

OBJECTIUS

Els treballs descrits en aquest estudi formen part d'una línia d'investigació iniciada pel grup a l'Institut de Recerca Oncològica (IRO). El principal objectiu d'aquest estudi fou determinar el paper del condicionament en l'empelt de cèl·lules singèniques transduïdes amb un gen marcador, i es desglossa en els tres objectius següents:

1. Desenvolupament d'un sistema de marcatge i d'un protocol per la transducció retrovírica de cèl·lules hemopoètiques murines.
 - 1.1. Construir una línia productora de retrovirus ecotròpics portadors del gen que codifica l'EGFP.
 - 1.2. Optimitzar la transducció de cèl·lules hemopoètiques murines tenint en compte les següents variables: període de pre-incubació de les cèl·lules amb factors de creixement, centrifugació de les plaques de cultiu i incorporació del fragment de fibronectina recombinant CH-296.
2. Estudiar l'expressió d'EGFP a curt i a llarg termini en ratolins no irradiats i irradiats en diferents dosis d'ICT, trasplantats amb cèl·lules transduïdes.
3. Estudiar l'empelt de progenitors hemopoètics transduïts.
 - 3.1. Avaluar els efectes de la manipulació en la capacitat de repoblació de ratolins no irradiats i irradiats amb diferents dosis d'ICT.
 - 3.2. Avaluar els efectes de la dosi de cèl·lules transduïdes trasplantades en l'empelt de ratolins no irradiats i irradiats amb diferents dosis d'ICT.

MATERIAL I MÈTODES

1. Animals

Es van utilitzar ratolins femella de les soques C57BL/6J (Iffa Credo, SA) i B6.SJL-Ptprc^aPep3^b/BoyJ (www.jaxmice.jax.org) d'entre 7-9 setmanes d'edat i amb un pes aproximat de 20 g. Les dimensions mitjanes dels ratolins eren de 5,5 cm de longitud, 2 cm d'amplada i 3 cm d'alçada. Quan els animals arribaven a l'estabulari (estabulari de petits rosegadors de l'Institut de Recerca Oncològica), es mantenien entre 7 i 10 dies en període d'aclimatació obligatòria fins que eren utilitzats. De manera general, s'estabulaven en habitacions amb temperatura controlada (entre 20-21°C) i amb un cicle de llum-fosc de 12 hores. Quan els ratolins eren irradiats passaven a ser estabulats en condicions estèrils. Amb aquesta finalitat es col·locaven dins d'aïlladors, en gàbies estèrils, on l'aire que entrava era prèviament filtrat, amb pins i menjar estèrils (Panlab) i aigua estèril suplementada amb 40 mg/ml neomicina (Gibco^{BRL}, Life Technologies, Paisley, Scotland) i 1,6 g/l cotrimoxazole (Soltrim^R, Almirall Lab) *ad libitum*. En aquestes condicions es mantenien fins a un màxim de 30 dies després de la irradiació.

2. Irradiació

Els ratolins es van irradiar amb una font de cobalt-60 (Theratron 780, Compagnie General de Radiologie-General Electric) com a emissor de fotons gamma d'1,25 MeV fins a una dosi màxima de 900 cGy i a una taxa de dosis de 50 cGy/min (dosi letal_{95/30}). Per ser irradiats, els ratolins s'anestesiaven prèviament amb èter etílic i es col·locaven en caps de fusta compartimentades, de 33 × 33 × 5 cm³, amb el fons de polimetacrilat i el sostre, mòbil per poder introduir i treure els ratolins de cada compartiment, també del mateix material però amb forats que permetessin la ventilació dels animals. La irradiació es va realitzar al Departament de Radioteràpia de l'Institut Català d'Oncologia a l'Hospital Duran i Reynals utilitzant un camp directe, amb càlcul de dosi a 1,5 cm de profunditat i a una distància focus-pla mitjana de 100 cm. Per establir les bases de l'estudi dosimètric ens vàrem basar en un estudi realitzat a l'Hospital de l'Esperança de Barcelona on, es va analitzar l'homogeneïtat de la distribució de dosi entre els animals i en els diferents punts de cada animal mitjançant dosímetres de termoluminescència situats en el pla mitjà de 25 maniquins de plastilina de la mateixa mida i pes que els animals reals, col·locats en els compartiments de la caixa d'irradiació. Prèviament, els resultats de l'estudi dosimètric havien demostrat una bona homogeneïtat en el repartiment de les dosi entre ratolins, amb variacions mitjanes del 2% (184).

3. Obtenció de cèl·lules del MO

Es va procedir al sacrifici dels ratolins col·locant-los en campanes de vidre amb una atmosfera saturada d'èter etílic. Un cop morts, les seves extremitats posteriors es van esterilitzar amb alcohol al 70% i seguidament amb povidona iodada, després es va procedir a dissecar-les per extreure els fèmurs (i les tíbies, quan el nombre de cèl·lules requerit era elevat). Un cop extrets, els ossos es van col·locar en tubs estèrils amb 10 ml de PBS i antibiòtic (5-6 gotes de penicil·lina 100 UI/ml-estreptomicina 100 µg/ml -Gibco^{BRL}-), on es mantenien fins al seu processament (no més de 30 minuts després de l'extracció). A continuació, dins una cambra de flux, amb l'ajut d'un bisturí i unes pinces estèrils es van separar els teixits no ossis que els envolten. Quan el nombre d'ossos no superava els 10 es procedia a tallar directament amb el bisturí els dos extrems distals de les epífisis de cada fèmur de tal manera que quedés el canal femoral descobert. Utilitzant una agulla de 26 G es procedia al rentatge dels canals femorals fent-hi passar dues vegades 1 ml de medi Alpha (Gibco^{BRL}) o PBS. D'aquesta manera les cèl·lules de MO restaven resuspeses en el medi. Quan el nombre de fèmurs superava els 10, per accelerar el procés es procedia a fraccionar-los físicament utilitzant un morter esterilitzat i a rentar-los amb PBS per recollir les cèl·lules que s'alliberaven de l'interior dels ossos. Finalment es procedia al recompte cel·lular en una cambra de Neubauer utilitzant la solució Turk com a diluent. La solució Turk és una solució a l'1% d'àcid acètic en H₂O destil·lada més 1-2 gotes de Giemsa per litre que lisa els eritròcits, la qual cosa permet el recompte de les cèl·lules nucleades del MO. El rendiment dels dos procediments era equivalent i la viabilitat (mitjançant comptatge amb blau tripà) de les cèl·lules no es veia afectada.

4. Extracció de cèl·lules de SP

Les mostres de SP es van obtenir dels animals anestesiats amb èter mitjançant punció cardíaca a tòrax obert, utilitzant xeringues d'insulina heparinitzades. Quan es necessitava poc volum de sang (aproximadament 50 µl), s'obtenia fent una petita incisió a la vena caudal del ratolí, que prèviament s'havia dilatada submergint la cua del ratolí en un bany amb aigua a 37°C.

Una vegada recollides les diferents mostres de sang es va procedir al recompte cel·lular en una cambra de Neubauer utilitzant Turk com a diluent.

5. Obtenció de les cèl·lules de melsa

Les melses es van obtenir per laparotomia dels ratolins sacrificats després d'esterilitzar la pell amb povidona iodada. Un cop extretes, es van col·locar en tubs estèrils amb 10 ml de PBS i antibiòtic (5-6 gotes de penicil·lina 100 UI/ml-estreptomicina 100 µg/ml) on es mantenien fins al seu processament (no més de 30 minuts després de l'extracció). Tot seguit, dins una cambra de flux, les melses es col·locaven en una placa de Petri estèril (NuncTM Brand Products, Dinamarca) i, amb l'ajuda d'un bisturí i unes pinces estèrils, es procedia a tallar un extrem de l'òrgan i per pressió suau s'anava alliberant el contingut cel·lular de l'interior de la càpsula esplènica. Finalment es procedia al recompte cel·lular en una cambra de Neubauer utilitzant Turk com a diluent.

6. Obtenció dels medis condicionats

Les citoquines IL-3 i SCF s'obtenien a partir del sobrenadant (medi condicionat o MC) de les dues línies cel·lulars comercials productores d'ambdós factors de creixement.

6.1. Obtenció del MC WEHI

El medi condicionat de la línia cel·lular mielomonocítica murina WEHI 3 BD⁺ és un medi utilitzat com a font d'IL-3 (185). Aquesta línia creix òptimament en medi McCoy's (Gibco^{BRL}) suplementat amb 200 UI/ml de penicil·lina, 200 µg/ml d'estreptomicina, 2,2 g/L de bicarbonat sòdic (Pharmacia Ibérica) més un 10% de sèrum boví fetal (FCS) (Gibco^{BRL}) que de manera rutinària prèviament s'inactiva a 56°C durant 30 minuts.

Les cèl·lules es feien créixer a una densitat de 10⁵ cèl·lules/ml, a 37°C i 5% de CO₂. Al cap de 7 dies havien assolit una concentració aproximada de 10⁶ cèl·lules/ml.

Per expandir la línia, es deixaven les cèl·lules en cultiu durant 7 dies i seguidament es diluïa el cultiu (1:10) i es tornaven a incubar les cèl·lules durant el mateix període de temps. De manera general, l'expansió cel·lular es mantenia fins a aconseguir uns 250 ml de sobrenadant.

Per obtenir el MC WEHI, la suspensió cel·lular crescuda durant 7 dies a l'incubador sense cap recanvi de medi, es recollia i se centrifugava a 1500 rpm durant 10 minuts. Tot seguit, el sobrenadant es filtrava amb filtres de 0,45 µm, es dividia en alíquotes i es congelava a -20°C.

Quan s'esgotava el medi condicionat, se'n feia un lot nou i per comprovar-ne la validesa es realitzava un cultiu en suspensió de cèl·lules de MO murines incubades amb 10% MC WEHI del lot generat de nou i, en paral·lel, el mateix cultiu amb el mateix percentatge de MC WEHI del lot vell. Després de 4 dies de cultiu es comparava l'expansió i viabilitat cel·lular de cada cultiu i es realitzaven cultius clonogènics (apartat 4.2.1. de l'Introducció) en medi semi-sòlid per avaluar el número de CFC presents al cultiu en cada cas.

Si els resultats obtinguts amb els dos medis condicionats eren equivalents, s'acceptava el lot nou de MC WEHI. Per contrari, si el lot nou era inferior, es descartava el nou lot i se'n feia un de nou.

6.2. Obtenció del MC BHK

El medi condicionat de la línia cel·lular murina BHK/MKL (MC BHK) (*Baby Hamster Kidney-Murine Kit Ligand*) és un medi utilitzat com a font d'SCF.

Aquesta línia creix òptimament en medi RPMI (Gibco^{BRL}) suplementat amb 200 UI/ml de penicil·lina, 200 µg/ml d'estreptomicina, 2 g/l de glucosa més un 10% de FCS (Gibco^{BRL}).

Una vegada descongelades, les cèl·lules es feien créixer fins a obtenir 4 flascons T75 a un 80% de confluència. En aquest estadi, es recollien les cèl·lules i se centrifugaven a 1500 rpm durant 10 minuts. Seguidament es recollia el sobrenadant, es filtrava a través d'un filtre de 0.45 µm, i es va reservar a 4 °C. Es retornaven les cèl·lules als flascons de cultiu inicials, s'afegia 50 ml de medi fresc a cada flascó T75, i es deixaven 2 dies més en cultiu a 37°C i 5% de CO₂. Després es recollia el sobrenadant filtrat i es mesclava amb el resta de medi condicionat reservat a 4°C. Es dividia el medi en parts alíquotes i es va congelar a -20 °C.

Cada vegada que s'obtenia MC BHK es provava una alíquota per comprovar-ne la validesa o descartar-la i fer-ne de nou (igual que amb el MC WEHI).

7. Cultius cel·lulars

7.1. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars

En tots dos casos es va procedir a la congelació de les cèl·lules en criotubs d'1.8 ml (NuncTM, Brand Products, Nalgene Nunc, Dinamarca) en 0.9 ml d'RPMI (Gibco^{BRL}) + 50% FCS. Seguidament es va afegir a les cèl·lules 0.1 ml (10% del volum final) de dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma, St Louis, MO, USA) i es col·locaren els tubs a l'interior del *frostie* (NalgeneTM, Cryo 1°C Freezing Container, USA). Es deixà al congelador de -80°C fins que la mostra va assolir aquesta temperatura (mínim 2 hores) i aleshores s'emmagatzemaren les cèl·lules en nitrogen líquid.

El *frostie* és un recipient que conté 2-isopropanol. L'isopropanol permet que la baixada de temperatura de la mostra sigui lenta però progressiva (-1 °C cada minut), fet que millora la qualitat de la congelació de la mostra.

Cada vegada que es requeria fer medi condicionat es descongelava una alíquota de cèl·lules i es feia créixer. Per descongelar-la se seguia el protocol de descongelació estàndard, que comprèn els passos següents:

- 1) Submergir el tub amb les cèl·lules congelades en un bany a 37°C i agitar-lo contínuament.
- 2) Quan el medi s'ha descongelat, col·locar el tub immediatament en gel.
- 3) Afegir gota a gota el medi de descongelació (RPMI + 50% FCS en fred) fins a diluir el DMSO com a màxim a l'1%. De manera general, les alíquotes congelades contenen 1 ml de volum total. Per tant, per diluir el DMSO a menys de l'1% calia afegir com a mínim 9 ml de medi de descongelació.
- 4) Centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 10 minuts, abocar el sobrenadant i resuspendre-les en el medi de cultiu adequat.

