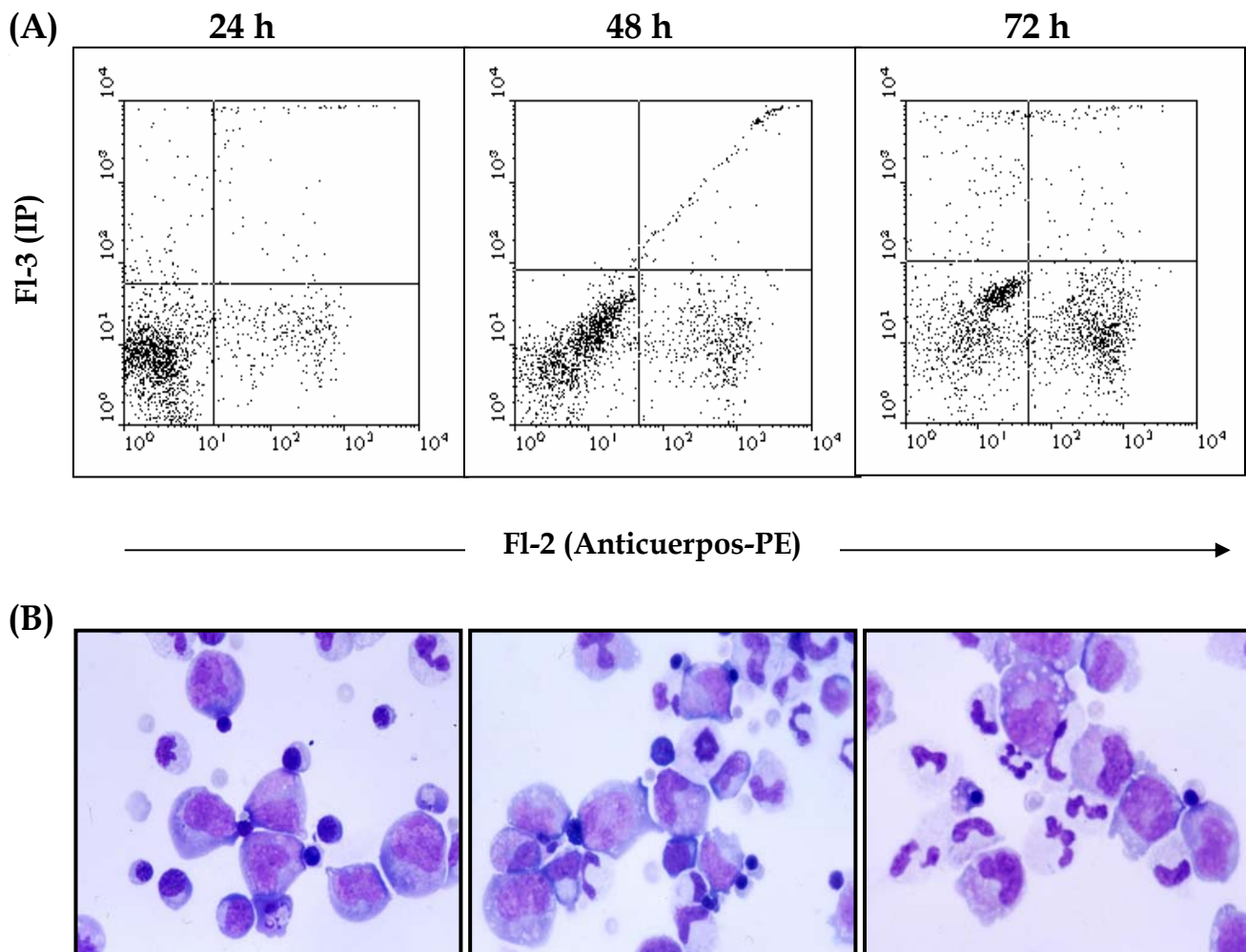


Figura.IV.20. Estudio del tiempo de pre-estimulación. (A) Para el estudio por citometría de flujo, se marcaron las células con la combinación de anticuerpos específicos de células comprometidas (Thy-1+, CD15+, CD5+, IgG+ y MHCII+) y el fluorocromo anti-*rata* conejo-PE. Las células muertas se excluyeron mediante marcaje con IP. (B) Para el estudio morfológico, se realizó una tinción May-Grunwald Giemsa. Las fotografías se realizaron a 600x aumentos.

#### IV.3.2. PROTOCOLOS DE TRASDUCCIÓN

Se ensayaron varios protocolos, con el fin de determinar el más idóneo para progenitores hematopoyéticos caninos. De forma paralela y como control,

se utilizó una población de células Lin- no transducidas, a la que se denominó Lin-control.

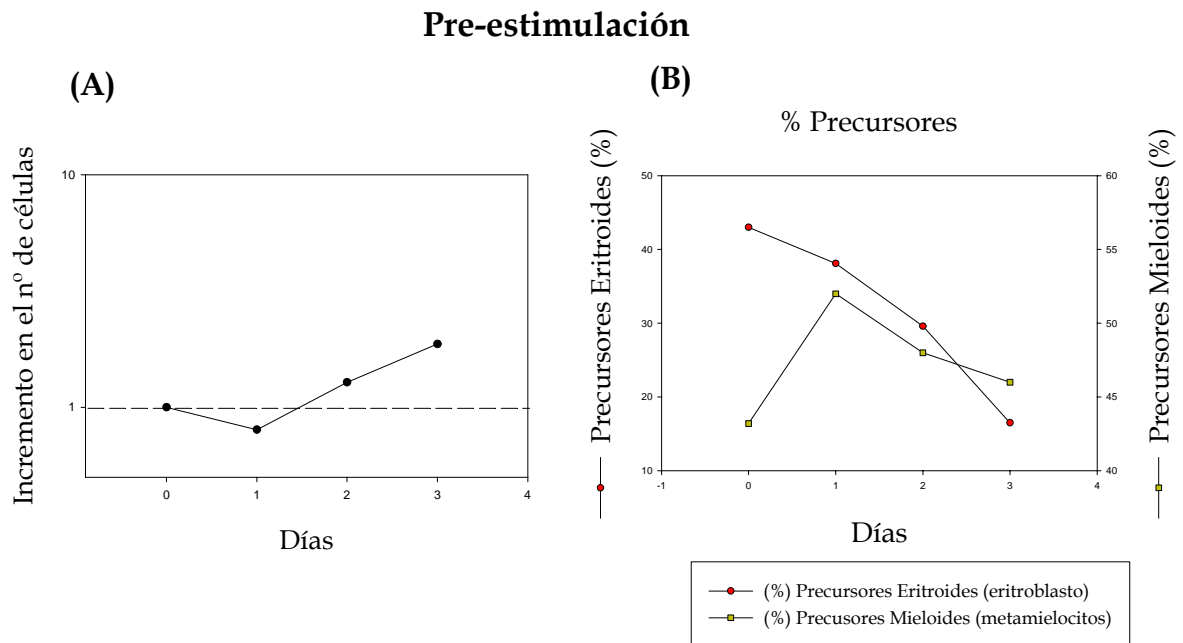


Figura.IV.21. Estudios del tiempo de pre-estimulación. (A) Incremento en el número total de células frente a los distintos tiempos de pre-estimulación escogidos (1, 2 y 3 días). (B) Porcentajes de progenitores eritroides y mielomonocíticos a los distintos días de pre-estimulación. Estos porcentajes se obtuvieron mediante estudios morfológicos de las células del cultivo.

#### IV.3.2.1. Protocolo 1

Los estudios de transducción se comenzaron con la utilización de un protocolo que constaba de dos ciclos de infección de 24 horas cada uno. Después de realizar los ciclos de infección se mantuvieron las células Lin-transducidas y Lin- control, en cultivos líquidos enriquecidos con citoquinas al menos durante 2 semanas, recogiendo conjuntamente las células adherentes y no adherentes, de forma periódica (cada 3-4 días), para efectuar un recuento del número de células y cultivos de progenitores.

En la figura IV.22 se representan los datos de supervivencia de las células en el cultivo líquido hasta el día 20 y el porcentaje de colonias que expresaban el transgen, 31% a día 3 y desciende a un 15% a día 6. En esta figura se puede apreciar un incremento paralelo en el número de células Lin- transducidas y control entre los días 3 y 6. Entre los días 6 y 10 el número de las células Lin-transducidas se mantiene estable y a partir del día 10, se produce un descenso paralelo a las células control.

Se utilizó un segundo protocolo con el fin de mejorar el porcentaje progenitores que expresaban el transgen.

#### **IV.3.2.2. Protocolo 2**

El segundo protocolo constaba de 4 ciclos de infección. Al terminar los ciclos de infección las células se mantuvieron en cultivos líquidos, en los que se recogía de forma periódica (cada 3-4 días) las células adherentes y no adherentes conjuntamente, realizando un recuento del número de células y cultivos clonogénicos. En la Figura.IV.23 están representados los resultados obtenidos con este protocolo, por un lado, se obtuvieron mejores resultados en cuanto al nº de progenitores hematopoyéticos transducidos, 45% a día 3 y un 57% a día 6. Sin embargo, los cultivos se mantuvieron hasta los 10 días, ya que durante el proceso de transducción la supervivencia celular se vio afectada. En esta figura se aprecia que, desde el primer momento el número de células Lin-transducidas en cultivo es inferior al número de células Lin- control, a día 3 el incremento de las células Lin- control es de 1,66 veces, a día 6 es de 1,91 veces y finalmente a día 9 es de 3,76 veces.