7.2. Descontaminació de la línia de micoplasmes

Per tal de descontaminar les línies cel·lulars de micoplasmes (prèviament havia donat positiva la presència de micoplasmes), s'afegí al medi de cultiu 0,5 µg/ml d'una solució 50 µg/ml de "Mycoplasma Removal Agent" (MRA, ICN Biomedicals, Osaka, Japó) i es deixà actuar durant una setmana. Cada tres dies es canviava el medi de cultiu i es tornava a afegir MRA al medi de cultiu fresc. S'ha demostrat que aquest producte és efectiu en l'eliminació de diverses espècies de micoplasmes de cultius contaminats.

Per detectar que el procés de descontaminació havia estat efectiu, es varen deixar les cèl·lules a testar en medi de cultiu sense MRA durant tres dies, es va recollir el sobrenadant filtrat a través d'un filtre de 0.45 µm i es va portar a analitzar, per PCR, la presència de micoplasmes (Laboratori de Càncer i Metàstasi, IRO). El resultat de la PCR (Gen-Probe Mycoplasma T.C., Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA i Mycoplasma PCR Primer Set, Stratagene, La Jolla, CA, USA) va demostrar l'absència de micoplasmes.

8. Obtenció de la línia cel·lular productora de retrovirus NX-E/EGFP

Prèviament a la creació de la línia cel·lular en qüestió, es varen generar al nostre laboratori les línies cel·lulars PA317/EGFP (158) i PG13/EGFP7 (11, 131), línia productora de retrovirus amfotrópics i pseudotipada amb el gen *env* del virus de la leucèmia del gibó (GALV), respectivament.

Utilitzant el sobrenadant de la línia PG13/EGFP7, es va infectar la línia cel·lular empaquetadora NX-E (cedida pel Dr. G. Nolan de l'Universitat d'Stanford de Califòrnia). Una vegada infectades les cèl·lules NX-E, es realitzà la separació individual de les cèl·lules que expressaven EGFP mitjançant el dispositiu d'"autoclon" del citòmetre EPICS ELITE ESP (Coulter, Hialeah, Florida, EUA). Les cèl·lules individuals es dispensaren en plaques de cultiu de 96 pous (TPP™) que contenien 100 µl dels medis següents a parts iguals:

- medi de cultiu* de la línia NX-E
- medi de cultiu, filtrat a través d'un filtre de 0,45 µm, on creixien les NX-E transduïdes abans de ser separades per citometria de flux (també anomenat medi condicionat).

Les plaques de cultiu es deixaren a l'incubador a 37°C, 5% de CO₂ i 100% d'humitat. Es va fer el seguiment dels clons que creixeren a les plaques de cultiu mitjançant l'anàlisi al microscopi òptic de fluorescència Olympus IX70 (Olympus Optical CO., Tokyo, Japó) utilitzant un filtre IF 490. D'aquesta manera es varen poder diferenciar els clons que emetien fluorescència verda dels negatius, que es varen descartar. Alhora, també es varen descartar les poblacions bi i policlonals. Es van analitzar els sobrenadants dels clons que havien incorporat el marcador (EGFP⁺) per poder esbrinar el que presentava el títol víric més elevat. Per això, es va recollir el sobrenadant de cada clon, es va filtrar a través d'un filtre de 0,45 µm, i es varen infectar cèl·lules NIH/3T3. L'eficiència de transducció es va calcular per citometria de flux analitzant el número de cèl·lules NIH/3T3 transduïdes per unitat de volum de sobrenadant, 24 hores després de la transducció.

*El medi de cultiu de la línia NX-E/EGFP és el mateix que el de la línia empaquetadora NX-E, DMEM (Dulbecco's modified eagle medium - Gibco^{BRL}-) suplementat amb L-glutamina 2 mM (Biological Industries, Kibbutz, Israel), 50 U/ml de penicil·lina-estreptomicina i un 10% de FCS.

8.1. Titulació de la línia NX-E/EGFP

Per l'experiment de titulació es varen utilitzar cèl·lules fibroblàstiques murines NIH/3T3 com a dianes per a l'infecció amb els vectors produïts per la línia NX-E/EGFP ja que aquestes cèl·lules són sensibles a la infecció per retrovirus ecotròpics.

Es varen infectar cèl·lules NIH/3T3 (20.000 cèl·lules cultivades el dia anterior en plaques de 12 pous) amb volums creixents de sobrenadant (filtrat prèviament a través d'un filtre de 0,45 µm) de la línia NX-E/EGFP juntament amb 4 µg/ml de sulfat de protamina (ROVI S.A, Madrid). Quaranta vuit hores després de la infecció es va analitzar el percentatge de cèl·lules NIH/3T3 transduïdes per citometria de flux.

8.2. Test de rescat del marcador de la línia NX-E/EGFP

Un altre fet que calia destacar de la línia productora NX-E/EGFP era la hipotètica presència de retrovirus amb capacitat de replicació (virus *helper*, salvatges o RCR) al sobrenadant d'aquesta línia, per això, vàrem utilitzar l'assaig de rescat del marcador (*marker rescue assay*).

Per estudiar si hi havia recombinació dels gens virals *gag-pol-env* amb la seqüència ψ del vector o de retrovirus endògens a la línia productora i, com a conseqüència, es generaven virus RCR, es va recollir el sobrenadant de la línia NX-E/EGFP (filtrat a través d'un filtre de 0.45 μm) i es varen infectar cèl·lules NIH/3T3. Es varen deixar les cèl·lules en cultiu a 37°C i 5% CO₂ en absència d'exposició al vector. Després de 7 dies de cultiu, es va exposar el sobrenadant a noves cèl·lules NIH/3T3 i, passades 48 hores després de l'infecció, s'analitzà per citometria de flux si hi havia presència de cèl·lules EGFP⁺. Si hi havia RCR, aquests es replicarien a les cèl·lules diana i com que algunes tenien el vector amb l'EGFP, hi hauria rescat del marcador (EGFP) per part dels virus generats. Aquests virus podien ser detectats en una segona infecció de cèl·lules NIH/3T3. Com a control positiu del test, vàrem utilitzar cèl·lules NIH/3T3 EGFP⁺ i, com a control negatiu, cèl·lules diana no infectades.

El rescat del marcador (presència de cèl·lules diana EGFP⁺) només pot ser degut a la presència de retrovirus amb capacitat de replicació en el sobrenadant de la línia productora.

8.3. Anàlisi de l'ADN de la línia productora NX-E/EGFP per *Southern blot*

L'ADN genòmic de la línia cel·lular NX-E/EGFP va ser extret segons descriuen Bernad i col (98). Breument, es varen digerir durant tota la nit 10 μg d'ADN amb els enzims de restricció: BamHI, que talla una vegada dins la seqüència del provirus, i Asp 718 que talla per ambdues seqüències *Long Terminal Repeats* (LTR) del vector. L'ADN digerit fou electroforit en un gel d'agarosa al 0.8%, transferit a una membrana de Nylon i hibridat amb una sonda EGFP, obtinguda del fragment EcoRI/NotI del plasmidi pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA), per detectar les seqüències d'ADN del vector. Per l'anàlisi dels resultats s'exposà la membrana en contacte amb una placa autoradiogràfica.

9. Cultius clonogènics de progenitors hemopoètics en metilcel·lulosa

De manera convencional, per la determinació del nombre de CFC en metilcel·lulosa es va procedir a barrejar les cèl·lules de la mostra en estudi resuspeses en medi Alpha (en un volum de 124 µl) amb:

- 600 µl de FCS
- 200 µl de MC WEHI
- 200 µl d'albumina sèrica bovina (BSA, Life Technologies Inc)
- 20 µl de 2-β-mercaptoetanol
- 20 µl de L-glutamina 200 mM
- 20 µl de penicil·lina-estreptomicina i
- 800 µl de metilcel·lulosa (Methocult H4100, Stem Cell Technologies Inc. Vancouver, Canadà.)

per obtenir un volum final de 2 ml. La barreja es va vortejar vigorosament (almenys 30 segons) i després de deixar-la reposar es va procedir a dipositar 0.5 ml en cada placa de cultiu (NuncTM Brand Products) amb l'ajuda d'una xeringa d'insulina amb agulla de 21G. D'aquesta manera s'obtenien triplicats de cada mostra. Les plaques es van guardar en safates més grans, netejades prèviament amb alcohol juntament amb plaques de Petri plenes d'aigua estèril per assegurar un 100% d'humitat. Finalment, es van col·locar en incubadors a 37°C i 5% de CO₂, durant 14 dies. Transcorregut aquest temps es va procedir a la lectura, amb el microscopi de fluorescència invertit, de les plaques per determinar el nombre de colònies generades i, si s'esqueia, determinar-ne el percentatge d'EGFP⁺.

De manera general, es van sembrar 25.000 cèl·lules totals de MO no manipulat per placa, i 20.000 cèl·lules totals de MO, si s'havien sotmès a transducció.

Als últims tres experiments es va utilitzar el *kit* comercial de metilcel·lulosa amb citocines recombinants per assaigs clonogènics de cèl·lules murines (Methocult GF M3534, Stem Cell Technologies Inc). En primer lloc, es mesclaven les cèl·lules (s'utilitzava el mateix nombre de cèl·lules que a l'assaig clonogènic convencional) en 200 µl de medi Alpha, seguidament, s'afegien les cèl·lules a 1,8 ml de metilcel·lulosa comercial que contenia tots els components necessaris per la generació de CFC. A partir d'aquí el protocol seguit va ser el mateix que l'anterior tenint en compte, però, que la lectura de les plaques de cultiu per saber el nombre de colònies generades es va fer a dia 7 de cultiu, tal i com recomanava la casa comercial.

10. Anàlisi per citometria de flux

10.1. Immunofluorescència de cèl·lules en suspensió. Tinció directa i indirecta

Per a la caracterització fenotípica de les cèl·lules del MO i per avaluar l'empelt, melsa i SP de ratolins normals o irradiats es van aplicar tècniques d'immunocitoquímica convencional sobre cèl·lules en suspensió, utilitzant anticossos específics conjugats amb fluorocroms contra els antígens de membrana CD45.1 i CD45.2 presents en les cèl·lules hemopoètiques. La lectura de la fluorescència es va fer mitjançant citometria de flux.

Quan l'anticòs estava directament conjugat amb el fluorocrom es va fer una immunofluorescència directa. Aquesta tècnica implica:

- 1) Rentat (pols a 6200 g) de les cèl·lules (0.5×10^6 cèl·lules totals/tub) amb PBS + 1% albúmina bovina (fracció V, Sigma, St Louis, MO, USA) + 0,1% azida sòdica (PBA-azida) i resuspensió del sediment cel·lular en un volum final de 50 µl.
- 2) Bloqueig dels receptors Fc (receptors dels fragments constants de les immunoglobulines) mitjançant la incubació de les cèl·lules amb sèrum de rata (Chemicon International Inc, Temecula, Canada) durant 10 minuts a temperatura ambient.
- 3) Incubació, sense rentar, amb l'anticòs monoclonal anti CD45.1 conjugat amb PE (CD45.1-PE) (clon A20, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), durant 20 minuts a 4°C i protegit de la llum. Com a control isotípic es va utilitzar una immunoglobulina de la mateixa classe i subclasse, és a dir un anticòs IgG-2a-PE (Caltag, Burlingame, CA).

- 4) Rentat amb PBA-azida.
- 5) Incubació durant 10 minuts a temperatura ambient amb 1 ml de solució de lisi* per lisar els eritròcits presents a la mostra.
- 6) Rentat amb PBA-azida, dues vegades.
- 7) Resuspensió del sediment cel·lular amb 500 µl de PBA-azida.
- 8) Afegir 1 µl de la solució 1 µg/µl de 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (Molecular Probes, Oregon, USA) a la suspensió cel·lular. Les cèl·lules mortes tenen les membranes permeables i incorporen el fluorocrom 7-AAD a l'ADN (marcador de viabilitat cel·lular).
- 9) Lectura per citometria de flux.

Quan l'anticòs no estava directament conjugat amb el fluorocrom, es va fer una immunofluorescència indirecta. En aquest cas calia:

- 1) Rentat de 0.5×10^6 cèl·lules totals amb PBA-azida i resuspensió en 50 µl/tub.
- 2) Incubació amb l'anticòs primari anti-CD45.2 conjugat amb biotina (CD45.2-Bio) (Clon 104, Becton Dickinson), durant 20 minuts a 4°C. Com a control isotípic es va utilitzar un anticòs monoclonal IgG-2a biotinilat (Immunotech, Marseille, France).
- 3) Rentat amb PBA-azida.
- 4) Incubació amb estreptavidina conjugada amb APC (Sav-APC) (Becton Dickinson), durant 20 minuts a 4°C i protegit de la llum.
- 5) Rentat amb PBA-azida.
- 6) Incubació amb 1 ml de solució de lisi durant 10 minuts a 37°C.
- 7) Rentat amb PBA-azida, dues vegades.
- 8) Resuspensió del sediment cel·lular amb 500 µl de PBA-azida.
- 9) Afegir 1 µl de la solució 1 µg/µl 7-AAD a la suspensió cel·lular.
- 10) Lectura per citometria de flux.

Tots els anticossos utilitzats van ser prèviament titulats per tal d'establir la concentració d'anticòs mínim adient per al marcatge cel·lular.

En cada cas, es van utilitzar cèl·lules positives (0.5×10^6 cèl·lules totals en 50 μ l de PBA-azida) pel marcador que s'analitzava incubades amb concentracions d'anticòs des de 0.5 μ g/ml fins a 0.03 μ g/ml. La concentració que s'utilitzà dels tres reactius va ser de 0.125 μ g/ml per CD45.2-Biotina, 0.05 μ g/ml per Sav-APC i 0.05 μ g/ml per CD45.1-PE.

*Solució de lisi d'eritròcits (100 ml): 830 mg NH_4Cl
 100 mg CO_3HK
 37,2 mg EDTA Na_2
 enrasar fins a 100 ml amb H_2O
 ajustar pH 7.2-7.4

10.2. Anàlisi de les mostres per citometria de flux

Per l'anàlisi de les mostres es va utilitzar un citòmetre de flux FACScalibur (Becton Dickinson) amb dos làsers refrigerats per aire, un d'argó, sincronitzat a 488 nm, i un d'heli-neó (diode vermell), sincronitzat a 635 nm. Prèviament a l'anàlisi de la mostra es calibrava l'aparell amb fluoresferes *calibrite* (Becton Dickinson) per testar l'alineació d'ambdós làsers.

Es varen determinar 6 paràmetres d'adquisició: FS (*forward scatter*) i SS (*side scatter*); i els detectors de fluorescència: FL-1 (530 nm), FL-2 (585 nm), FL-3 (650 nm) i FL-4 (660 nm). Els tres primers fotomultiplicadors recullen els fotons emesos per l'excitació del làser d'argó (blau) i FL-4 recull els fotons emesos per l'excitació del làser vermell.

10.3. Valoració de les dades citomètriques

La valoració de les dades es feia a posteriori a partir dels *lismodes* generats. Cada usuari estableix un protocol d'adquisició de mostra on escull i combina els paràmetres que vol analitzar. Les dades obtingudes de cada mostra es reflecteixen en histogrames uniparamètrics o biparamètrics:

1. els histogrames uniparamètrics mostren la distribució de freqüències de la població cel·lular analitzada respecte al paràmetre analitzat (FS, SS, FL-1, etc).
2. els histogrames biparamètrics informen de la relació entre dues variables determinades.

Es varen utilitzar histogrames biparamètrics els quals ens permetien correlacionar 2 paràmetres dels 6 analitzats. Es va utilitzar el següent protocol d'anàlisi seqüencial:

1. En primer lloc, es varen combinar els paràmetres FS i SS per poder definir la població cel·lular, descartar el soroll de fons (altres partícules en suspensió que per mida-segons els paràmetres FS-SS- representen cèl·lules mortes, detritus o altres) i definir la finestra d'anàlisi (Fig.12.i).
2. Seguidament es varen discriminar les cèl·lules vives de les mortes, ja que les últimes incorporen 7-AAD (Fig.12.ii).
3. Es va utilitzar un tercer histograma d'anàlisi (Fig.12.iii) per tal de separar les cèl·lules CD45 positives, ja fossin CD45.1 o CD45.2, del resta de les cèl·lules (CD45⁻), majoritàriament eritròcits, eritroblastes i reticulòcits, resistents a la lisi amb clorur d'amoni.
4. El següent histograma (Fig.12.iv) ens mostra el total de les cèl·lules CD45, per tant, a partir d'aquesta població serem capaços de determinar l'empelt hemopoètic ja que les cèl·lules del donant són CD45.1⁺ i les del receptor CD45.2⁺.
5. L'últim histograma (Fig.12.v) representa les cèl·lules de l'empelt (CD45.1⁺) que expressen EGFP.

En tots els casos, prèviament a l'anàlisi de la mostra problema, es varen utilitzar els controls isotípics corresponents per tal de poder diferenciar la població positiva que expressa l'antigen que s'estudia de la negativa, que pot tenir certa unió inespecífica a l'anticòs.

Totes les anàlisis citomètriques es van fer amb un mínim de 50.000 "events". Només en els casos on l'empelt hemopoètic era inferior a l'1% s'analitzaren un mínim de 100.000 "events" per donar més validesa al resultat obtingut.

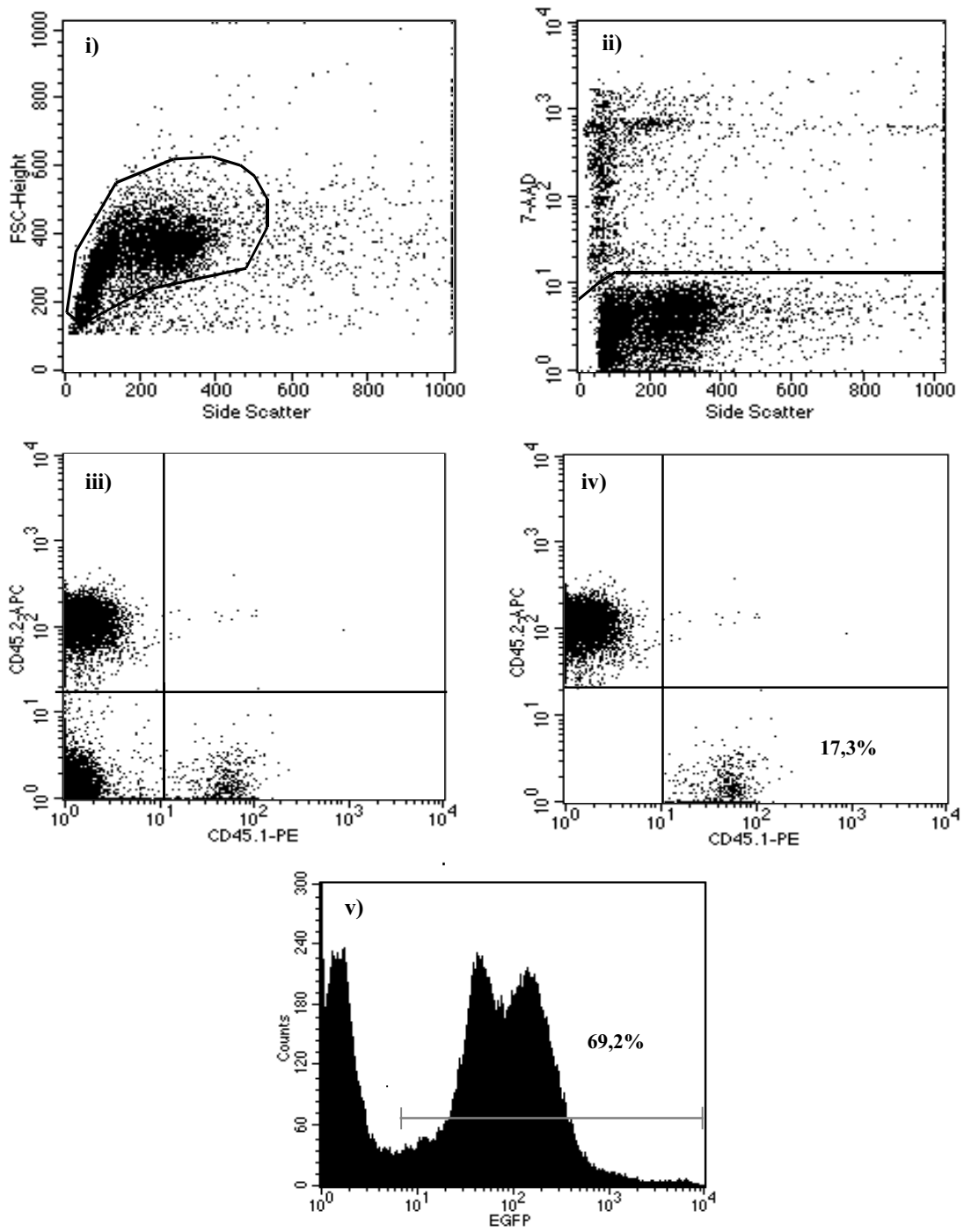


Fig.12. Exemple d'una anàlisi per citometria de flux de l'empelt (iv) a llarg termini i del percentatge de cèl·lules EGFP⁺ (v) de l'empelt a MO d'un ratolí que fou irradiat amb 6 Gy i trasplantat amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes d'un donant CD45.1⁺.

11. Estudi de l'empelt hemopoètic

A. Trasplantament de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules (manipulades i no manipulades) per ratolí

Per estudiar l'empelt hemopoètic, tant a curt com a llarg termini, es va utilitzar l'assaig de repoblació hemopoètica, que contempla els següents passos (Fig.13):

1) Acondicionament o no dels receptors mitjançant irradiació.

Els ratolins receptors (C57BL/6J) van ser condicionats, 24 hores abans de ser trasplantats, mitjançant dosis creixents entre 0 i 900 cGy (amb intervals de 100 cGy) d'ICT. La taxa de dosi utilitzada en tots els casos fou de 50 cGy/min.

2) Trasplantament dels receptors.

Les cèl·lules per trasplantar, transduïdes o no, es van diluir en 200 µl de PBS per ratolí. Tant si les cèl·lules que s'injectaven havien estat manipulades com no, van ser incubades prèviament amb 10 UI d'ADNasa (Sigma), durant 10 minuts a 37°C.

En el grup de ratolins irradiats amb la dosi més alta (900 cGy), com a controls d'irradiació, es van utilitzar ratolins irradiats i injectats intravenosament amb 200 µl de PBS (sense cèl·lules). La mort d'aquests ratolins, entre els dies +7 a +30 post-irradiació, indicava la impossibilitat de reconstitució hemopoètica endògena.

De manera general es van injectar 5 receptors per cada grup a analitzar.

El trasplantament de les cèl·lules hemopoètiques es va realitzar mitjançant injecció intravenosa en les venes de la cua dels ratolins. Per afavorir la punció, les venes van ser prèviament dilatades mitjançant l'escalfament de la cua amb aigua a 37 °C.

El trasplantament realitzat era singènic, és a dir, els ratolins donants i els receptors tenien els mateixos antígens MHC, amb la qual cosa no hi ha problemes de rebuig immunològic.

Després del trasplantament els ratolins van ser estabulats en condicions estèrils i periòdicament es va controlar el nombre de ratolins que sobreviuen fins els 30 dies post-irradiació.

3) Anàlisi de l'empelt a curt termini (40 dies)

Als 40 dies post-trasplantament es va procedir a l'extracció d'una gota de sang (aproximadament 50 µl) mitjançant una petita incisió a la cua dels diferents ratolins receptors trasplantats. El volum de sang obtingut (contenia aproximadament 5×10^5 cèl·lules) es va resuspendre en 400 µl de PBS. Posteriorment es va procedir a la realització de la tinció per immunofluorescència, segons el descrit a l'apartat 9.1, per quantificar, mitjançant citometria de flux, la presència de les CMN del donant (CD45.1, revelades com PE⁺) a la SP dels ratolins receptors (CD45.2, revelada com APC⁺).

Als ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes, es va analitzar la presència de cèl·lules del donant juntament amb el percentatge de cèl·lules EGFP⁺. Com a control de transducció es va utilitzar la SP dels ratolins trasplantats amb cèl·lules del MO incubades amb medi sense retrovirus.

4) Anàlisi de l'empelt a llarg termini (22 setmanes)

Transcorregudes 22 setmanes des del trasplantament, els receptors es van sacrificar i es va analitzar la presència de cèl·lules del donant en el MO, melsa i SP d'aquests ratolins.

Les mostres de SP es van obtenir per punció cardíaca i les mostres de MO i melsa s'obtingueren, segons els apartats 3 i 5, respectivament. Es realitzà l'immunofluorescència per analitzar la presència dels marcadors de membrana CD45.1 (revelat com a PE⁺) i CD45.2 (revelat com a APC⁺) en combinació amb l'expressió d'EGFP, en els grups de ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes. La lectura es va fer per citometria de flux.

Com a control de transducció, en els grups de ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes, es van utilitzar cèl·lules de SP, MO i melsa dels ratolins trasplantats amb cèl·lules no transduïdes.

B. Trasplantament de 5×10^6 cèl·lules manipulades per ratolí.

Les cèl·lules per trasplantar, recollides en el dia +4 del cultiu, es van diluir de manera que el nombre total de cèl·lules a injectar quedés resuspès en 500 µl de PBS. Aquest va ser el volum injectat a cada ratolí. Per cada ratolí s'afegia 5 UI d'heparina sòdica (Laboratorios Farmacéuticos ORBI, S.A., Madrid, España) i prèviament a l'injecció s'incubava amb ADNasa, durant 10 minuts a 37°C, a raó de 40 UI d'ADNasa/ratolí.

Es van injectar 3 receptors per cada grup (sempre que les condicions experimentals no ho impedién) i es va analitzar l'empelt tant a curt com llarg termini així com l'expressió d'EGFP tal i com s'especifica en l'apartat A d'aquest punt.