## Protocolo 1

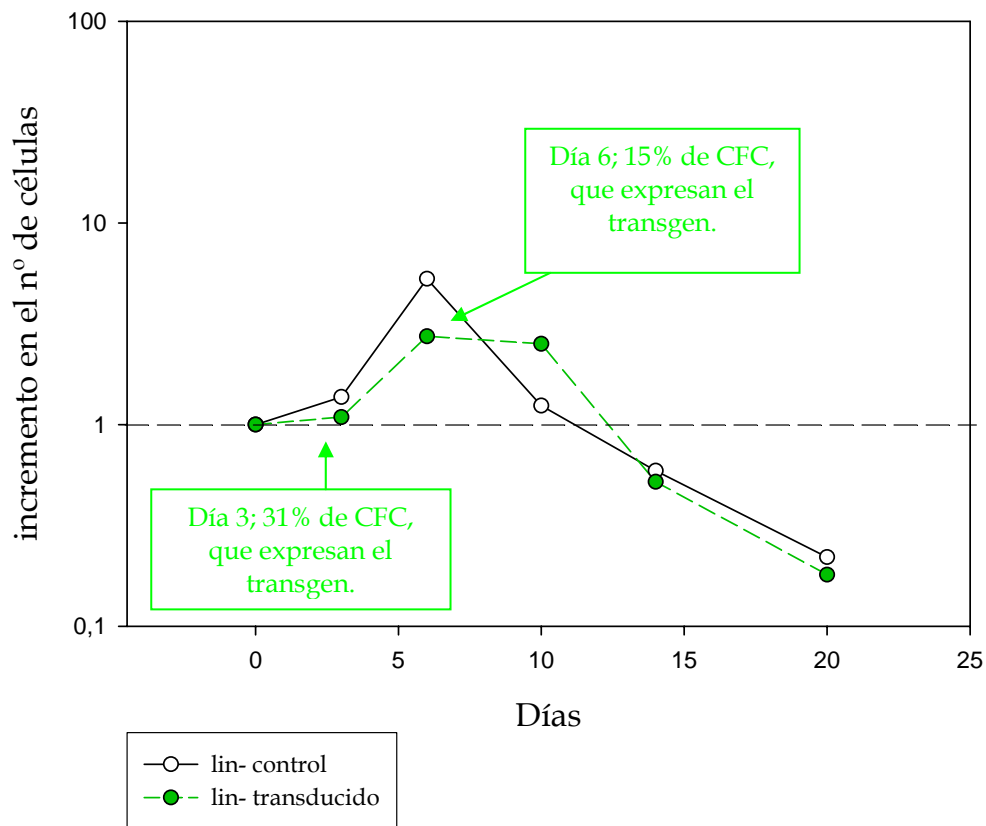


Figura.IV.22. Se ha representado el incremento en el número total de células en cultivo, tanto de células Lin- transducidas como Lin- control, frente a los 20 días de supervivencia del mismo. Así mismo, se han insertado en la gráfica los datos referentes al porcentaje de CFCs que expresan el transgen obtenidos a los 3 y 6 días del cultivo. El recuento de estas colonias se realizó a los 11 días de cultivo, utilizando un microscopio invertido de fluorescencia para la cuantificación de colonias que expresaban el transgen. El día 0 corresponde al momento en que las células son puestas en el cultivo para su pre-estimulación.

## IV.3.2.3. Protocolo 3

El tercer protocolo consta de 2 ciclos de infección de 24 horas cada uno, y en cada ciclo se realizaron 4 precargas de partículas virales sobre la capa de fibronectina, para luego añadir las células de Lin-.

Como en los protocolos anteriores, después de realizar los ciclos de infección se mantuvieron las células Lin- transducidas y Lin- control en cultivos líquidos enriquecidos con citoquinas, recogiendo las células adherentes y no adherentes conjuntamente y de forma periódica para el análisis de la expresión del transgen mediante cultivos de progenitores y recuento del número de células del cultivo.

Como se ha representado en la Figura.IV.24, el incremento en el número total de células de cultivo, a lo largo del ensayo, fue superior a los obtenidos con anteriores protocolos.

Con este protocolo se consiguió incrementar la supervivencia de las células en 3,8 veces a día 9 respecto al protocolo 1 y 24,8 veces a día 9, respecto al protocolo 2. Además el número de células Lin- transducidas se mantuvo de forma paralela al número de células Lin- control. Solo a partir del día 9 se aprecia un pequeño descenso en el número de células Lin- transducidas.

El número de colonias que expresan el transgen, obtenido con este protocolo de "pre-cargas", esta representado en la figura Fig.IV.25. Como se puede ver el número las CFC tanto de Lin- control como de Lin- transducidas se mantuvieron en paralelo durante todo el cultivo. Se realizó el recuento de las colonias que expresan el transgen y los porcentajes obtenidos fueron de 45% a día 3 y 68% a día 7.

En la Fig.IV.26, se muestra una colonia con alta intensidad de expresión del transgen.

## Protocolo 2

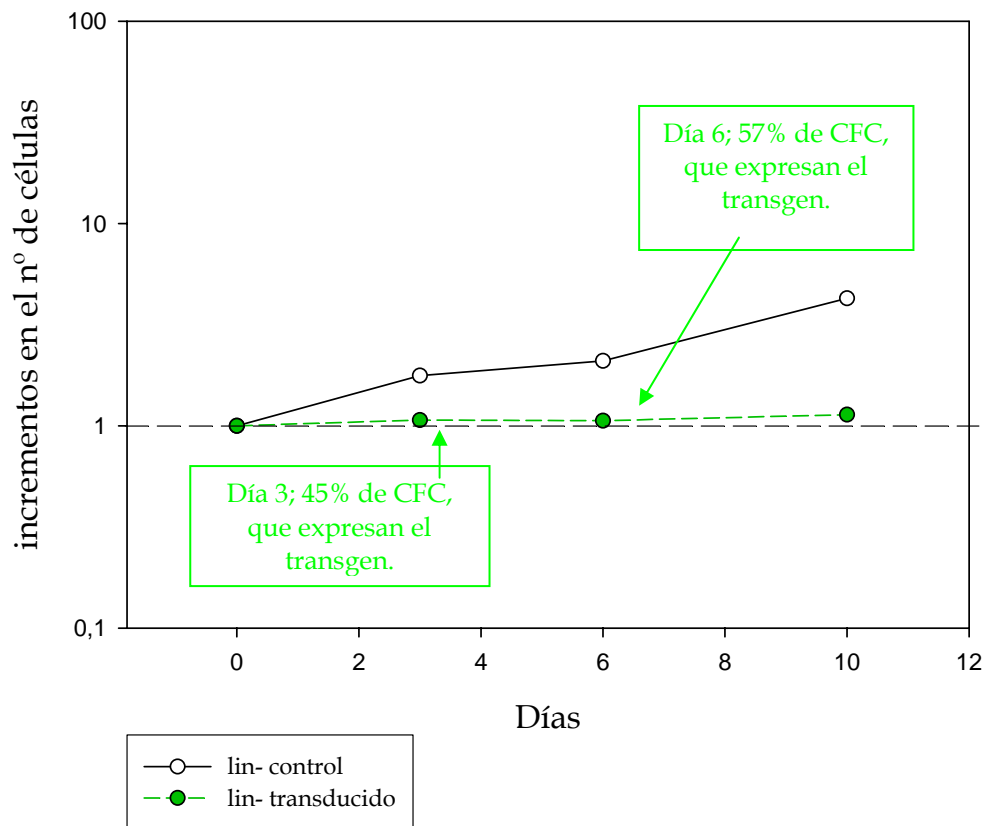


Figura.IV.23. Representación del incremento en el número total de células en cultivo, tanto de células Lin- transducidas como Lin- control, frente a la supervivencia del mismo. En la gráfica se han insertado los porcentajes de CFCs que expresan el transgen a los días 3 y 6 de cultivo. El recuento de estas colonias se realizó a los 11 días de cultivo, utilizando un microscopio invertido de fluorescencia para la determinación de colonias que expresaban el transgen. El día 0 corresponde al momento en que las células son puestas en el cultivo para su pre-estimulación.



## Protocolo 3

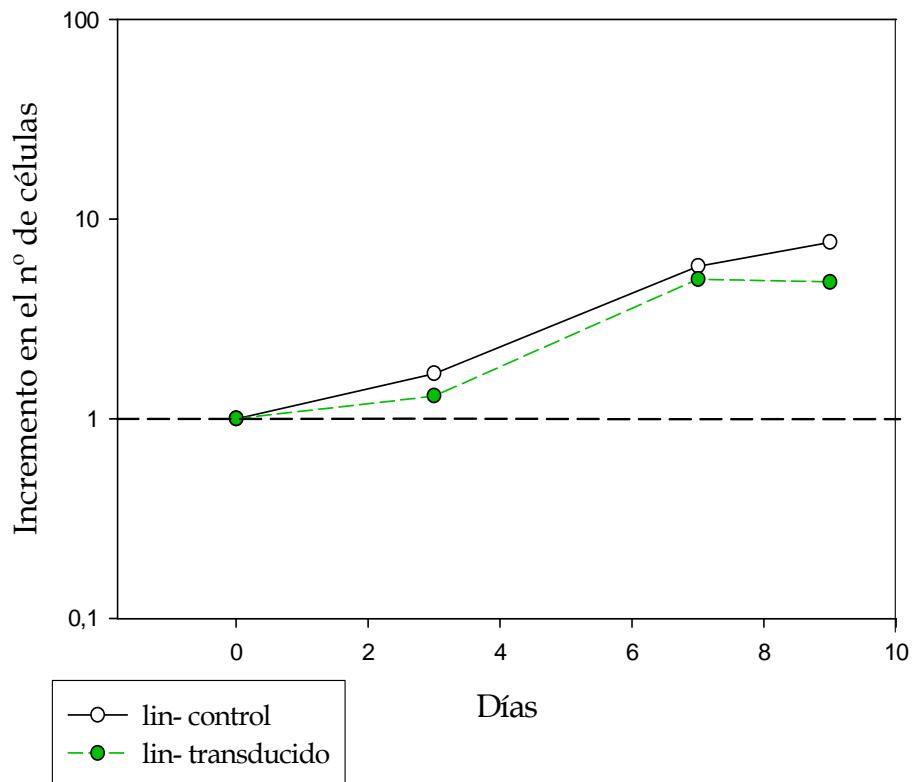


Figura.IV.24. Se ha representado el incremento en el número total de células en cultivo frente a la supervivencia de dichas células, días de cultivo. Están representadas las células Lin-transducidas y control. El día 0 corresponde al momento en que las células son puestas en el cultivo para su pre-estimulación.