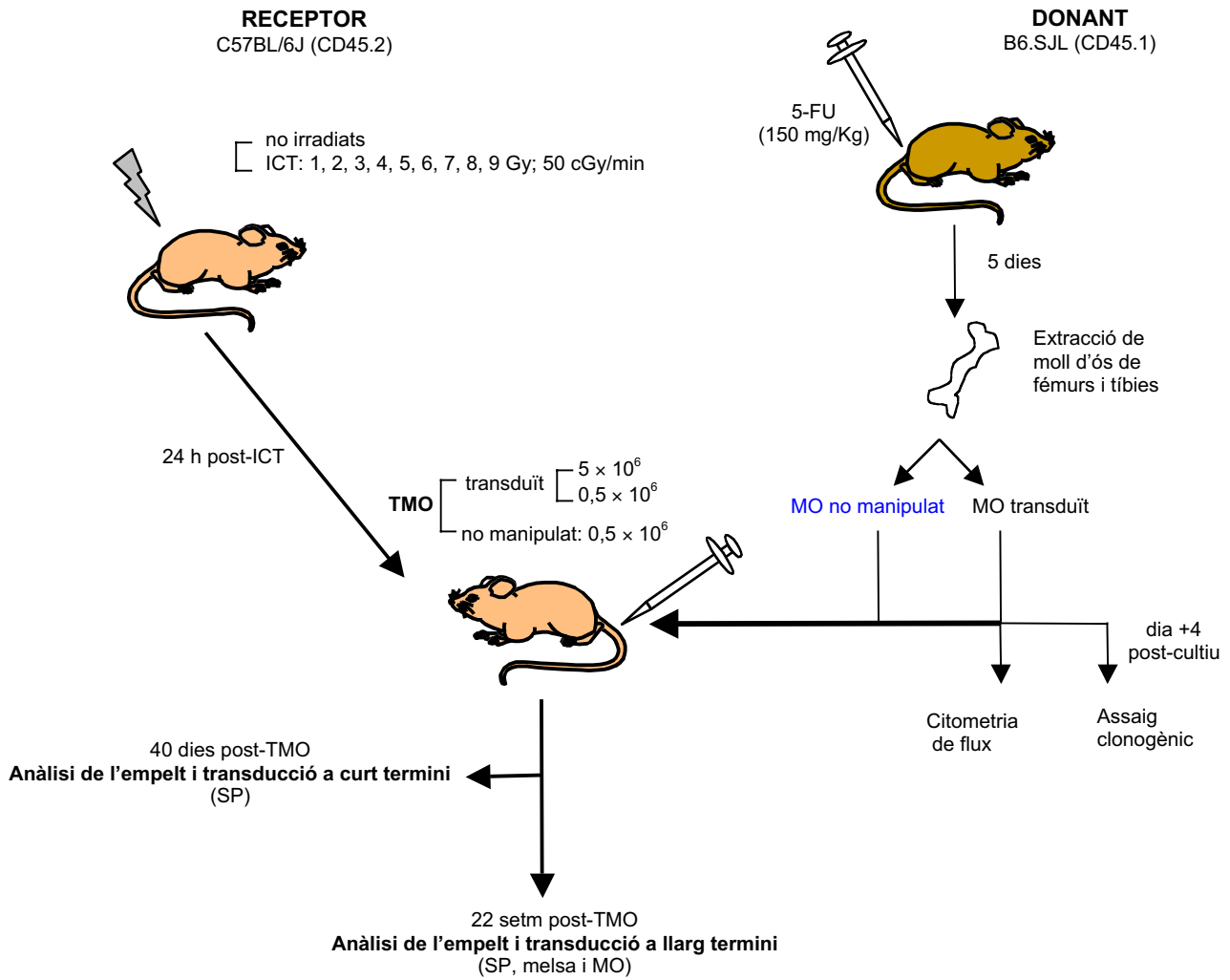


Fig.13. Esquema del disseny experimental utilitzat per l'anàlisi de l'empelt hemopoètic i de la transducció.

12. Anàlisi estadística

Es varen utilitzar les següents tècniques estadístiques:

1. Prova de la t d'Student

S'aplicava quan es volia comparar les mitjanes de variables quantitatives entre dos grups de dades independents. Si la distribució de dades per cada grup no s'ajustava a la normal, s'utilitzava la prova no paramètrica "U" de Mann-Withney. Quan es comparaven dues mitjanes dels mateixos individus, es va utilitzar la prova t d'Student per a dades aparellades.

Es va considerar un resultat estadísticament significatiu quan $p < 0.05$ i quan $p > 0.05$ les diferències no eren estadísticament significatives.

2. Prova de l'anàlisi de la variància (ANOVA d'un factor)

S'aplicava quan es volia comparar més de dos grups de dades independents per una variable quantitativa. Els grups foren comparats entre ells mitjançant la prova de Tukey quan l'anàlisi de la variància detectava globalment diferències estadísticament significatives.

Si no es complien els criteris d'aplicació (bàsicament si la distribució de dades per cada grup no s'ajustava a la normal) s'utilitzava la prova no paramètrica de Kruskal Wallis.

Es va considerar un resultat estadísticament significatiu quan $p < 0.05$ i quan $p > 0.05$ les diferències no eren estadísticament significatives.

3. Prova de Kolmogorov-Smirnov

Per establir l'aplicabilitat de la prova de la t d'Student o de l'anàlisi de la variància, s'estudiava prèviament la normalitat de les variables mitjançant la prova de Kolmogorov-Smirnov (186) i l'homogeneïtat de les variàncies amb la prova de Levene.

En tots els casos, l'anàlisi estadística de les dades es va fer mitjançant el programa informàtic SigmaStat 2.03 (SPSS Inc) i els gràfics amb el programa informàtic SigmaPlot 4.01 (SPSSInc).

RESULTATS

1. Obtenció i caracterització d'una línia cel·lular productora de retrovirus ecotròpics (NX-E/EGFP)

1.1. Generació de la línia productora NX-E/EGFP

Prèviament, al nostre laboratori ja disposàvem del vector retroviral SF-EGFP, basat en el FMEV, que s'havia desenvolupat dins d'un projecte finançat (CYCIT-SAF 96/0130).

El vector FMEV (187) es va obtenir del grup d'Ostertag (HPI, Hamburg). Vàrem utilitzar el vector híbrid FMEV (SFFV/MESV) perquè estava demostrat que aquest constructe augmentava l'expressió del transgen en progenitors hemopoètics mieloides i a la cèl·lula mare hemopoètica (11, 131, 158). El provirus integrat contenia la seqüència *leader* de MESV i a l'extrem 5' una versió modificada LTR de SFFV. Aquest LTR es va dissenyar per minimitzar la possibilitat de recombinació del provirus i reduir el risc de produir virus salvatges (Fig.14).

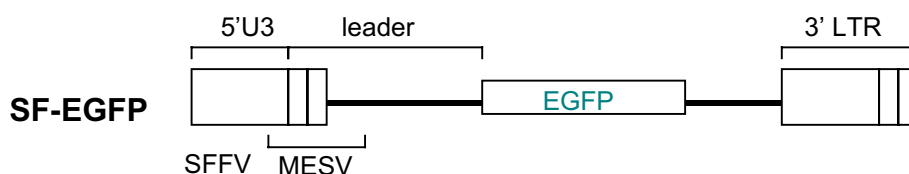


Fig.14. Forma proviral del vector SF-EGFP després de la integració del retrovirus al genoma cel·lular (SFFV, polycythemic strain of the spleen focus forming virus; MESV, murine embryonic stem cell virus; LTR, long terminal repeat).

Per obtenir la línia cel·lular ecotròpica es va partir de la línia empaquetadora NX-E, derivada de la línia cel·lular humana 293 (cèl·lules epitelials de ronyó embrionari). Amb el sobrenadant de la línia cel·lular productora pseudotipada PG13/EGFP7, creada al nostre laboratori, es varen infectar les cèl·lules NX-E. Posteriorment, per obtenir les cèl·lules NX-E que expressaven el gen marcador EGFP es va utilitzar el dispositiu d'“autoclon” del citòmetre de flux. Amb aquest sistema va ser possible seleccionar i recollir cèl·lules NX-E EGFP⁺ individualment (clons) en plaques de cultiu de 96 pous.

Es va fer un seguiment dels 87 clons que creixeren a les plaques de cultiu mitjançant l'anàlisi al microscopi òptic de fluorescència dels clons per tal de poder diferenciar els que emetien fluorescència verda dels clons negatius, que es varen descartar.

Després d'aquest primer cribratge es varen analitzar els 50 clons EGFP⁺ positius presents a la placa de cultiu. Per això es van recollir 100 µl de sobrenadant de cada clon, es varen infectar les cèl·lules diana NIH/3T3 i es va analitzar l'eficiència de transducció de cada clon per citometria de flux. Per a poder comparar l'eficiència de transducció de cada clon calia que quan es recollís el sobrenadant dels diferents clons, aquests fossin tots en el mateix estadi de creixement, proper al 100 % de confluència.

Després de testar els 50 sobrenadants, el clon que va mostrar el títol víric més elevat va ésser seleccionat pels posteriors experiments i anomenat NX-E/EGFP.

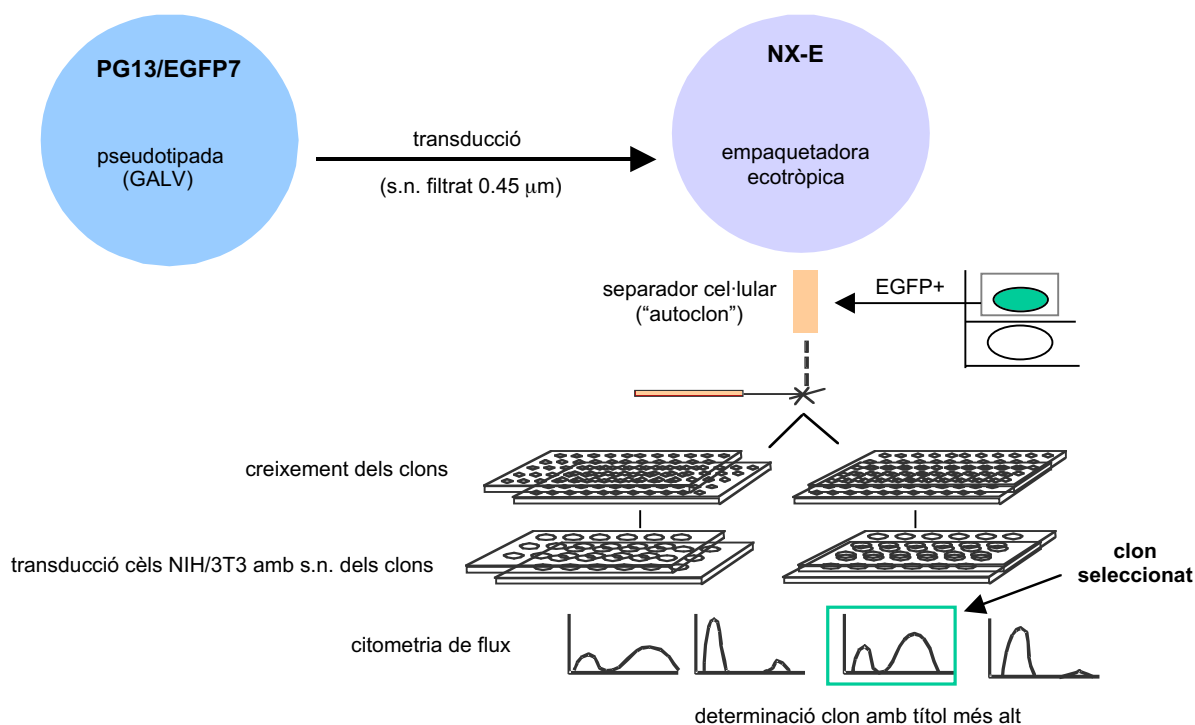


Fig.15. Esquema de l'estratègia utilitzada per la creació de la línia productora NX-E/EGFP.

1.2. Caracterització de la línia productora NX-E/EGFP

1.2.1. Estudi de l'efecte de diferents variables en l'eficiència de transducció de cèl·lules NIH/3T3 per les línies productores de retrovirus: NX-E/EGFP i PA317/EGFP

Tenint en compte que la incorporació del fragment CH-296 de la fibronectina recombinant humana en els protocols de transducció retroviral augmentava considerablement l'entrada dels virus a la cèl·lula (ja que s'afavoria la co-localització de les partícules víriques amb les cèl·lules diana tal i com s'ha comentat a l'apartat 10 de l'Introducció) i, en segon lloc, observant al laboratori que també es donava el mateix efecte quan se centrifugaven les plaques de cultiu una vegada afegits els sobrenadants vírics; prèviament a la titulació del clon NX-E/EGFP; es va voler estudiar la influència d'aquests factors en la millora de la transducció mitjançant retrovirus.

S'escolliren dues línies productores de retrovirus creades al laboratori. Ambdues contenen el gen marcador EGFP, la línia amfotròpica PA317/EGFP1 i la línia ecotròpica en qüestió, la NX-E/EGFP.

Com a cèl·lules diana es varen utilitzar els fibroblasts murins NIH/3T3, que eren sensibles a la infecció tant per retrovirus ecotròpics com amfotròpics. En tots els casos, es varen cultivar 20.000 cèl·lules NIH/3T3 en plaques de cultiu de 12 pous i es varen sotmetre a 4 protocols de transducció que tansols es diferenciaven en:

- i) Afegir sulfat de protamina (SP) 4 µg/ml.
- ii) Afegir SP (4 µg/ml) i centrifugar la placa de cultiu (1800 rpm, 33 °C, 90 minuts).
- iii) Afegir SP (4 µg/ml) i pre-tractar la superfície de cultiu amb CH-296 (4 µg/cm²) i
- iv) Afegir SP (4 µg/ml), centrifugar la placa de cultiu (1800 rpm, 33 °C, 90 minuts) i pre-tractar la superfície de cultiu amb CH-296 (4 µg/cm²).

Vint-i-quatre hores després es varen infectar les cèl·lules amb diferents volums de sobrenadant (5, 10, 25, 50, 200, 400, 800 i 1000 μ l), filtrat a través d'un filtre de 0,45 μ m, de la línia productora i 48 hores després del cicle d'infecció es procedí a la lectura per citometria de flux del percentatge de cèl·lules EGFP⁺. Es varen realitzar triplicats per cada protocol de transducció i per cada una de les línies productores.

En ambdós grups d'experiments, és a dir, tant si s'utilitzava la línia productora amfotròpica PA317/EGFP1 com l'ecotròpica NX-E/EGFP, els resultats obtinguts, quan a percentatge de cèl·lules diana NIH/3T3 transduïdes amb els quatre protocols de transducció, eren equivalents (Fig.16). Així doncs, s'escollí el protocol de transducció més senzill i barat, afegir sulfat de protamina 4 μ g/ml, per a la titulació de la línia NX-E/EGFP.

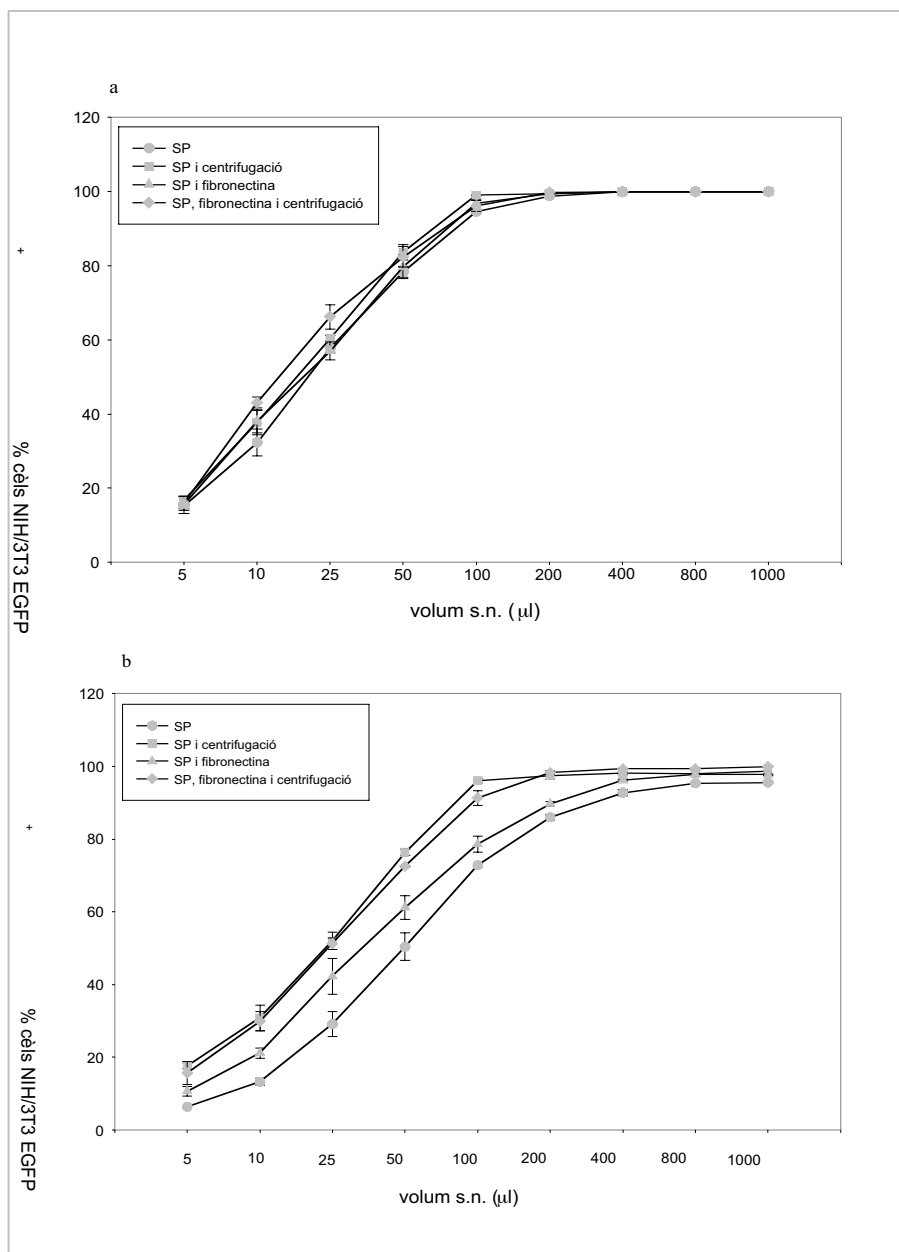


Fig.16. Percentatge de cèl·lules NIH/3T3 EGFP⁺ quantificades per citometria de flux 48 hores després de la transducció amb diferents volums de sobrenedant (s.n.) de la línia NX-E/EGFP (a) i PA317/EGFP 1 (b) i segons diferents protocols de transducció. S'indica la mediana i el rang per cada volum de s.n. (n = 5) de cada protocol de transducció.

1.2.2. Determinació del títol víric de la línia NX-E/EGFP

Per l'experiment de titulació de la línia NX-E/EGFP es varen utilitzar les cèl·lules fibroblàstiques murines NIH/3T3 com a cèl·lules diana. Es varen infectar 20.000 cèl·lules NIH/3T3 amb els volums: 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 400, 500, 800 i 1000 μ l de sobrenadant filtrat (0.45 μ m) de la línia productora. En tots els casos es fa afegir 4 μ g/ml de sulfat de protamina.

La determinació del número de partícules víriques infectives per unitat de volum (títol víric) es va calcular a partir dels resultats observats a la part lineal (sensible) de la corba de titulació, d'acord amb la fórmula següent:

$$\text{Títol víric} = \frac{\text{num cèls diana} * \% \text{EGFP+ (títol absolut)}}{\text{volum sobrenadant } (\mu\text{l})}$$

(* cèl·lules diana presents en el moment de la transducció)

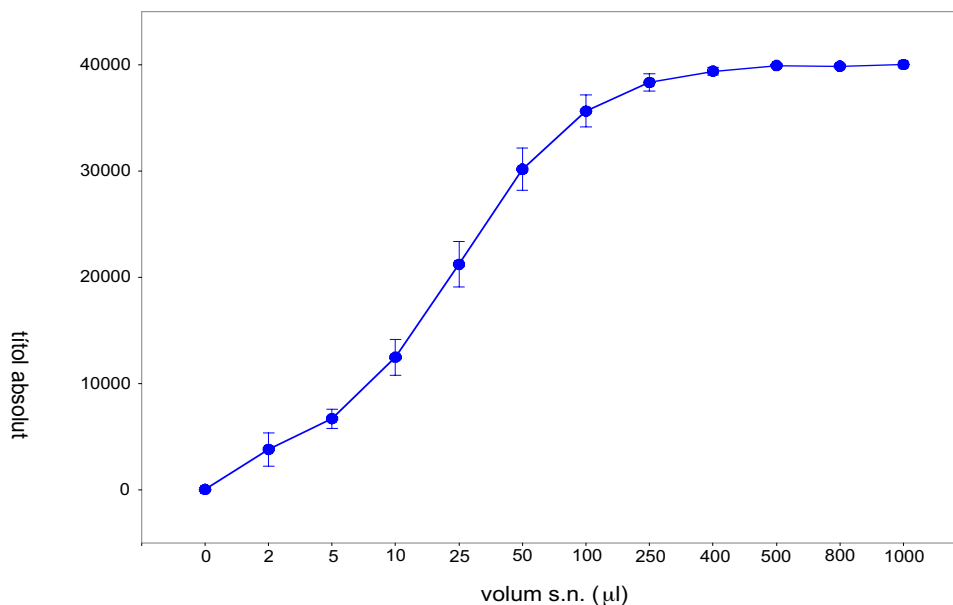


Fig. 17. Corba de titulació de la línia productora NX-E/EGFP sobre les cèl·lules NIH/3T3. S'Indica la mitjana i l'error estàndard per cada volum de s.n. (n = 10).

El títol víric de la línia NX-E/EGFP (n=13) oscil·lava entre $0,5$ i 2×10^6 partícules víriques infectives $\times \text{ml}^{-1}$.

La línia es va mantenir en cultiu durant 2 mesos. En aquest període no s'observà pèrdua de l'expressió d'EGFP ni pèrdua del títol víric per la qual cosa es confirmà l'estabilitat de la línia. A més, tampoc s'observà disminució del títol víric durant el temps de durada del treball experimental (3 anys).

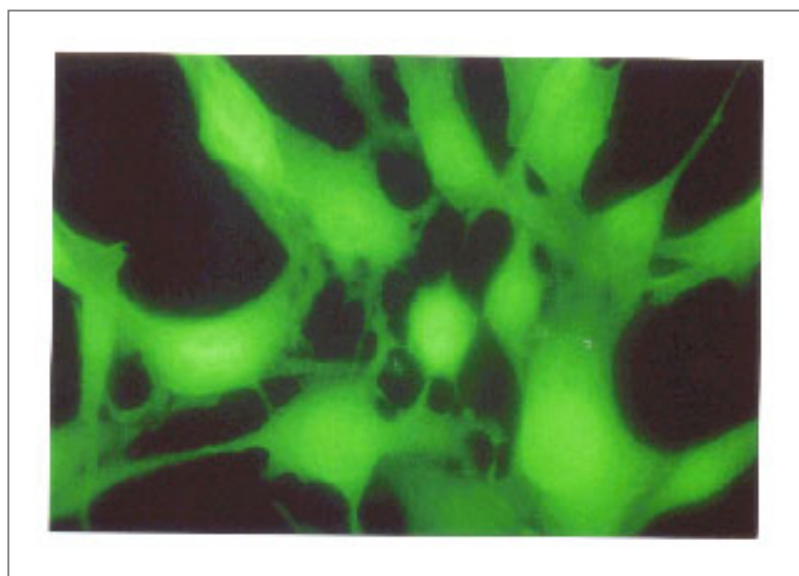


Fig.18. Foto al microscopi de fluorescència de la línia productora NX-E/EGFP (llum UV, $400 \times$).

1.3. Estudi de la integració del vector SF-EGFP a la línia cel·lular productora. Determinació del número de còpies del provirus presents al genoma de la línia NX-E/EGFP.

Per finalitzar amb la caracterització de la línia productora NX-E/EGFP (provinent d'un clon únic) es va estudiar:

- i) La integritat del provirus (si el vector estava correctament integrat al genoma cel·lular).
- ii) El número de còpies del vector presents a l'ADN de les cèl·lules productores.

L'anàlisi es va fer mitjançant *Southern blot* seguint el protocol especificat a l'apartat 8.3 de Material i Mètodes. Per l'estudi de la integritat del provirus utilitzarem l'enzim de restricció Asp 718, que reconeix una seqüència diana present dins les regions LTR del vector (per tant, talla 2 vegades dins del provirus); i, per l'estudi del número de còpies, l'enzim BamHI, que reconeix una diana única dins la seqüència del provirus (Fig.19.A).

Utilitzant el primer enzim es podria contestar la primera de les preguntes (i) i dels resultats obtinguts a partir de l'activitat de BamHI, es coneixeria el número de vegades que el vector s'havia integrat al genoma de les cèl·lules productores.

Com a control negatiu, es va fer el mateix procés, però per a la línia empaquetadora NX-E, que no contenia el provirus al seu genoma.

El resultat de la hibridació de l'ADN de la línia NX-E/EGFP i de la línia control (NX-E) digerit amb l'enzim Asp 718 amb una sonda radioactiva del gen EGFP (Fig.19.B.1) va mostrar una banda específica de la mida esperada (2,5 Kb), indicant la integritat del provirus. Pel que fa a les digestions amb l'enzim BamHI, la sonda va hibridar específicament amb dues bandes de diferent tamany (Fig.19.B.2), indicant la presència de dues còpies del provirus integrades a l'ADN de les cèl·lules productores.

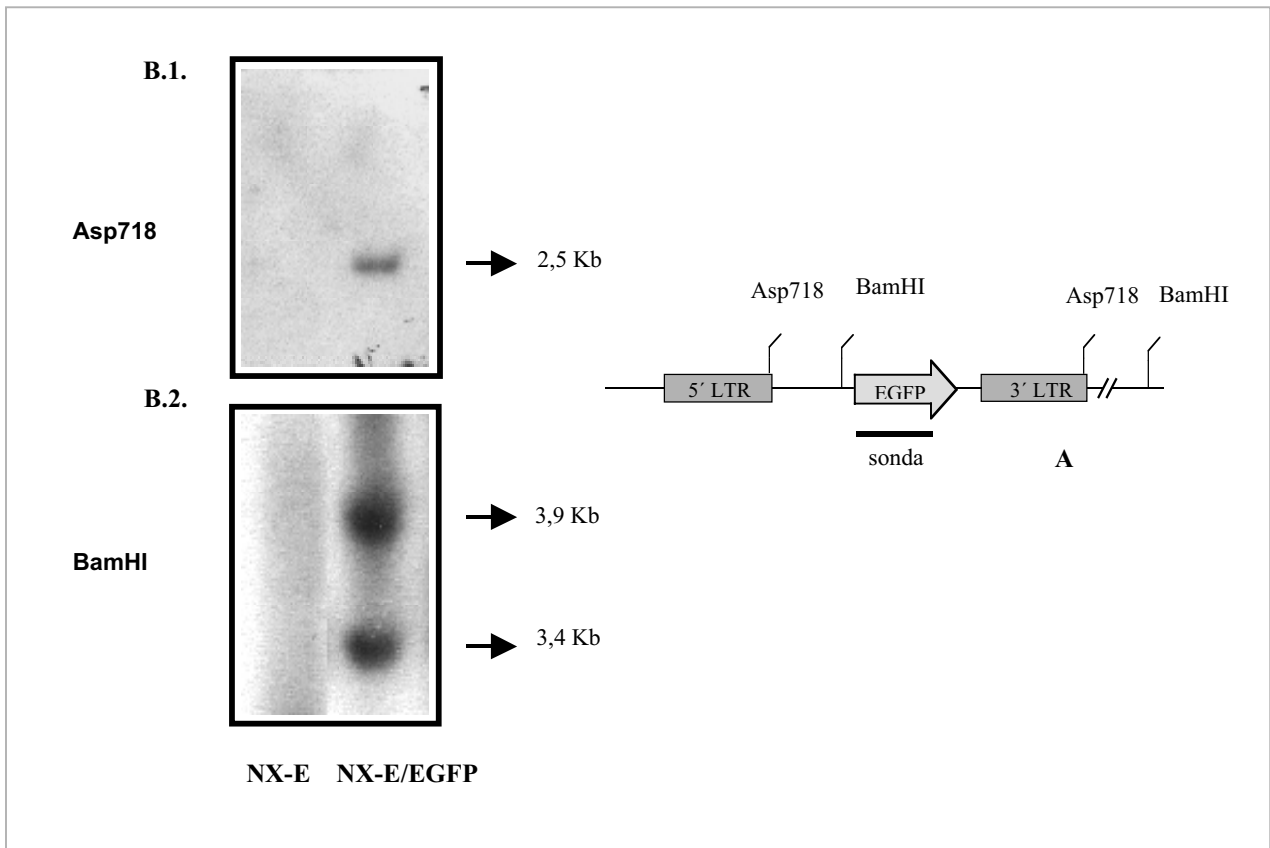


Fig.19. Anàlisi per *Southern blot* de la línia cel·lular productora NX-E/EGFP. L'ADN genòmic de la línia cel·lular NX-E/EGFP fou digerit amb BamHI i Asp 718. Com a control negatiu es digerí l'ADN de la línia empaquetadora NX-E.