## CFC Protocolo 3

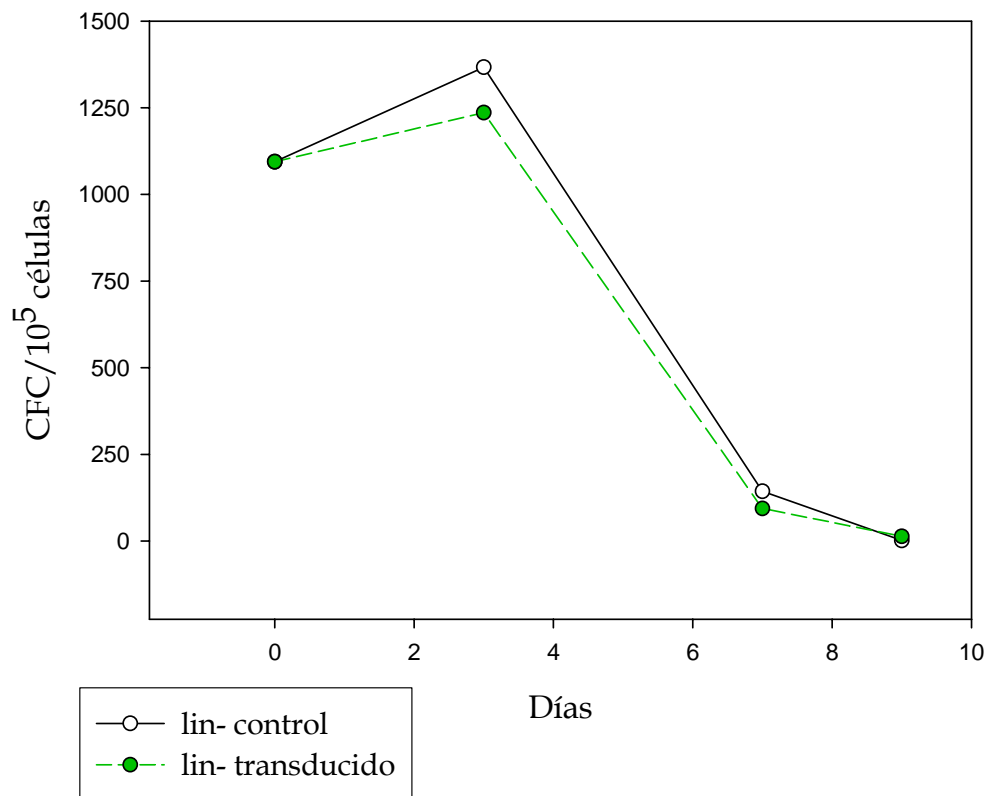


Figura.IV.25. Se ha representado el número de CFC/10<sup>5</sup> células obtenidas a diferentes días del ensayo. Los cultivos clonogénicos se realizaron con células Lin- transducidas y Lin- control de forma paralela. El recuento de estas colonias se realizó a los 11 días de cultivo, utilizando un microscopio invertido de fluorescencia para la determinación de colonias que expresaban el transgen. El día 0 corresponde al momento en que las células son puestas en el cultivo para su pre-estimulación.

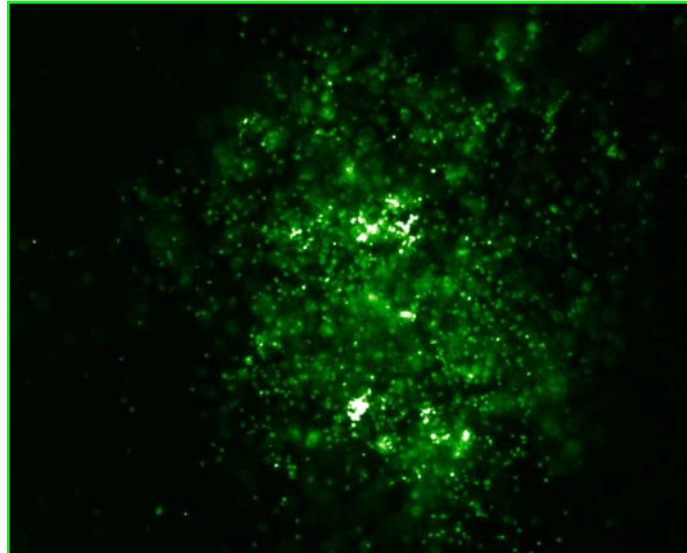


Figura IV.26. Colonia que expresa el transgen. Los recuentos y las fotografías de estas colonias fueron realizados en un microscopio invertido con luz ultravioleta, 100 x aumentos.

## V. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis ha sido la transducción de células madre hematopoyéticas caninas con un gen marcador, en nuestro caso, el gen que expresa la proteína verde fluorescente, GFP. Para alcanzar este objetivo se han abordado diversas aproximaciones experimentales que engloban los diversos objetivos parciales. Se eligió al perro para este estudio, ya que puede ser un modelo preclínico apropiado para el desarrollo de nuevas estrategias en el campo del trasplante de médula ósea y de la terapia génica humana.

Dado que uno de los primeros objetivos de nuestro trabajo era aislar e identificar células madre y progenitores hematopoyéticos caninos, se optimizaron las condiciones necesarias para el crecimiento *in vitro* de estas células. Los cultivos clonogénicos se pusieron a punto utilizando células mononucleares de médula ósea, con citoquinas humanas y caninas.

Para los ensayos con citoquinas humanas, el número de células de partida fue de  $7,5 \times 10^4$  células/ml, la elección de este número de células se realizó teniendo en cuenta que el número de colonias obtenido no fuera muy elevado ( $\leq 500$ /ml), y que por tanto fuera posible su identificación y cuantificación (datos preliminares que no se muestran). Los resultados obtenidos por nosotros utilizando diferentes combinaciones de citoquinas (Tabla IV.1), indican como las más adecuadas (hGM-CSF y hEPO) ( $120 \pm 23$  CFC/ $10^5$  células), y (hGM-CSF, hSCF y hEPO) ( $125 \pm 2,4$  CFC/ $10^5$  células). Al no existir diferencias significativas ( $P > 0,8$ ) en cuanto al número de colonias obtenido optamos por la combinación hGM-CSF y hEPO debido a que el coste del hSCF resultaba excesivo. Esta combinación, por tanto, fue la que se utilizó posteriormente con las células aisladas CD34+ y Lin-. Otros autores, han utilizado otras combinaciones tanto para células de ratón (Escribano y col., 1997, hGM-CSF, hIL-6 e hIL-3), (Yan y col., 2003, hMGDF, hFlt-3, mSCF y mL-6), como para células humanas (Flores-Guzmán y col., 2002, hSCF, hIL-3, hGM-CSF y hEPO). Lo mismo sucede con las concentraciones utilizadas para estas citoquinas, que varían de 10 ng/ml de hGM-CSF (Flores-Guzmán y col., 2002) a

200 ng/ml para la misma citoquina (Neuner y col., 1997). En nuestro caso la concentración utilizada fue de 100 ng/ml para hFlt-3, hSCF, hGM-CSF, hTPO e hIL-6, y de 1 U/ml para hEPO.

La hIL-6 y el hFlt-3 no parecen tener un efecto sinérgico sobre nuestras células, ya que las colonias obtenidas con estos factores no son superiores ni en tamaño (datos que no se muestran) ni en número. En cambio, algunos autores sí han descrito un aumento del tamaño de las mismas al utilizar hIL-6 en células murinas (Escribano y col., 1997).

A partir del acuerdo comercial alcanzado con AMGEN se pusieron a punto las condiciones para la utilización de las citoquinas caninas cG-CSF y cSCF. En los ensayos clonogénicos con estas citoquinas, se utilizó la misma concentración que para citoquinas humanas (100 ng/ml). Otros autores utilizan también esta concentración para citoquinas caninas (Bruno y col., 1999; Goerner y col., 1999), la hEPO se añadió a 1 U/ml.

Para estas citoquinas caninas se realizaron distintos ensayos para fijar el número más adecuado de células de partida. Al no existir diferencias significativas ( $P > 0,7$ ) entre los resultados obtenidos utilizando  $7,5 \times 10^4$  células/ml y los obtenidos con  $5 \times 10^4$  células/ml (Tabla IV.2), se eligió la concentración de  $7,5 \times 10^4$  células/ml, por ser la utilizada para citoquinas humanas. Sin embargo, el número de colonias obtenido con estas citoquinas (Tabla.IV.2), es significativamente superior ( $P < 0,001$ ) al obtenido con las citoquinas humanas; este hecho pone de manifiesto la especificidad de las citoquinas caninas.

En la mayoría de los estudios con células madre hematopoyéticas, murinas y humanas, se utiliza la selección positiva para el aislamiento de dichas células. Esta metodología está favorecida por la amplia gama de anticuerpos murinos y humanos disponibles en el mercado, CD34, Sca-1 y c-Kit (Baum y

col., 1992; Uchida y Weissman, 1992; Orlic y col., 1993) y desarrollados por importantes compañías de la industria bio-tecnológica. En el perro la disponibilidad de anticuerpos específicos ha estado mucho más limitada, ya que el cDNA correspondiente al CD34 canino ha sido recientemente clonado y el correspondiente anticuerpo descrito (McSweeney y col., 1996; McSweeney y col., 1998).

Nuestros estudios comenzaron con el aislamiento por inmunoselección positiva (MACS®), de las células primitivas caninas utilizando un anticuerpo específico, 6C9 (IgG2a rata anti-CD34 canino) descrito en el apartado III.3.4.

Con el anticuerpo 6C9 se aisló una población de células CD34+, el porcentaje de estas células marcadas fue de  $58,5 \pm 6,3\%$ , lo que supone un incremento respecto al porcentaje de células mononucleares marcadas  $6,9 \pm 2,3\%$  (Fig.IV.1). En esta misma figura se puede observar la aparición de dos picos bien diferenciados dentro de la población marcada con 6C9, lo que sugiere la existencia de dos poblaciones con distinta afinidad. El porcentaje de las células aisladas y marcadas con este anticuerpo ( $58,5 \pm 6,3\%$ ), se halla entre los valores descritos por otros autores utilizando el anticuerpo comercial 1H6 (McSweeney y col., 1998).

Al contrario de lo esperado, no se obtuvieron incrementos de CFCs en los cultivos clonogénicos a partir de las células aisladas con el 6C9 ( $87 \pm 1$  CFC/ $10^5$  células), respecto al número obtenido con células mononucleares ( $120 \pm 23$  CFC/ $10^5$  células). Estos resultados sugieren que el anticuerpo 6C9 estaría marcando otras poblaciones celulares, además de la población de progenitores hematopoyéticos.

Anteriormente se ha descrito la existencia de dos poblaciones bien diferenciadas, dos picos en el histograma (Fig.IV.1), observados en el estudio por citometría de flujo de las células aisladas con el anticuerpo 6C9. Del estudio

de tamaño y complejidad se corroboró la existencia de estas dos poblaciones (Fig.IV.2.). Para confirmar estos resultados, decidimos realizar una separación mediante FACS, denominando a las poblaciones CD34<sup>+baja</sup> y CD34<sup>+alta</sup>. Estas dos poblaciones fueron analizadas respecto a sus diferencias en tamaño y complejidad celular (Fig.IV.3.). La única con características de progenitores hematopoyéticos fue la población CD34<sup>+baja</sup> compuesta por células de escasa complejidad y pequeño tamaño, características que se corresponden con la descripción dada por Niemeyer y col (2001) y Suter y col (2004), para progenitores hematopoyéticos. Estos resultados confirman lo sugerido anteriormente, el anticuerpo 6C9 se une a dos poblaciones claramente diferenciadas. La población de progenitores queda, por tanto, englobada en una población más amplia de células.

Como alternativa al 6C9, se utilizó el anticuerpo comercial 1H6 para la selección positiva. Con este anticuerpo obtuvimos un porcentaje de células marcadas de  $13,2 \pm 2,6\%$ , con un único pico en el perfil del histograma. Al realizar cultivos clonogénicos con las células CD34<sup>+</sup> aisladas, el número de colonias obtenido fue de  $390 \pm 30$  CFC/ $10^5$  células, lo que supone un incremento de 3,3 veces respecto al número de colonias obtenido con las células mononucleares. Este incremento en el número de colonias, se encuentran en el rango de los descritos por McSweeney y col (1998) siendo estos de 2,1; 4,6 y 18 veces.

Sin embargo, el escaso enriquecimiento obtenido en progenitores hematopoyéticos con este anticuerpo comercial, junto a su elevado coste, hacían inviable su utilización a lo largo de este trabajo. Nos planteamos, por tanto, la selección negativa como una alternativa para la obtención de una población enriquecida en progenitores hematopoyéticos.

El proceso de inmunoselección negativa (MACS<sup>®</sup>), se llevó a cabo utilizando la combinación de anticuerpos descritos en el apartado III.3.4. En los



histogramas obtenidos en el estudio de estos anticuerpos, (Fig.IV.6), se aprecia un perfil de poblaciones bien definidas. Estos datos se ampliaron mediante un estudio individualizado de cada población, respecto a su tamaño y complejidad. Contrastando nuestros resultados con otros trabajos (Weiss y col., 2000; Weiss, 2002), podemos decir que, el anticuerpo CD15 marca poblaciones de granulocitos maduros, y los anticuerpos CD5 e IgG marcan poblaciones de células T y B respectivamente. Por otra parte, los porcentajes de las células marcadas, son similares a los encontrados por Neuner y col (1997) para CD5, CD15 e IgG en células mononucleares.

En las poblaciones de células marcadas, Thy-1+ y MHCII+, aparece una pequeña fracción de células con características de tamaño y complejidad similares a las de progenitores hematopoyéticos, por este motivo y dada la controversia levantada en torno a si los progenitores hematopoyéticos de perro expresan o no estos antígenos, se profundizó en su análisis. La ausencia, y el no enriquecimiento en CFCs en células Thy-1+ y MHCII+, apartado IV.1.3.1, descartan que las células que expresan estos antígenos pertenezcan a la población de progenitores hematopoyéticos. Lo que nos ha permitido incluir estos anticuerpos, anti-Thy-1 y anti-MHCII, en la combinación usada en selección negativa. Otros autores (Neuner y col., 1997; Faldyna y col., 2003) han descrito resultados semejantes para el MHCII. Sin embargo, Neuner y col (1997) describen una población Thy-1<sup>baja</sup>, aislada mediante FACS, enriquecida en progenitores hematopoyéticos.

Mediante selección negativa se obtuvo un  $16,3 \pm 0,5\%$  de células Lin-, respecto al total de células mononucleares de partida. Este porcentaje de células es del mismo orden de magnitud, al obtenido por Niemeyer y col (2001) (20%), utilizando una combinación de seis anticuerpos comerciales que se unen a células CD5+, CD8+, CD14+, MHCII, neutrófilos, células B y plaquetas. La pureza de nuestra población Lin- fue del 94%, siendo semejante a la obtenida por otros autores mediante selección negativa, 93-95% Neuner y col (1997).

Flores-Guzmán y col (2002) para muestras de cordón, utiliza una combinación de 9 anticuerpos que marcan células CD2+, CD3+, CD14+, CD16+, CD19+, CD24+, CD56+, CD66b+ y glicoforina A, y obtiene un enriquecimiento de 35 veces en CFCs.

En los cultivos clonogénicos realizados en la población Lin-, utilizando citoquinas humanas, hemos obtenido incrementos en el número de colonias de  $4,3 \pm 0,7$  veces para GM-CFC y de  $6 \pm 0,3$  veces para BFU-E, respecto al número a partir de células mononucleares, Fig.IV.8. Respecto a los datos con citoquinas caninas, hemos encontrado un incremento de  $4,7 \pm 0,7$  veces en el total de CFCs (Fig.IV.9). Estos incrementos son semejantes a los obtenidos con citoquinas humanas. De hecho no existen diferencias significativas ( $P > 0,5$ ), lo que indica la validez de las dos combinaciones utilizadas en los ensayos de cultivos clonogénicos, ya que, la especificidad de las citoquinas caninas, mencionada previamente, afecta de la misma manera a la población de células mononucleares y Lin-. Otros autores, (Niemeyer y col., 2001), han descrito incrementos de 3,7 veces para GM-CFC y de dos veces para BFU-E, utilizando citoquinas caninas.

Estos incrementos en el número de CFCs, fueron confirmados con estudios morfológicos, que indican un incremento muy significativo en el número de progenitores eritroides de 2,6 veces y mieloides de 4,7 veces, (Fig.IV.10). Otros autores, han descrito incrementos de 3,5 veces para progenitores eritroides y 1,7 veces para progenitores mieloides (Niemeyer y col., 2001). En poblaciones Lin- de cordón humano se han descrito incrementos parecidos (Flores-Guzmán y col., 2002).

Referente a los resultados obtenidos con el marcaje de Rh-123, en células mononucleares y Lin- aparece una población de baja intensidad de fluorescencia denominada Rh-123<sup>baja</sup>, (Fig.IV.11). La capacidad de los progenitores hematopoyéticos para retener bajas cantidades de la Rh-123 ha

sido descrita por varios autores, en células humanas (Udomsakdi y col., 1991; Uchida y col., 1996; Liu y Verfaillie, 2002), en ratón (Szilvassy, 2003; Bertoncello y Williams, 2004) y en el perro (Niemeyer y col., 2001).

Nuestros resultados muestran un incremento de dos veces en la población Lin-/Rh-123<sup>baja</sup>, respecto a células mononucleares. Esta población Lin-/Rh-123<sup>baja</sup>, aislada por FACS con una pureza del  $78 \pm 5\%$ , dio lugar a CFCs en cultivos clonogénicos, siendo la morfología de estas colonias de aspecto compacto y células pequeñas (Fig.IV.13). La aparición de estas colonias a los 16 días de cultivo junto con su morfología específica, nos permite apuntar la presencia de progenitores hematopoyéticos más inmaduros en la población marcada con Rh-123<sup>baja</sup>.

En paralelo, y para confirmar lo descrito por citometría de flujo y cultivos clonogénicos, se realizaron estudios morfológicos de la población Lin-/Rh-123<sup>baja</sup>; estos estudios indican que el 50% son células nucleadas con aspecto mielo-linfoblastoide y ausencia de gránulos diferenciados.

Por todo ello, podemos decir que hemos cumplido con el primer objetivo concreto propuesto en este trabajo, ya que los ensayos clonogénicos, y las técnicas inmunológicas y morfológicas, empleadas en este estudio, nos han permitido aislar y caracterizar una población Lin- enriquecida en progenitores hematopoyéticos.

Es importante hacer constar, como ya hemos mencionado, el escaso número de trabajos encontrados en médula ósea canina, ya sea utilizando selección positiva o negativa. La mayoría de los trabajos, han sido realizados en ratón y en humano, gracias a la amplia gama de reactivos disponibles en el mercado bio-tecnológico para estas especies.

Los resultados obtenidos nos permitieron abordar el segundo objetivo de esta tesis, en el cual, partiendo de esta población enriquecida en progenitores

hematopoyéticos, determinamos su capacidad para anidar, proliferar y diferenciarse en sistemas *in vitro*, dando una progenie madura y funcional.