2. Optimització d'un protocol de transducció de cèl·lules de MO murines

2.1. Estudi de la influència del SP, la centrifugació de les plaques de cultiu i el fragment CH-296 en l'eficiència de transducció de cèl·lules hemopoètiques murines

Per estudiar la influència del SP, la centrifugació de les plaques de cultiu i el fragment CH-296 en la millora de l'eficiència de transducció de les cèl·lules hemopoètiques murines, es varen transduir les cèl·lules del MO amb tres protocols de transducció que només es diferenciaven en:

- a) afegir SP (4 $\mu\text{g/ml}$) i centrifugar les plaques de cultiu (1800 rpm, 33 °C, 90 minuts),
- b) afegir SP (4 $\mu\text{g/ml}$) i pre-tractar la superfície de la placa de cultiu amb CH-296 (4 $\mu\text{g/cm}^2$) i
- c) afegir SP (4 $\mu\text{g/ml}$), pre-tractar la superfície de la placa de cultiu amb CH-296 (4 $\mu\text{g/cm}^2$) i centrifugar les plaques de cultiu (1800 rpm, 33 °C, 90 minuts).

En tots els casos es varen transduir les cèl·lules del MO segons el protocol que es detalla més endavant (apartat 2.3 de resultats). Quaranta vuit hores després de l'últim cicle es va quantificar per citometria de flux el percentatge de cèl·lules del MO que expressaven EGFP. Com a control negatiu de la transducció, en cadascun dels casos, es varen cultivar cèl·lules del MO en les mateixes condicions que les cèl·lules que serien transduïdes però no es varen sotmetre als cicles d'infecció amb retrovirus.

Tal i com s'observa a la taula 6, quan s'afegia SP, CH-296 i se centrifugaven les plaques de cultiu s'obtenia un percentatge de cèl·lules del MO transduïdes més elevat que en els altres protocols (Fig.20). No obstant, les diferències només varen ser estadísticament significatives entre els protocols a i b ($p = 0.001$), i entre els protocols a i c ($p < 0.001$).

Protocol de transducció	n	% EGFP ⁺
SP i centrifugació (a)	3	23.1 ± 9.4
SP i CH-296 (b)	3	69.5 ± 9.3
SP, CH-296 i centrifugació (c)	3	87.3 ± 3.8

Taula 6. Percentatge de cèl·lules del MO EGFP⁺ després de ser sotmeses a tres protocols de transducció diferents. Les dades són la mitjana ± desviació estàndard. La n representa el nombre d'experiments realitzats per cada protocol.

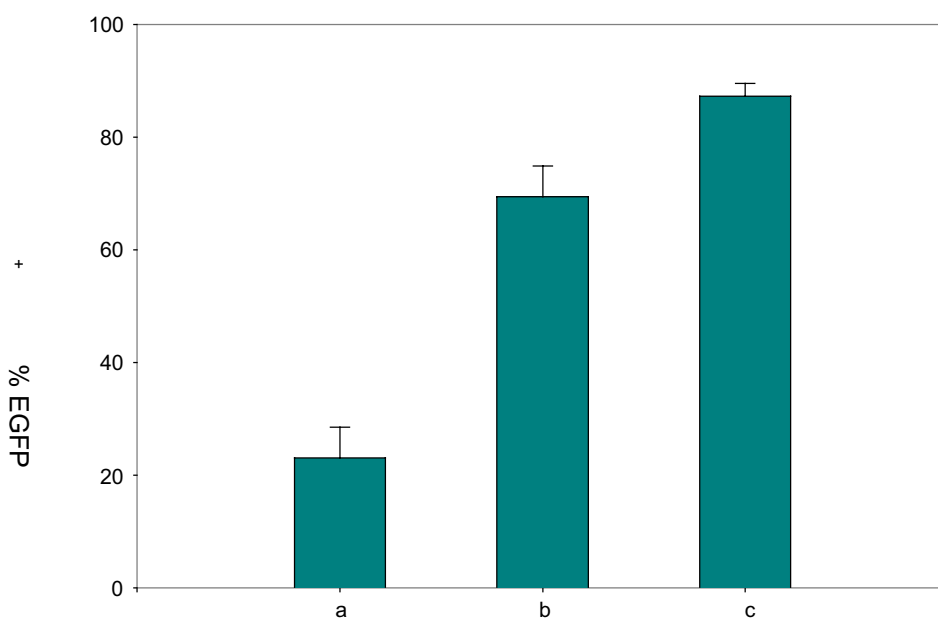


Fig.20. Percentatge de cèl·lules del MO EGFP⁺ segons el protocol de transducció utilitzat: SP i centrifugació de les plaques de cultiu (a), SP i el fragment CH-296 (b) o bé els tres factors: SP, centrifugació de les plaques i CH-296 (c). S'Indica la mitjana i la desviació estàndard de cada protocol de transducció (n = 3).

Segons els resultats obtinguts, el que més augmentava l'eficiència de transducció de les cèl·lules del MO era el pre-tractament de la superfície de cultiu amb el fragment CH-296. No obstant, si s'afegia, a més, la centrifugació de les plaques augmentava, encara que no significativament, el percentatge de cèl·lules del MO transduïdes. Així doncs, tenint en compte totes les observacions, es va decidir incloure, a més del SP i el pre-tractament amb CH-296, la centrifugació de les plaques de cultiu, en el protocol de transducció (protocol c, Taula 6).

2.2. Efecte del període de pre-incubació de les cèl·lules del MO amb citocines en l'eficiència de transducció

Per determinar el període de pre-incubació òptim, es varen cultivar les cèl·lules del MO en medi de cultiu (IMDM + 20% FCS), 10% MC WEHI, com a font d'IL-3, i 8% MC BHK, com a font d'SCF murí.

Es varen escollir els següents temps d'incubació de les cèl·lules amb els medis condicionats, abans de l'infecció amb els retrovirus:

- i) 0 hores de pre-incubació (protocol 0),
- ii) 24 hores de pre-incubació (protocol 1) i
- iii) 48 hores de pre-incubació (protocol 2).

Seguidament, en tots tres casos, es varen realitzar dos cicles d'infecció amb el sobrenadant filtrat de la línia productora NX-E/EGFP, tal i com s'especifica al punt 2.3 de l'apartat Resultats. El percentatge de cèl·lules del MO EGFP⁺ va ser determinat per citometria de flux (Fig.21.A). A més, es varen realitzar cultius clonogènics per tal de conèixer el número de progenitors murins (CFC) que expressaven el marcador (Fig.21.B).

Com a control negatiu es van utilitzar cèl·lules del MO cultivades durant els mateixos dies, en condicions equivalents, però no exposades als retrovirus. Amb aquestes cèl·lules es varen realitzar igualment cultius clonogènics i varen ser analitzades per citometria de flux. De manera general, la fluorescència inespecífica generada per aquestes cèl·lules no va superar mai l'1%.

La durada del període de pre-incubació (0, 24 i 48 hores) no va modificar ni el percentatge de cèl·lules del MO EGFP⁺, ni el percentatge de progenitors CFC EGFP⁺ obtinguts per cada protocol. Així doncs, es va decidir adoptar el període de 24 hores de pre-incubació de les cèl·lules amb citocines.

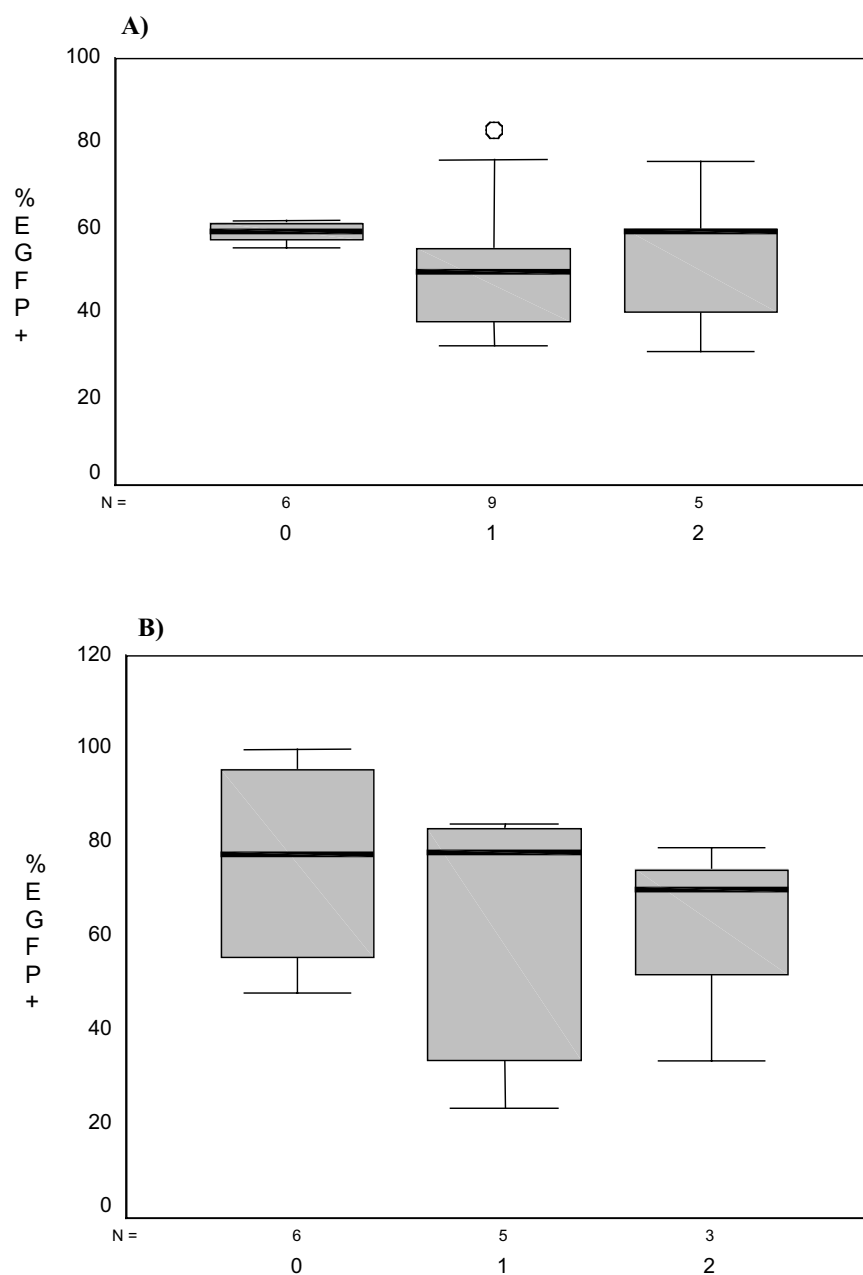


Fig.21. Percentatge de cèl·lules del MO EGFP⁺ (A) i percentatge de CFC EGFP⁺ (B), segons el període de pre-incubació de 0 hores (0), 24 hores (1) i 48 hores (2). La N representa el número d'experiments independents per a cada protocol. La línia horitzontal del "box plot" indica la mediana de la població. El "box" indica el 50% de la població i entre les patilles (*whiskers*) mínima i màxima s'inclou el 95% de la població. El cercle indica un valor extrem.

A la Fig.22 es representen els histogrammes uniparamètrics resultants de l'anàlisi per citometria de flux d'un experiment representatiu de cèl·lules del MO transduïdes amb la línia NX-E/EGFP.