Los sistemas de cultivos de larga duración de médula ósea canina utilizados para este estudio están basados en nuestra propia experiencia (Fermín y col., 2004; Escribano y col., 1997). Este tipo de sistemas *in vitro* permite el desarrollo de LTC-IC, las cuales se pueden correlacionar con las llamadas LTRC, en ensayos *in vivo* (Ploemacher y col., 1989; Craddock, 2000). Las LTC-IC obtenidas al cabo de 35 y 49 días de cultivo, (apartado IV.2.2 y Fig.IV.16) confirman la presencia de células, con capacidad de reconstituir a largo plazo el sistema hematopoyético. Otra característica que hemos podido demostrar gracias a estos sistemas *in vitro* a sido la capacidad de las Lin- para anidar, requisito fundamental para proliferar y diferenciarse en progenie funcional. Frimberger y col., (2001) han utilizado los LTBMCM como herramienta para determinar el "homing" de progenitores hematopoyéticos. La presencia de LTC-IC ha sido descrita por otros autores en poblaciones aisladas mediante selección positiva (Liu y Verfaillie, 2002; Forraz y col., 2004).

Los datos obtenidos, en cuanto a los neutrófilos marcados con el anticuerpo CD15, procedentes de células mononucleares y sangre periférica, (Fig.IV.6 y apartado IV.1.3.1) nos sirvieron, junto con los descritos en la literatura, como referencia para compararlos con los obtenidos a partir de nuestros sistemas *in vitro*. Los neutrófilos procedentes de cultivos se encuentran por tamaño y complejidad dentro de la región, que para este tipo de células, ha sido descrita por Weiss y col., (2000); y Weiss, (2002); para la especie canina Lieber y col., (2004) y para células murinas. El anticuerpo CD15, utilizado en esta memoria reconoce un 70% de neutrófilos de sangre periférica, porcentaje que se confirma en recuentos de preparaciones citológicas 93% (Fermín y col., 2004). Los porcentajes de neutrófilos marcados con el CD15 a los 21 y 28 días de cultivo fueron 60,9% y 22,1% respectivamente, datos que también se

correlacionan con los obtenidos mediante recuentos citológicos 62% y 37% (Fig.IV.16).

Por otro lado, la síntesis de metaloproteinasas, concretamente la MMP-9, (Fig.IV.17), es la primera vez que se describe en neutrófilos caninos tanto de sangre periférica como en los producidos en sistemas *in vitro*. En las muestras de neutrófilos de sangre periférica, y de neutrófilos de 21, 28 y 35 días de cultivo, aparece una banda de digestión a 92 kD, característica de las MMP-9. En la muestra de Lin- no se observó dicha actividad enzimática, debido al buen funcionamiento de la selección negativa, capaz de eliminar estas células. Otros autores han descrito la presencia de esta metaloproteinasa en neutrófilos humanos procedentes de sangre periférica (Borregaard y col., 1995; Pugin y col., 1998; Ries y col., 1999).

Por ultimo, se analizó la capacidad de la NADPH oxidasa para producir especies reactivas de oxígeno. En la Fig.IV.18 están representados los resultados obtenidos con neutrófilos de sangre periférica, utilizados como control positivo, y de neutrófilos de 21 y 28 días de cultivo. Los porcentajes obtenidos indican la presencia de neutrófilos maduros, capaces de producir especies reactivas de oxígeno. Estos resultados demuestran la existencia y actividad de los mecanismos oxidativos de defensa inespecíficos en neutrófilos procedentes de la proliferación y diferenciación la población Lin-; hecho que se describe por primera vez en este trabajo.

Para garantizar el éxito de los trasplantes de células madre hematopoyéticas, es fundamental, que estas sean capaces de anidar, proliferar y diferenciarse dando una progenie madura y funcional. El conjunto de los resultados obtenidos con nuestro modelo *in vitro*, nos asegura la capacidad de repoblación a largo plazo de la población Lin-, así como su capacidad para anidar y proliferar dando lugar a células maduras funcionales, neutrófilos CD15+, que producen metaloproteinasa y anión superóxido. Estos neutrófilos

funcionales serán capaces de llegar a los focos de infección y garantizar los mecanismos de defensa contra infecciones inespecíficas.

El tercer y último objetivo de este estudio ha consistido en el diseño de un protocolo de transferencia génica adecuado a nuestra población enriquecida de progenitores hematopoyéticos caninos.

En los estudios de transferencia génica hemos utilizado la línea empaquetadora (Pg-MEG-5ab) con el gen que expresa la proteína verde fluorescente, GFP, para poder hacer un seguimiento de las células transducidas y su progenie.

Algunas de las condiciones más importantes a la hora de utilizar los onco-retrovirus en transferencia génica, son la combinación de citoquinas y los tiempos de pre-estimulación adecuados. Nuestros estudios comenzaron, por tanto, con la determinación de estos parámetros.

Comenzamos ensayando diversas combinaciones de citoquinas humanas, con las que no se observaron grandes incrementos en el número de células en los cultivos (Fig.IV.19.A), sobre todo si los comparamos con los incrementos obtenidos con la combinación de citoquinas caninas y humanas (Fig.IV.19.B). Este hecho se debe a la gran especificidad de estas citoquinas, ya que son capaces de estimular de forma más efectiva a los progenitores caninos. Así mismo, esta especificidad se ve reflejada en los mayores incrementos obtenidos en las CFCs (Fig.IV.19.C) en aquellas combinaciones en las que hay citoquinas caninas. El conjunto de estos resultados indica que la combinación más adecuada para nuestras células es cSCF, cG-CSF, hTPO, hFlt-3, a una concentración de 100 ng/ml. Otros autores han utilizado para la pre-estimulación de progenitores hematopoyéticos, combinaciones muy diferentes tales como mSCF, mIL-3, hIL-11 y hFL en ratón (Li y col., 2003), y otras más similares como las de Dorrell y col., (2000) (hIL-6, hG-CSF, hSCF y hFlt-3); Barquinero y col., (2000) (hMGDF, hSCF, hFlt-3, hIL-6 y hIL-3); Abonour y col.,

(2000) (hSCF, hIL-6, hTPO y hG-CSF); y Aiuti y col., (2002) (hIL-3, hIL-6, hSCF y hFlt-3) en humano, así como (hFlt-3, cSCF, cG-CSF) de Goerner y col., (2001) en células caninas.

En cuanto al tiempo de pre-estimulación, se realizaron ensayos para determinar el grado de expansión y diferenciación a las 24, 48 y 72 horas (Fig.IV.20.). El grado de diferenciación, cuantificado mediante la población Lin+, aumenta desde un 12,9% a las 24 hasta un 39,4% a las 72 horas, (A). Este grado de diferenciación se ve confirmado con los resultados del estudio morfológico, ya que a las 72 horas se hace patente un aumento de granulocitos segmentados, mientras que, a las 24 horas existía un predominio de la presencia de progenitores eritroides y mielomonocíticos (B). Al representar estos datos, observamos que durante las primeras 24 horas el número de progenitores mieloides se ve incrementado, y la disminución de los progenitores eritroides es menos acentuada, (Fig.IV.21.B). Sobre la base de estos resultados, se optó por las 24 horas como el tiempo idóneo para la pre-estimulación de nuestras células. Otros autores también han descrito las primeras 24 horas como las más adecuadas en protocolos de transducción con vectores onco-retrovirales. (Goerner y col., 1999; Cavazzana-Calvo y col., 2000; Abonour y col., 2000; Goerner y col., 2001; Aiuti y col., 2002).

Una vez establecidas las condiciones idóneas de pre-estimulación, comenzamos los ensayos de transducción, en los cuales se contrastaron tres protocolos diferentes.

Entre los protocolos 1 y 2 existen diferencias, en cuanto al número de ciclos de infección y al tiempo de centrifugación, que han de tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos con cada protocolo. El protocolo 1 consta de dos ciclos de infección, en los cuales se evita que las células Lin- entren en contacto con el sobrenadante filtrado de las partículas virales. Los resultados obtenidos con este protocolo indican una buena supervivencia de las

células en el cultivo. Sin embargo, los porcentajes de colonias que expresan el transgen no son muy elevados, 31% a día 3 y 15% a día 6 (Fig.IV.22). En el protocolo 2 el número de ciclos de infección se aumentó hasta 4, y los ciclos se realizaron utilizando el sobrenadante filtrado, apartado III.5.6.2. Con este protocolo se mejoró el porcentaje de células que expresan el transgen, 45% a día 3 y 57% a día 6 (Fig.IV.23), pero se produjo una notable disminución de la supervivencia de las células en el cultivo.

De estos resultados podemos deducir que, por un lado, el número de ciclos es importante para la eficacia de la transducción, y por otro lado, que el contacto de las células con el sobrenadante viral produce una disminución en la supervivencia de dichas células, (debido seguramente a la presencia de sustancias tóxicas, imposibles de eliminar mediante filtración). Así mismo, hay que decir que la diferencia, en los porcentajes de CFC que expresan el transgen, entre ambos protocolos, podría atribuirse también a un aumento de 30 minutos en el tiempo de centrifugación en el protocolo 2. Otros autores han descrito la importancia en los tiempos de centrifugación a la hora de mejorar los porcentajes de transducción, (Kühlcke y col., 2002). La centrifugación de los cultivos, como método para favorecer la unión de las partículas virales y las células diana, ha sido descrita y utilizada favorablemente por Brenner y Malech, (2003), y Li y col., (2003).

Estos resultados nos hicieron plantearnos la necesidad de buscar una alternativa a los protocolos utilizados. De tal manera que desarrollamos un método que consistía en realizar hasta 8 cargas de partículas virales entre los dos ciclos de infección, evitando que las células Lin- estuviesen en contacto con el sobrenadante filtrado de las partículas virales (descrito en el apartado III.5.6.3). Con este protocolo de "pre-cargas" se ha conseguido, por un lado, incrementar la supervivencia de las células en cultivo en 3,8 veces y 24,8 veces en relación a los protocolos 1 y 2 respectivamente, (Fig.IV.24), y por otro lado, obtener un 45-59% a día 3 y un 68% a día 7, de colonias que expresaban el



transgen (Fig.IV.25). Este porcentaje del 68% en CFCs es semejante a los descritos por otros autores para progenitores hematopoyéticos utilizando vectores onco-retrovirales (69,8%) para células de ratón (Li y col., 2003). Así mismo, estos resultados son similares a los obtenidos por Horn y col., (2004a), con progenitores hematopoyéticos caninos utilizando vectores lentivirales.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. - El anticuerpo 6C9 se une a dos poblaciones claramente diferenciadas, de las que solo una de ellas posee un tamaño y complejidad característicos de células inmaduras. La falta de enriquecimiento en progenitores hematopoyético, en la población "6C9+" sugiere que por el momento, este anticuerpo no es una herramienta adecuada para la purificación y aislamiento de progenitores hematopoyéticos caninos.
2. - La utilización de anticuerpos monoclonales específicos para células linaje positivo caninas, nos ha permitido obtener, una población Lin-enriquecida en células CD34+ y Rh-123<sup>baja</sup>. El incremento en progenitores mielomonocíticos y eritroides en esta población, ha sido cuantificado mediante cultivos clonogénicos y estudios morfológicos.
3. - En este trabajo se describe por primera vez, la generación *in vitro* de neutrófilos caninos, con capacidad para llegar a los focos de infección y garantizar los mecanismos de defensa contra infecciones inespecíficas. El conjunto de los resultados obtenidos con nuestro modelo *in vitro*, nos asegura la capacidad de repoblación de la población Lin- ; requisito fundamental para garantizar el éxito de los trasplantes de células madre hematopoyéticas.
4. - Los altos porcentajes de transducción obtenidos en progenitores hematopoyéticos caninos deben ser atribuidos, fundamentalmente, a la especificidad de las citoquinas caninas, y al desarrollo de un protocolo de transducción que se caracteriza por el incremento del número de partículas virales sobre la capa de fibronectina y la ausencia de contacto entre el sobrenadante viral y las células diana.

En respuesta al objetivo global de esta tesis, pensamos que las aportaciones descritas en esta memoria contribuyen al establecimiento y progreso de un modelo pre-clínico en grandes animales, imprescindible hoy en día, para el desarrollo y aplicación de expectantes protocolos terapéuticos.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

Abonour R, Williams DA, Einhorn L, May KM, Chen J, Coffman J, Traycoff CM, Bank A, Kato I, Ward M, Williams SD, Hromas R, Robertson MJ, Smith FO, Wood D, Mills B, Srour EF, Cornetta K. (2000) Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med* 6: 652-658.

Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Denla S, Mortellaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinillo E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo MG, Bordignon C. (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296: 2410-2413.

Anderson DC, Schmalstieg FC, Arnaout MA, Kohl S, Tosi MF, Dana N, Buffone GJ, Hughes BJ, Brinkley BR, Dickey WD, Abramson JS, Springer T, Boxer LA, Hollers JM, Wayne y Smith C. (1984) Abnormalities of polymorphonuclear leukocyte function associated with a heritable deficiency of high molecular weight surface glycoproteins (GP138): common relationship to diminished cell adherence. *J. Clin. Invest.* 74: 536-551.

Andriole GL, Mule JJ, Hansen CT, Linehan WM, Rosenberg SA. (1985) Evidence that lymphokine-activated killer cells are distinct based on an analysis of congenitally immunodeficient mice. *J Immunol* 135: 2911-2913.

Astori G, Malangone W, Adami V, Risso A, Dorotea L, Falasca E, Marini L, Spizzo R, Bigi L, Sala P, Tonutti E, Biffoni F, Rinaldi C, Del Frate G, Pittino M, Dregrassi A. (2001) A novel protocol that allows short-term stem cell expansion of both committed and pluripotent hematopoietic progenitor cell suitable for clinical use. *Blood Cells Mol. Dis.* 27: 715-724.

Axelrad AA, McLeod DL, Shreeve MM, Heath DS. (1973) Properties of cells that produce erythrocytic colonies in vitro. En: *Hemopoiesis in culture*. Robinson WA. (Eds). DHEW Publications (NIH), Bethesda. pp. 74-205.

Babior BM. (1999) NADPH oxidase: An update. *Blood* 93: 1464-1476.

Barquinero J, Segovia JC, Ramirez M, Limon A, Güenechea G, Puig T, Briones J, Garcia J, Bueren JA. (2000) Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice. *Blood*. 95: 3085-3093.

Barquinero J, Eixarch H, Pérez-Melgosa M. (2004) Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Therapy* 11: S3-S9.

Bassøe CF, Smith I, Sørnes S, Halstensen A, Lehmann AK. (2000) Concurrent measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. *Methods* 21: 203-220.

Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Penault B. (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. Proc Natl Acad Sci USA 89: 2804.

Berman ME, Muller WA. (1995) Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). J. Immunol 154: 299-307.

Bernard A, Varas F, Almendral JM, Bueren JA. (1996) Transferencia y expresión génica en células hematopoyéticas: I. transferencia mediada por vectores retrovirales en células *stem* hematopoyéticas. Ref Libro: Hematología Experimental; curso teórico práctico. Ed. Ciemat. Cap. 16a.

Berrios VM, Dooner GJ, Nowakowski G, Frimberger, Valinski, Quesenberry PJ, Becker PS. (2001) The molecular basis for the cytokine-induced defect in homing and engraftment of hematopoietic stem cells. Exp Hematol 29: 1326-1335.

Bertoncello I, Hodgson GS, Bradley TR. (1985) Multiparameter analysis of transplantable hemopoietic stem cells: I. The separation and enrichment of stem cells homing to marrow and spleen on basis of rhodamine-123 fluorescence. Exp Hematol 13: 999-1006.

Bertoncello I, William B. (2004) Hematopoietic stem cell characterization by Hoesch 33342 and rhodamine 123 staining. Methods Mol Biol. 263: 181-200.

Borregaard N, Sehested M, Nielsen BS, Sengeløv, Kjeldsen L. (1995) Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. Blood 85: 812-817.

Borregaard N, Cowland JB. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorfonuclear leukocyte. Blood 89: 3503-3521.

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature 301: 527-530.

Bradley TR, Metcalf D. (1966) The growth of mouse marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci 44: 287-299.

Brener S y Malech HL. (2003) Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy. Biochim Biophys Acta. 1640: 1-24.

Bruger W, Mocklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Metelmann R, Kannz L. (1993) Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem

cell factor, interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 81: 2579-2584.

Bruno B, Nash RA, Wallace MP, Gass MJ, Thompson J, Store R, McSweeney PA. (1999) CD34+ selected bone marrow grafts are radioprotective and establish mixed chimerism in dogs given high dose total body irradiation. *Transplantation*. 68: 338-344.

Bu CH, Pourmotabbed T. (1995) Mechanism of activation of human neutrophil gelatinase B. *J. Biol. Chem.* 270: 18563-18569.

Bueren JA, Güenechea G, Casado JA, Lamana ML, Segovia JC. (2003) Genetic modification of hematopoietic stem cells: recent advances in the gene therapy of inherited diseases. *Arch Med Res* 34: 589-599.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basille G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Cassanova JL, Bousso P, LeDeist F, Fischer A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672.

Chatelain C, De Bast M, Symann M. (1988) Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). *Blood* 72: 1187-1191.

Civin CL, Strauss LC, Brovall C. (1984) A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133: 157-165.

Cobbold S y Metcalfe S. (1994) Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: Summary of the first international canine leukocyte antigen workshop (CLAW). *Tissue Antigens*. 43: 137-154.

Craddock C. (2000) Biological basis of hematopoietic stem cell transplantation. *Ref Libro: The EBMT handbook 2000 revised edition; Blood and marrow transplantation*. Editors: Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A. Cap. 3.

Dao MA, Hashino K, Kato I, Nolte JA. (1998) Adhesion fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human stem and progenitor cells. *Blood*. 92: 4612-4621.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LJ. (1977) Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 91: 335-344.

Dexter TM, Testa NG, Allen TD, Rutherford T, Scolnick E. (1981) Molecular and cell biological aspects of erythropoiesis in long-term bone marrow cultures. *Blood* 56: 699-707.

Dexter TM, Spooncer E, Simmons P, Allen Td. (1984) Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience. en: Long-Term Bone Marrow Culture. Wright DW, Greenberger JS. (Eds.). Alan R. Liss Inc, New York. pp. 57-96.

Dexter TM, Spooncer E. (1987) Growth and differentiation in the hematopoietic system. *Annu Rev Cell Biol* 3: 423-441.

Deubeleiss KA, Dancey JT, Harker LA, Fich CA. (1975) Neutrophil kinetics in the dog. *J Clin Invest* 55: 833-839.

Diez Marín JL y Buño I. (2000) Transplante alogénico de progenitores hemopoyéticos con acondicionamiento no mieloablativo: inmunoterapia mediada por quimerismo mixto. 3:

Dorrell C, Gan OI, Pereira DS, Hawley RG, Dick JE. (2000) Expansion of human cord blood CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* 95: 102-110.

Egesten A, Breton-Gorius J, Guichard J, Gullberg U, Olsson I. (1994) The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myelo-peroxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein. *Blood* 83: 2985-2994.

Elghetany MT. (2002) Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.* 28: 260-274.

Elsbach P. (1998) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukocyte Biol* 64: 14-18.

Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. (2002) CD34<sup>+</sup> or CD34<sup>-</sup>: which is the more primitive? *Leukemia* 16: 1603-1608.

Escribano S, Gaitan S, Cuenllas E, Tejero C. (1997) Long-term haemopoietic injury in mouse by 1 Gy X-rays at different postconceptional stages. *Int J Radiant Biol* 71: 215-223.

Faldyna M, Sinkora J, Knotigova P, Rehakova, Moravkova, Toman M. (2003) Flow cytometric analysis of bone marrow leucocytes in neonatal dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 95: 165-176.

Falzetti F, Ballanti S, De Ioanni M. (2002) Selection and autologous transplantation of rh-GCSF mobilized CD133<sup>+</sup> cells from peripheral blood in patients with indolent Non Hodgkins` lymphoma under high-dose chemotherapy. *Blood* 100: 831a.