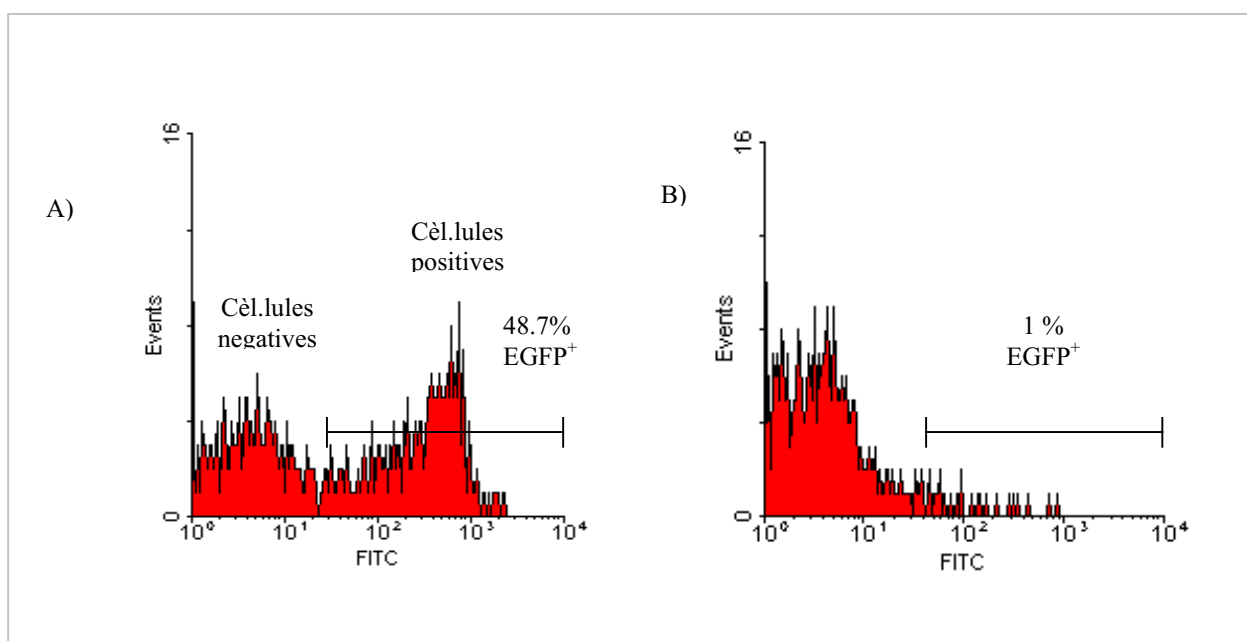
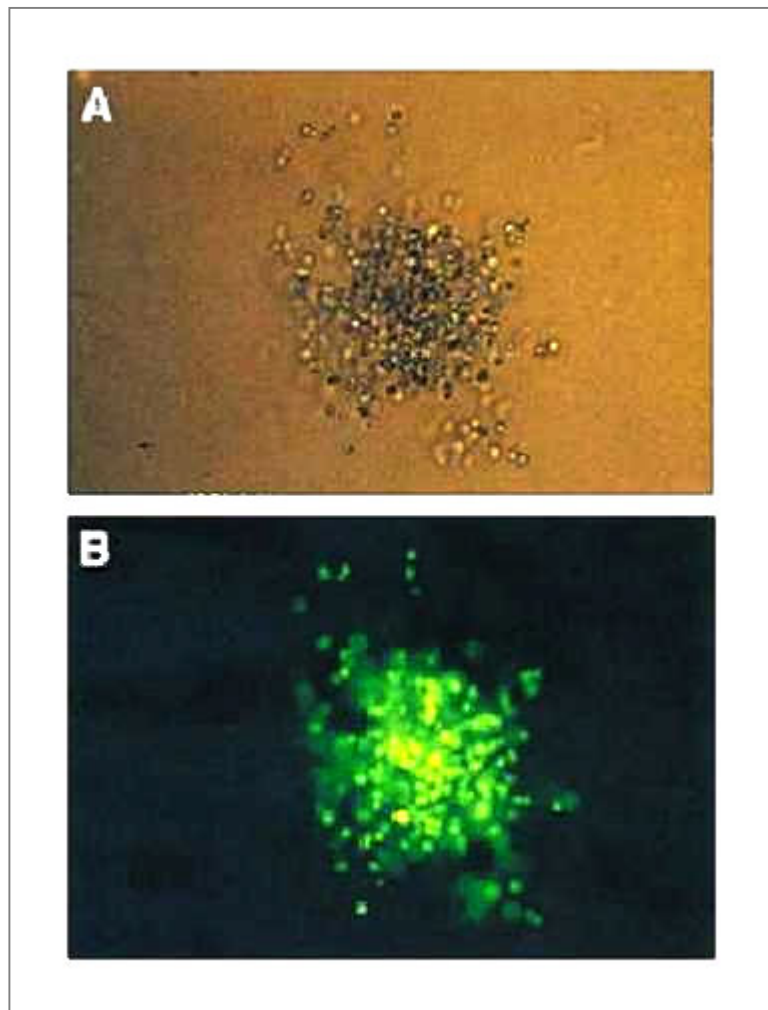


Fig.22. Exemple de dos histogrammes uniparamètrics resultants de l'anàlisi per citometria de flux d'una suspensió de cèl·lules de MO transduïdes amb la línia NX-E/EGFP (A) i el seu corresponent control negatiu de transducció (B).

La Figura 23, és una colònia CFU-GM generada a partir de cèl·lules murines del MO transduïdes amb la línia NX-E/EGFP, analitzada sota llum visible (A) i UV (B) (100 X)



2.3. Protocol definitiu de transducció de cèl·lules del MO murines

Els resultats obtinguts en els anteriors apartats (2.1 i 2.2) varen ser de gran utilitat pel desenvolupament del protocol definitiu per a la transducció de les cèl·lules hemopoètiques murines. El protocol va incloure els següents passos (Fig.24):

1) Administració de 5-FU als ratolins donants i obtenció de les cèl·lules del MO.

Totes les cèl·lules del MO que es van transduir es van obtenir de ratolins B6.SJL-Ptprc^aPep3^b/BoyJ injectats i.p. amb 150 mg/Kg de 5-FU. Aquest tractament, elimina cèl·lules en cicle cel·lular i permet l'enriquiment del MO en cèl·lules progenitores més immadures alhora que indueix la seva entrada en cicle cel·lular, un fet necessari per la integració del retrovirus. Transcorreguts 5 dies des de la injecció amb 5-FU, els ratolins es sacrificaven i s'obtenien les cèl·lules del MO tal i com s'especifica a l'apartat 3 de Material i Mètodes.

2) Tractament de les plaques de cultiu amb fibronectina.

Abans de col·locar les cèl·lules, les plaques de cultiu s'incubaven amb el fragment CH-296 de la fibronectina recombinant humana (RetronectinTM, Takara Shuzo, Co, LTD, Japan) a raó de 4 µg/cm², durant 2 hores a temperatura ambient. Seguidament es recollia el CH-296 restant i es rentava la superfície de la placa de cultiu amb PBS +2% d'albumina humana durant 30 minuts a temperatura ambient. Finalment, es feia un últim rentat amb solució HBSS (Hank's balanced salt solution) + Hepes 25 mM.

3) Pre-incubació de les cèl·lules del MO amb citocines.

Les cèl·lules del MO es cultivaven en les plaques de cultiu pre-tractades amb CH-296 a una concentració de 1x10⁶ cèl·lules/ml, en medi IMDM + 20% FCS + 10% MC WEHI + 8% MC BHK, durant 24 hores a 37°C i 5% de CO₂ i 100% d'humitat.

4) Cicles d'infecció.

Es realitzaven 2 cicles d'infecció. Després de les 24 hores d'incubació amb les citocines, el 90% del volum contingut en cada un dels pous es recollia i centrifugava a 1500 rpm durant 5 minuts. Posteriorment, els sediments cel·lulars resultants es resuspenien amb el sobrenadant retroviral recollit a partir de la línia cel·lular productora ecotòpica NX-E/EGFP, es re-col·locaven en els pous corresponents (proporció 1:9) i s'afegia el SP (4 µg/ml).

A continuació, la placa de cultiu es centrifugava a 1800 rpm durant 90 minuts i a 32 °C. Finalment s'incubava durant 24 hores a 37°C i 5% de CO₂ i 100% d'humiditat. Aquest procés corresponia al primer cicle d'infecció. L'endemà es repetia el procés per completar el segon cicle d'infecció.

L'obtenció d'un sobrenadant ric en retrovirus recombinants requereix que la línia cel·lular productora estigui creixent en confluència. En aquest moment, el medi de cultiu de la línia productora se substituïa per medi IMDM + 20% FCS i transcorregudes 24 hores, el seu sobrenadant (ric amb partícules víriques infectives) es recollia i es filtrava amb un filtre de 0.45 µm per assegurar que estigués lliure de cèl·lules. Finalment, abans d'utilitzar-lo per la resuspensió de les cèl·lules del MO, es suplementava amb 10% MC WEHI + 8% MC BHK.

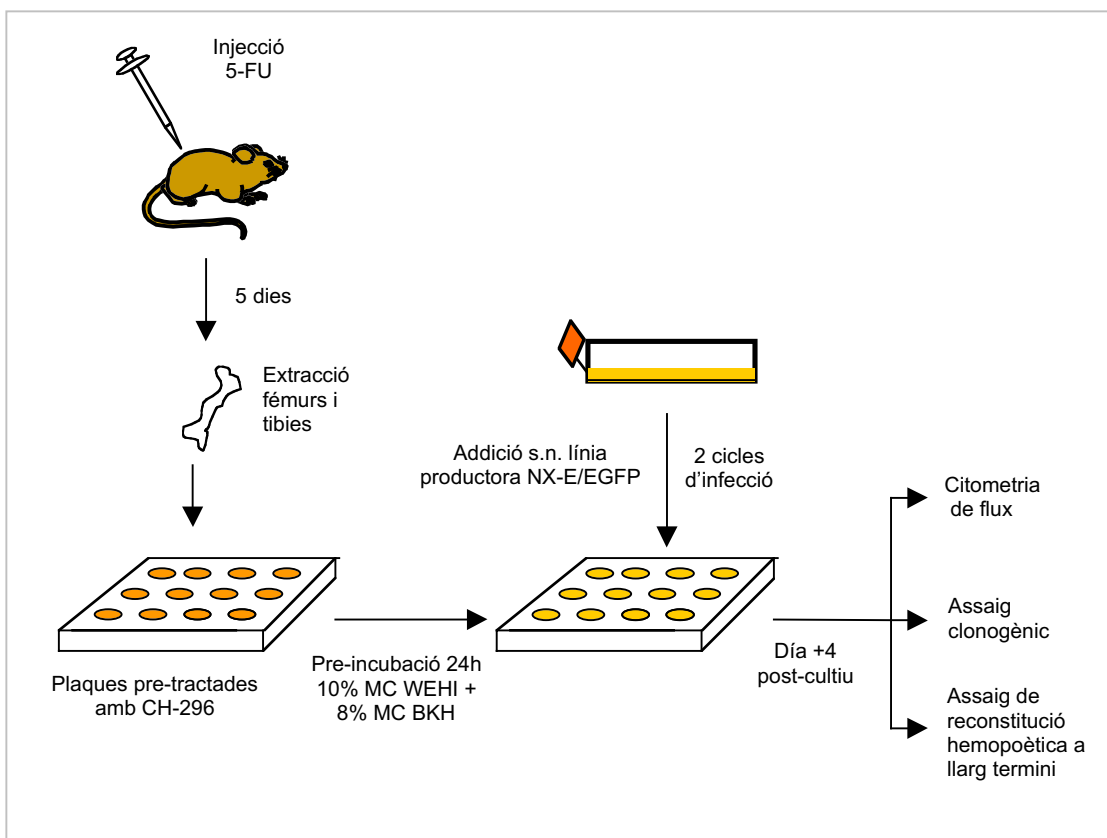


Fig.24. Protocol definitiu de transducció de cèl·lules del MO murines.

3. Establiment de la corba de supervivència dels ratolins C57BL/6J post-ICT

Per tal de poder iniciar l'estudi experimental amb la soca de ratolins C57BL/6J calia, en primer lloc, establir la radiosensibilitat de la soca i determinar-ne la dosi d'irradiació letal 95/30 ($DL_{95/30}$).

Per això, es varen irradiar diferents grups de 10 ratolins a les següents dosis corporals totals: 1000, 975, 950, 925, 900, 850 i 760 cGy.

Diàriament es va controlar el nombre de ratolins que sobreviuen fins els 30 dies post-irradiació. Segons els resultats obtinguts, detallats a la figura 25, el perfil de la corba de supervivència de la soca C57BL/6J obtingut per les 5 dosis d'irradiació més altes (de 900 a 1000 cGy) és molt similar. Quinze dies post-ICT, amb totes cinc dosis, es va obtenir un percentatge de supervivència de 0. A més, en totes cinc corbes de supervivència, els ratolins irradiats varen morir a partir del dia +7 post-irradiació, és a dir, la causa de la mort fou hematològica i no, intestinal, ja que en aquest cas els ratolins haurien mort abans del dia +5 post-irradiació. També es descartà la mort per causes neurològiques, perquè els ratolins s'haurien mort poques hores després de la irradiació.

En conclusió, s'escollí com a $DL_{95/30}$ de la soca C57BL/6J, la dosi d'ICT més baixa de les dosis compreses entre 900 i 1000, per tant, 900 cGy.