Fermín ML, Gaitan S, Fragio C, Leon LG, Ostronoff LK, Kremmer E, Kolb HJ, Tejero C. (2004) Canine long-term bone marrow culture neutrophil production and functionality. *Acta Haematol* 111: 196-204.

Fischer A, Descamps-Latscha B, Lisowska-Grospierre B, Gerota I, Perez N, Scheinmetzler C, Durandy A, Virelizier JL, Griscelli C. (1983) Bone-marrow transplantation for inborn error of phagocytic cells associated with defective adherence, chemotaxis, and oxidative response during opsonised particle phagocytosis. *Lancet* 2: 473-476.

Flores-Guzman P, Rodriguez MG, Mayani H. (2002) In vitro proliferation, expansion and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytoquines. *Arch Med Res.* 33: 107-114.

Forraz N, Pettengell R, McGuckin C. (2004) Characterization of a lineage-negative stem-progenitor cell population optimized for ex vivo expansion and enriched for LTC-IC. *Stem Cells.* 22: 100-108.

Fouret P, Du Bois RM, Bernaudin JF, Takahashi H, Ferrans VJ, Crystal RG. (1989) Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J Exp Med* 169: 833-845.

Fraser CC, Szilvassy J, Eaves CJ, Humphries RK. (1992) Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells in vitro with retention of long-term competitive in vivo reconstituting ability. *Proc Nat Acad Sci USA* 89 1968-1972.

Frimberger AE, Streing AI, Quesenberry PJ. (2001) An in vitro model of hematopoietic stem cell homing demonstrates rapid homing and maintenance of engraftable stem cells. *Blood* 98: 1012- 1018.

Gallego JM, Almendral JM. (1996) Vectores para transferencia génica en eucariotas. Ref. Libro: Hematología Experimental; curso teórico práctico. Ed. Ciemat. Cap 15.

Gasper PW y Tharal MA. (2000) Hemopoietic stem cell transplantation. Libro Schalm's Veterinary Hematology. Ed. Bernard F Feldman, Joseph G Zinkl y Nemi C Jain. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 17.

Goerner M, Bruno B, McSweeney PA, Buron G, Strob R, Kiem HP. (1999) The use of granulocyte colony-stimulating factor during retroviral transduction on fibronectin fragment CH-296 enhances gene transfer into haematopoietic repopulating cells in dogs. *Blood.* 94: 2287-2292.

Goerner M, Horn PA, Peterson L, Kurre P, Storb R, Rasko JEJ, Kiem HP. (2001) Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34+ marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood*. 98: 2065-2070.

Gregory CJ. (1976) Erythropoietic sensitivity as a differentiation maker in the hemopoietic system: studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J Cell Physiol* 89: 289-302.

Golde DW. (1984) Hematopoiesis. Churchill Livingstone Inc, New York, Edinburgh, London, Melbourne.

Golde DW. (1991) The stem cell. *Sci Am* 265: 86-93

Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira DS, Kelly M, Naldini L, Dick JE. (2000). Transduction of human CD34+CD38- bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol. Ther.* 1(6): 566-572.

Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JL, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 (5644): 415-419.

Hanazono Y, Terao K, Ozawa K. (2001) Gene transfer into nonhuman primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells* 19: 12-23.

Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams D. (1996) Co localization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 8: 876-882.

Healy L, May G, Gale K, Greaves MF. (1995) The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12240-12244.

Hematti P, Sellers SE, Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE, Dunbar CE. (2003) Retroviral transduction efficiency of G-CSF+SCF-mobilized peripheral blood CD34+ cells is superior to G-CSF or G-CSF+Flt3-L-mobilized cells in nonhuman primates. *Blood* 101: 2199-2205.

Horn PA, Topp MS, Morris JC, Riddell SR, Kiem HP. (2002) Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype

oncoretroviral vector produced by human packaging cells. *Blood*. 100: 3960-3967.

Horn PA, Keyser KA, Peterson LJ, Neff T, Thomasson BM, Thompson, Kiem HP. (2004a) Efficient lentiviral gene transfer to canine repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood*. 103: 3710-3716.

Horn PA, Morris JC, Neff T, Kiem HP. (2004b) Stem cell gene transfer and safety in large animal studies. *Mol. Ther.* 10(3): 417-431.

Hu WS, Pathak VK. (2000) Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol Rev* 52: 493-511.

Itoh K, Tezuca H, Sakoda H, Konno M, Nagata K, Uchiyama T, Uchino, Mori KJ. (1989) Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp Hematol* 17: 145-153.

Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, Miller AD. (1994) Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7071-7075.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. (2001) Viral vector for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Med* 7: 33-39.

Keller R. (2002) Stem cells on the way to restorative medicine. *Imunol Cell* 83: 1-12.

Kelly PF, Carrington J, Nathwani A, Vanin EF. (2001) RD-114-pseudotyped oncoretroviral vectors: biological and physical properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 938: 262-277.

Kiem HP, Andrews RG, Morris J, Peterson L, Heyward S, Allen JM, Rasko JEJ, Potter J Miller AD. (1998) Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with Interleukin-6, stem cell factor, Flt-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 92: 1878-1886.

Kiem HP, Seller S, Thomasson B Morris JC, Tisdale JF, Horn PA, Hematti P, Adler R, Kuramoto K, Calmels B, Bonofacino A, Hu J, von Kalle C, Schmidt M, Sorrentino B, Nienhuis A, Blau CA, Andrews RG, Donahue RE, Dunbar CE. (2004) Long-term clinical and molecular follow-up of large animals receiving retrovirally transduced stem and progenitor cells: no progression to clonal hematopoiesis or leukemia. *Mol. Ther* 9: 389-395.

Klein C y Baum C. (2004) Gene therapy for inherited disorders of hematopoietic cells. *Hematol J* 5: 103-111.

Kodama H, Sudo H, Koyama H, Kasai S, Yamamoto S. (1984) In vitro hemopoiesis within a microenvironment created by MC3T3-G2/PA6 preadipocyte. *J Cell Physiol* 118: 233-240.

Kolb HJ, Holler E, Schleuning M, Ledderose G, Mittermüller J, Menzel H, Schumm M, Günther W, Schattenberg A, Bunjes D, Goldman JM, Jacobsen N, Ljungman P. (1999) Adoptive immunotherapy in canine and human chimeras. *Cancer Research therapy and control* 9: 31-37.

Kolb HJ. (1999) Adoptive immunotherapy in chimeras for the treatment of leukemia. *American Society of Clinical Oncology* 99:

Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. (2004) Graft-versus-leukemia reactions in allogenic chimeras. *Blood* 103: 767-776.

Kühlcke K, Fehse B, Schilz A, Loges S, Lindemann C, Ayuk F, Lehmann F, Stute N, Fauser AA, Zander AR, Eckert HG. (2002) Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Mol. Ther.* 5(4): 473-478.

Kurre P, Morris J, Horn PA, Harkey MA, Andrews RG, Kiem HP. (2001) Gene transfer into baboon repopulating cell: A comparison of Flt-3 ligand and megakaryocyte growth and development factor versus IL-3 during ex vivo transduction. *Mol Ther* 3: 920-927.

Ladiges WC, Storb R, Thomas ED. (1990) Canine models of bone marrow transplantation. *Lab. Anim. Sci.* 40: 11-15.

Laerochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, Moritz T, Murdoch B, Xiao XL, Kato I, Williams DA, Dick JE. (1996) Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2: 1329-1337.

Lamana M. (1996) Biología y trasplante de células stem movilizadas a sangre periférica. Ref. Libro: *Hematología Experimental; curso teórico practico*. Ed. Ciemat. Cap. 24.

Lang P, Bader P, Schumm M, Feuchtinger T, Einsele H, Fuhrer M, Weinstock C, Handgretinger R, Kuci S, Martin D, Niethammer D, Greil J. (2004) Transplantation of combination of CD133+ and CD34+ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 124: 72-79.

Lemieux ME, Rebel VI, Lansdrop PM, Eaves CJ. (1995) Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood* 86: 1339-1347.

Lemischka IR. (1992) The haematopoietic stem cell and its clonal progeny: mechanisms regulating the hierarchy of primitive haematopoietic cells. *Cancer Surv.* 15: 3-18.

Levin J. (1983) Murine megakaryopoiesis *in vitro*: an analysis of culture system used for the study of megakaryocyte colony-forming cells and of the characteristics of megakaryocyte colonies. *Blood* 61: 617-623.

Lieber JG, Webb S, Suratt BT, Young SK, Johnson GL, Keller GM, Worthen GS. (2004) The *in vitro* production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood* 103: 852-859.

Li Z, Schwieger M, Lange C, Kraunus J, Sun H, van der Akker E, Modlich U, Serinsöz E, Will E, von Laer D, Stocking C, Fehse B, Schiedlmeier B, Baum C. (2003) Predictable and efficient retroviral gene transfer into murine bone marrow repopulating cells using a defined vector dose. *Exp Hematol.* 31: 1206-1214.

Lieberman MM, Schanandani DM, Piney CA. (1996) Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 36: 654-662.

Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael Lloyd Entman M. (2001) Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 103: 2181-2187.

Liu H, Verfaillie CM. (2002) Myeloid-lymphoid initiating cells (ML-IC) are highly enriched in the rhodamine-c-kit(+)CD33(-)CD38(-) fraction of umbilical cord CD34(+) cells. *Exp Hematol* 30: 582-589.

Lord BI, Testa NG. (1988) The hematopoietic system: structure and regulation. Ref. Libro: Hematopoiesis: long effects of chemotherapy and radiation. Testa NG y Gale RP (Eds.). Marcel Dekker, New York, Basel. Pp. 1-26.

Makowki GS, Ramsby ML. (1996) Calibrating gelatin zymograms with human gelatinase standards. *Anal. Biochem.* 236: 353-356.

Mason D, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsi V, Meuer S, Morrissey J, Schawartz-Albiez

R, Shaw S, Simmons D, Ugoccioni M, van der Schoot E, Vivier E. (2001) CD antigens 2001. *International Immunology* 13: 1095-1098.

Mayani H, Alvarado-Moreno A, Flores-Guzman P. (2003) Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 34: 476-488.

McCulloch EA. (1980) Hematopoietic stem cell differentiation. *Biochem Biophys Acta* 605: 431-459.

McEver RP, Cummings RD. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 100: S97-S103.

McSweeney PA, Rouleau KA, Storb R, Bolles L, Wallace PM, Beauchamp M, Krizanac-Bengez, Moore P, Sale G, Sandmaier B, Revel T, Appelbaum FR, Nash RA. (1996) Canine CD34: Cloning of the cDNA and evaluation of antiserum to recombinant protein. *Blood* 88: 1992-2003.

McSweeney PA, Rouleau KA, Wallace PM, Bruno B, Andrews RG, Krizanac-Bengez L, Sandmaier BM, Storb R, Wayner E, Nash RA. (1998) Characterization of monoclonal antibodies that recognize canine CD34. *Blood* 91: 1977-1986.

Metcalf D. (1984) The bioassay of colony stimulating factors.. En: *The Hemopoietic Colony Stimulating Factors*. Metcalf D (Eds.). Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. pp. 187-189.

Middelhoven PJ, Ager A, Roos D, Verhoven AJ. (1997) Involvement of metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gammaRIIIB. *FEBS Letters* 414: 14-18.

Miller AD, Buttimore C. (1986) Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2895-2902.

Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. (1999) Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283: 682-686.

Moore MA, Metcalf D. (1971) Cytogenetic analysis of human acute and chronic myeloid cells cloned in agar culture. *Int J Cancer* 11: 143-152.

Moore KL, Patel KD, Bruehi RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 128: 661-671.

Morell V. (1997) The origin of dogs: running with the wolves. *Science* 276: 1647-1648.

Mukhopadhyay A, Madhusudhan T, Kumar R. (2004) Hematopoietic stem cells: clinical requirements and developments in ex vivo culture. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 86: 215-253.

Mulder AH, Visser JWM. (1987) Separation and functional analysis of bone marrow cells separated by rhodamine-123 fluorescence. *Exp Hematol* 15: 99-104.

Nathan CF. (1987) Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 80: 1550-1560.

Neuner E, Schumm M, Schneider E-M, Guenther W, Ellwart J, Kremmer E, Vogl C, Buettner M, Thierfelder S, Kolb HJ. (1997) Immune phenotype of canine hematopoietic progenitor cells. *Tissue Antigens*. 50: 466-474.

Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA, Lothrop Jr CD. (2001) Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 29: 686-693.

Ohana-Malka O, Benharroch D, Isakov N, Prinsloo I, Shubinsky G, Sacks M, Gopas J. (2003) Selectins and anti-CD15 (Lewis x/a) antibodies transmit activation signals in Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Exp Hematol* 31: 1057-1065.

Orlic D, Fischer R, Nishikawa SI, Neinhuis AW, Bodine DM. (1993) Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell population expression high levels of c-kit receptor. *Blood* 82: 762- 770.

Owen CA, Campbell EJ. (1999) The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukocyte Biol* 65: 137-150.

Pellegatta F, Chierchia SL, Zocchi MR. (1998) Functional association of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and phosphoinositide 3-kinase in human neutrophils. *J Biol Chem* 273: 27768-27771.

Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Borns NH. (1989) An in vitro limiting-dilution assay of long term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 74: 2755-2763.

Pluznik DH, Sanchs L. (1965) The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 66: 319-324.

Porvazinik M y MacVittie TJ. (1979) Detection of gap junctions between the progeny of canine macrophage colony-forming cell in vitro. *J Cell Biol* 82: 555-564.

Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas II HL, Suffredini AF. (1998) Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20: 458-464.

Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. (1998) A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J. Immunol. Methods* 219: 187-193.

Ries C, Loher F, Zang C, Ismail MG, Petrides PE. (1999) Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 5: 1115-1124.

Roberts RG, Gallagher J, Spooncer E, Allen T, Bloomfield F, Dexter TM. (1988) Heparin sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332: 376-378.

Sanchez-Lopez R, Nicholson R, Gesnel MC, Matrisian LM, Breathnach R. (1988) Structure-function relationships in collagenase family member transit. *J Biol Chem* 263: 11892-11899.

Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. (1992) Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 12: 788-794.

Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. (2004) In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene* 23(43): 7223-7232.

Schuening FG, Kawahara K, Miller AD, To R, Goehle S, Stewart D, Mullally K, Fisher L, Graham TC, Appelbaum FR y col. (1991) Retrovirus-mediated gene transduction into long-term repopulating marrow cells of dogs. *Blood* 78: 2568-2576.

Shapiro SD. (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10: 602-608.

Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajn TV, Greiner DL. (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154: 180-191.



Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol.* 148: 267-271.

Smith C. (2002) Hematopoietic stem cell and hematopoiesis. *Cancer control* 10: 9-16.

Spangrude GJ. (1992) Characteristics of hematopoietic stem cell compartment in adult mice. *Int J Cell Cloning* 10: 277-285.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241: 58-62.

Sponcer E, Heyworth CM, Dunn A, Dexter TM. (1986) Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation* 31: 111-118.

Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF. (1997) Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol* 159: 952-963.

Storb R, Thomas ED. (1972) Bone marrow transplantation in randomly bred animal species and in man. *Proceedings of the sixth leukocyte culture conference.* Academic Press, New York: 805-840.

Storb R. (2003) Allogenic hematopoietic transplantation-yesterday, today, and tomorrow. *Exp Hematol* 31: 1-10.

Suter SE, Gouthro TA, McSweeney PA, Nash RA, Haskins ME, Felsburg PJ, Henthorn PS. (2004) Isolation and characterization of paediatric canine bone marrow CD34+ cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101: 31-47.

Sutherland DR, Keating A. (1992) The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. *J Hematother* 1: 115-129.

Szilvassy SJ. (2003) The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34: 446-460.

Testa NG, Dexter TM. (1977) Long-term production of erythroid precursor cells (BFU) in bone marrow cultures. *Differentiation* 9: 193-195.

Till JE, McCulloch EA. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiant. Res.* 14: 213-222.

Till JE, McCulloch EA. (1964) A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 51: 29-36.

Tisdale JF, Hanazone Y, Sellers SE, Agricola BA, Melzger ME, Donahue RE, Dunbar CE. (1998) Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood* 92: 1131-1141.

Thomasson B, Peterson L, Thompson J, Goerner M, Kiem HP. (2003) Direct comparison of steady-state marrow, primed marrow, and mobilized peripheral blood for transduction of hematopoietic stem cells in dogs. *Hum Gene Ther* 14: 1683-1686.

Tretin JJ. (1970) Influence of hematopoietic organ stroma (hematopoietic inductive microenvironments) on stem cell differentiation. *Ref. Libro: Regulation of hematopoiesis, Vol. 1.* Gordon AS (Eds.). Appleton-Century-Crofts, New York pp. 161-186.

Uchida N, Combs J, Chen S, Zanjani E, Hoffman R, Tsukamoto A. (1996) Primitive human hematopoietic cells displaying differential efflux of the Rhodamine 123 dye have distinct biological activities. *Blood* 88: 1297-1305.

Uchida N, Weissman IL. (1992) Searchin for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 175: 175-184.

Udomsakdi C, Eaves CJ, Sutherland HJ, Lansdorp PM. (1991) Separation of functionally distinct subpopulations of primitive human hematopoietic cells using Rhodamine-123. *Exp. Hematol.* 19: 338-342.

Uher F, Hajdu M, Vas V. (2003) Self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: a molecular approach (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung* 50: 3-21.

van Eeden SF, Klut ME, Walker BAM, Hogg JC. (1999) The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 232: 23-43.

Verfaillie CM. (2002) Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 12: 502-508.

Von Kalle C, Kiem HP, Goehle S, Darosvsky B, Heimfel S, Torok-Storb B, Schuening FG. (1994) Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector. *Blood* 84: 2890-2897.

Ward PA. (1999) The acute inflammatory response and its regulation. *Arch Surg* 134: 666-669.

Wagner JL, Storb R. (1996) Preclinical large animal models for hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 3: 410-415.

Weersinnk AJ, Van Kessel KP, Van Den Tol ME, Van Strijp JA, Torensma R, Verhoef J, Elsbach P, Weiss J. (1993) Human granulocytes express a 55-kD lipopolysaccharide-binding protein on the cell surface that is identical to the bacteridal/permeability-increasing protein. *J Immunol* 150: 253-263.

Weiss SJ, Peppin GJ. (1986) Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. Characteristics, regulation and potential function in vivo. *Biochem Pharmacol* 35: 3189-3197.

Weiss DJ, Blauvelt M, Sykes J, McClenahan. (2000) Flow cytometric evaluation of canine bone marrow differential cell counts. *Vet Clin Pathol* 29: 97-104.

Weiss DJ. (2002) Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Vet Clin Pathol* 31: 72-82

Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. (1989) SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kD type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264: 17213-17221.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latche, Lesarve P, Halbwachs-Mecarelli L. (2000) Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 80 (5): 617-653.

Whitlock CA, Tidmarsh GF, Muller SC, Weissman IL. (1987) Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia associated molecule. *Cell* 48: 1009-1021.

Wognum AW, Eaves CA, Thomas TE. (2003) Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34: 461-475.

Wynter EA, Coutinho LH, Pei X, Marsh JCW, Hows J, Luft T, Testa NG. (1995) Comparison of purity and enrichment of CD34<sup>+</sup> cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells* 13: 524-532.

Yago T, Tsukuda, Minami M. (1999) P-selectin promotes the adhesion of monocytes to VCAM-1 under flow conditions. *J Immunol* 163: 367-373.

Yan F, Collector MI, Tyszko S, Sharkis SJ. (2003) Using divisional history to measure hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Exp Hematol* 31: 56-64.

Zielske SP y Braun SE. (2004) Cytokines: Value-added products in hematopoietic stem cells gene therapy. *Mol. Ther.* 10: 211-219.