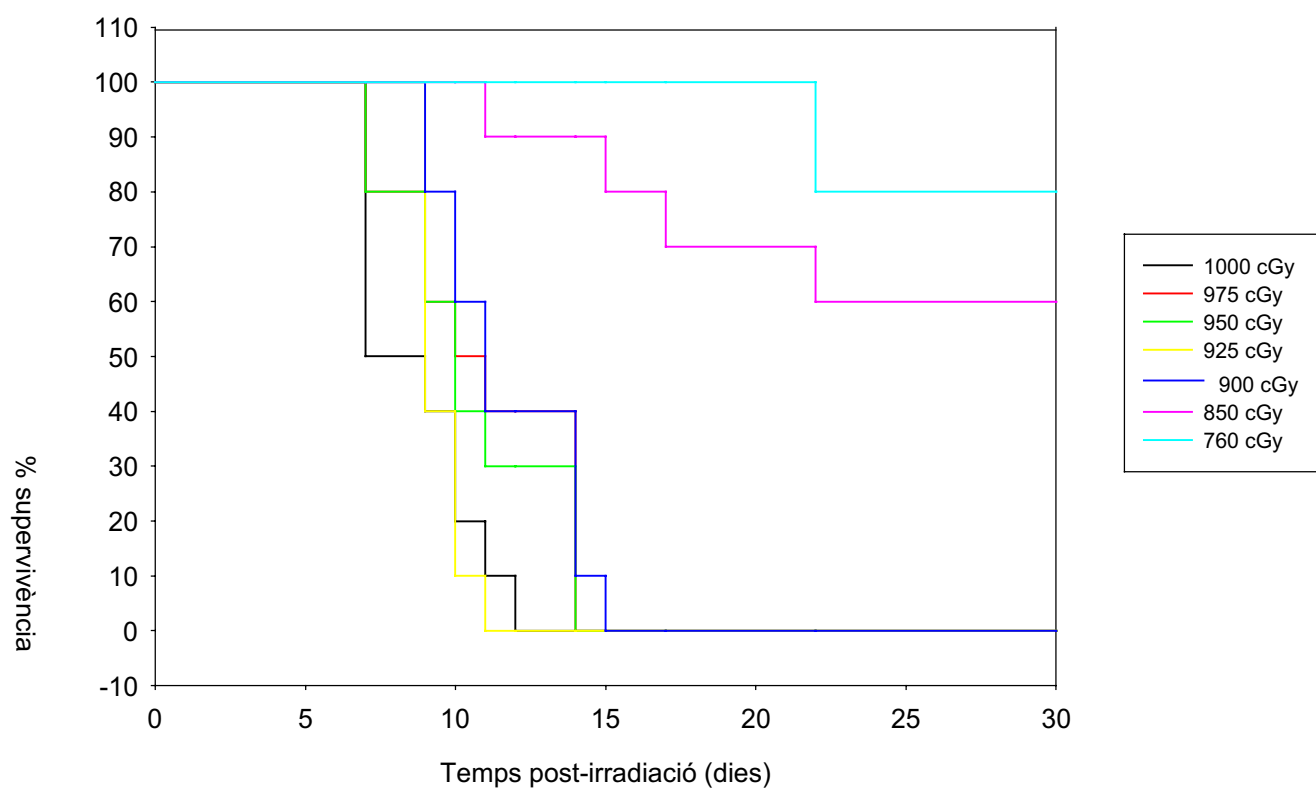


Fig.25. Corbes de supervivència obtingudes després de la irradiació de diferents grups (n=10) de ratolins C57BL/6J irradiats a diferents dosis d'ICT.

4. Evolució de l'expressió d'EGFP *in vitro* i *in vivo*

4.1. Expressió d'EGFP a cèl·lules de MO abans del trasplantament (*in vitro*)

Prèviament al trasplantament dels diferents grups de ratolins irradiats, es va determinar l'eficiència de transducció en cèl·lules totals i progenitors hemopoètics tipus CFC en el dia +5 del cultiu. En tots els casos el protocol de transducció fou el mateix, tal i com es descriu a l'apartat 2.3 dels Resultats.

Es varen realitzar un total de 18 experiments de transducció de cèl·lules del MO, el resultat dels quals s'observa a la Figura 26. L'eficiència de transducció en cèl·lules totals ($24,2 \pm 8,9\%$) era significativament inferior ($p = 0,007$) a l'obtingut en els progenitors tipus CFC ($55,1 \pm 16,9\%$).

Com a control negatiu es van utilitzar cèl·lules del MO cultivades en les mateixes condicions, però que no van ser exposades als retrovirus. Aquestes cèl·lules varen ser utilitzades com a control negatiu de transducció tant en les anàlisis citomètriques com clonogèniques i varen ser igualment injectades en els receptors irradiats. De manera general, la fluorescència inespecífica generada per aquestes cèl·lules no va superar l'1%.

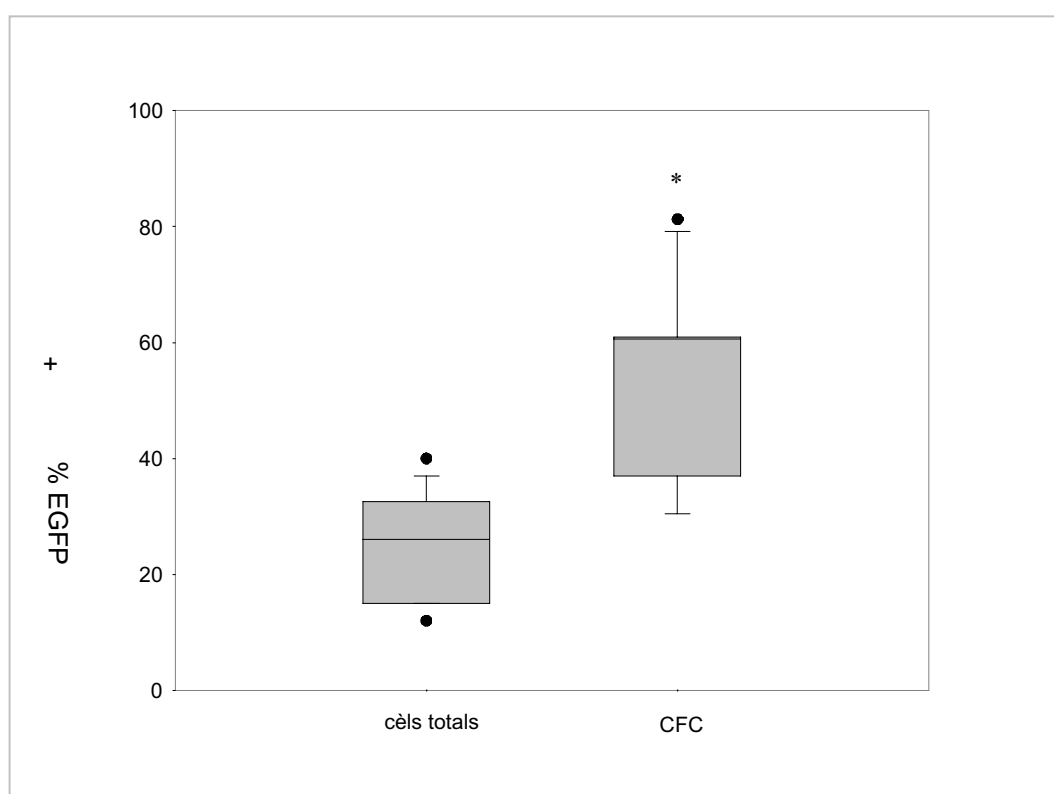


Fig.26. Percentatge de cèl·lules de MO total EGFP⁺ i progenitors EGFP⁺. La línia horitzontal del "box plot" indica la mediana de la població (n = 18). El "box" indica el 50% de la població i entre les patilles (*whiskers*) mínima i màxima s'inclou el 95% de la població. Els cercles indiquen els valors extrems. (* = diferència amb significació estadística, p<0.05).

4.2. Expressió d'EGFP a SP, melsa i MO dels ratolins trasplantats (*in vivo*)

Quan es determinava per citometria de flux l'expressió d'EGFP a SP, melsa i MO dels ratolins trasplantats, s'analitzava el percentatge de cèl·lules EGFP⁺ del total de CMN que expressaven l'antigen CD45 del donant (CD45.1), tal i com s'explica a l'apartat 10 de Material i Mètodes.

Als grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules, quan s'analitzà l'expressió d'EGFP a les CMN de SP dels ratolins 6 setmanes després del trasplantament, s'observà expressió d'EGFP a tots el ratolins que presentaven empelt (>3 Gy) (Fig.27).

No es varen observar diferències significatives entre els diferents grups d'irradiació en el percentatge de cèl·lules EGFP⁺ a la SP dels ratolins empeltats, 6 setmanes després del trasplantament (Taula 7).

% cèl·lules EGFP aSP (40 dies)							
ICT (Gy)							
ratolí	9	8	7	6	5	4	3
1	63	80.3	64	61	76.1	46.3	69.4
2	90.5	71.4	63.6	54.9	92.6	88.7	51.9
3	21.5	72.5	70.2	53.9	94.7		66.8
4	38.5	69.4	74.6	83.2			62.7
5		78.1	80.5				
mitjana	53.4	74.3	70.5	63.3	87.8	67.5	62.7
DE	30.1	4.6	7.2	13.7	10.2	29.9	9.4

Taula 7. Percentatge de cèl·lules EGFP⁺ presents a la SP dels ratolins inoculats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes, 40 dies post-trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí i la mitjana i desviació estàndard (DE) de cada grup d'ICT.

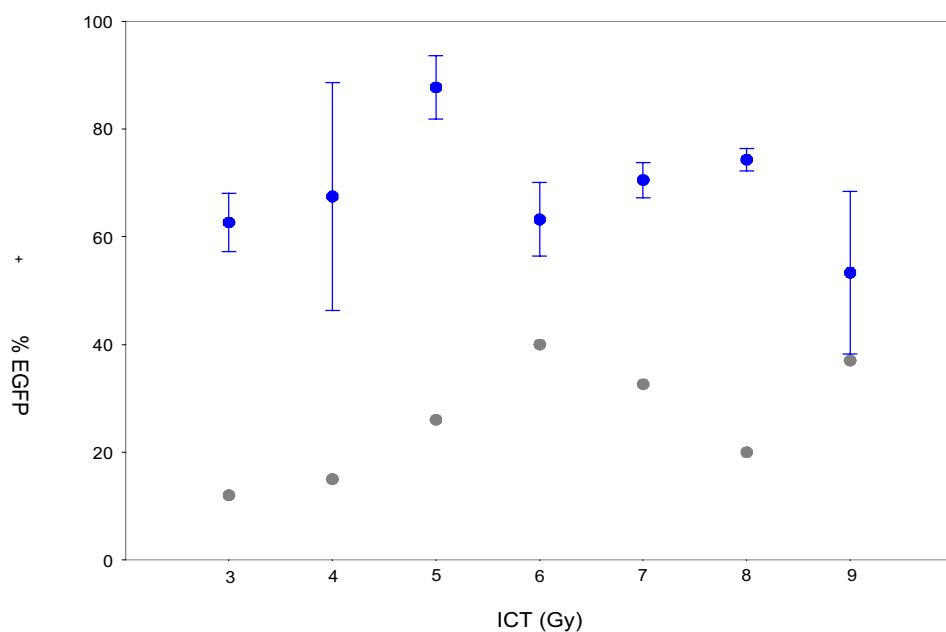


Fig.27. Percentatge de cèl·lules del MO EGFP⁺ (cercles grisos) dels diferents experiments individuals de transducció abans del trasplantament dels diferents grups de ratolins i, mitjana i error estàndard del percentatge de cèl·lules EGFP⁺ (cercles blaus) a SP dels ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes, 40 dies post-trasplantament.

Als grups de ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes, quan s'analitzà el percentatge de cèl·lules mononuclears EGFP⁺ a SP, 40 dies post-trasplantament, s'observà un percentatge equivalent de cèl·lules EGFP⁺ als ratolins irradiats amb 4 ($69,2 \pm 13,4\%$) i 6 ($76,4 \pm 5,8\%$) Gy.

No obstant, dels 3 ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes que no foren condicionats, només un ratolí presentà cèl·lules EGFP⁺ (53%) a SP 40 dies post-trasplantament. En el cas dels 2 ratolins irradiats amb 2 Gy que es trasplantaren amb 5×10^6 cèl·lules manipulades, només un ratolí presentà cèl·lules EGFP⁺ (34,31%) a SP 40 dies post-trasplantament (Taula 8).

% cèl·lules EGFP aSP (40 dies)				
ICT (Gy)				
ratolí	6	4	2	0
1	75,7	57,1	34,3	53
2	82,6	67	0	0
3	71	83,6		0
mitjana	76,4	69,2		
DE	5,8	13,4		

Taula 8. Percentatge de cèl·lules EGFP⁺ presents a la SP dels ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes, 40 dies post-trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí i la mitjana i DE de cada grup d'ICT.

Vint-i-dues setmanes post-trasplantament se sacrificaven els ratolins i s'analitzava, entre altres aspectes, el percentatge de cèl·lules EGFP⁺ a SP, melsa i MO dels ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ i 5×10^6 cèl·lules (Taulas 9 i 10).

En el cas dels ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules no hi havia diferències significatives en el percentatge de cèl·lules EGFP⁺ en els diferents grups de ratolins irradiats en cap dels tres teixits estudiats: SP, melsa i MO (Taula 9).

A més, tampoc hi havia diferències en el percentatge de cèl·lules que expressaven el marcador a la SP, melsa i MO per cadascun dels diferents grups d'irradiació (Fig.28.a).

% cèl·lules EGFP a SP							
ICT (Gy)							
ratolí	9	8	7	6	5	4	3
1	37	49.8	49.7	13.1	69.1	30.3	71
2	80.4	52.5	73.2	16.2	60.7	75.6	86
3	14.7	81.3	73.2	84.6	59		91
4	11.4	58.2	73	71.5			95
5		71.4	n.a.				
mitjana	35.9	62.6	67.3	46.4	62.9	53	85.8
DE	31.8	13.3	11.7	37	5.4	32	10.5
% cèl·lules EGFP a melsa							
ICT (Gy)							
ratolí	9	8	7	6	5	4	3
1	42.4	41.8	47.4	17.6	66.5	22.9	72
2	94	48.7	70.7	21.8	54.2	72.3	93
3	18.5	76.3	76	76.8	58.6		92
4	12.7	56.3	48.7	65.1			96
5		72.9	n.a.				
mitjana	41.9	59.2	60.7	45.3	59.7	47.6	88.3
DE	37.1	15	14.8	30	6.2	34.9	11
% cèl·lules EGFP+ a MO							
ICT (Gy)							
ratolí	9	8	7	6	5	4	3
1	7.3	50.7	69.2	12	70.4	50	64
2	93.8	50.3	94.4	24	51.8	60.5	69
3	13.6	71.8	72.4	78.6	61.1		89
4	2.9	35	91.8	30.6			92
5		66.6	n.a.				
mitjana	29.4	54.9	81.9	36.3	61.1	55.3	78.5
DE	43.2	14.6	13	29.2	9.3	7.4	14.1

Taula 9. Percentatge de cèl·lules EGFP⁺ presents a la SP, melsa i MO dels ratolins inoculats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes, 22 setmanes post-trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí, la mitjana i DE de cada grup d'ICT (n.a., no avaluat).

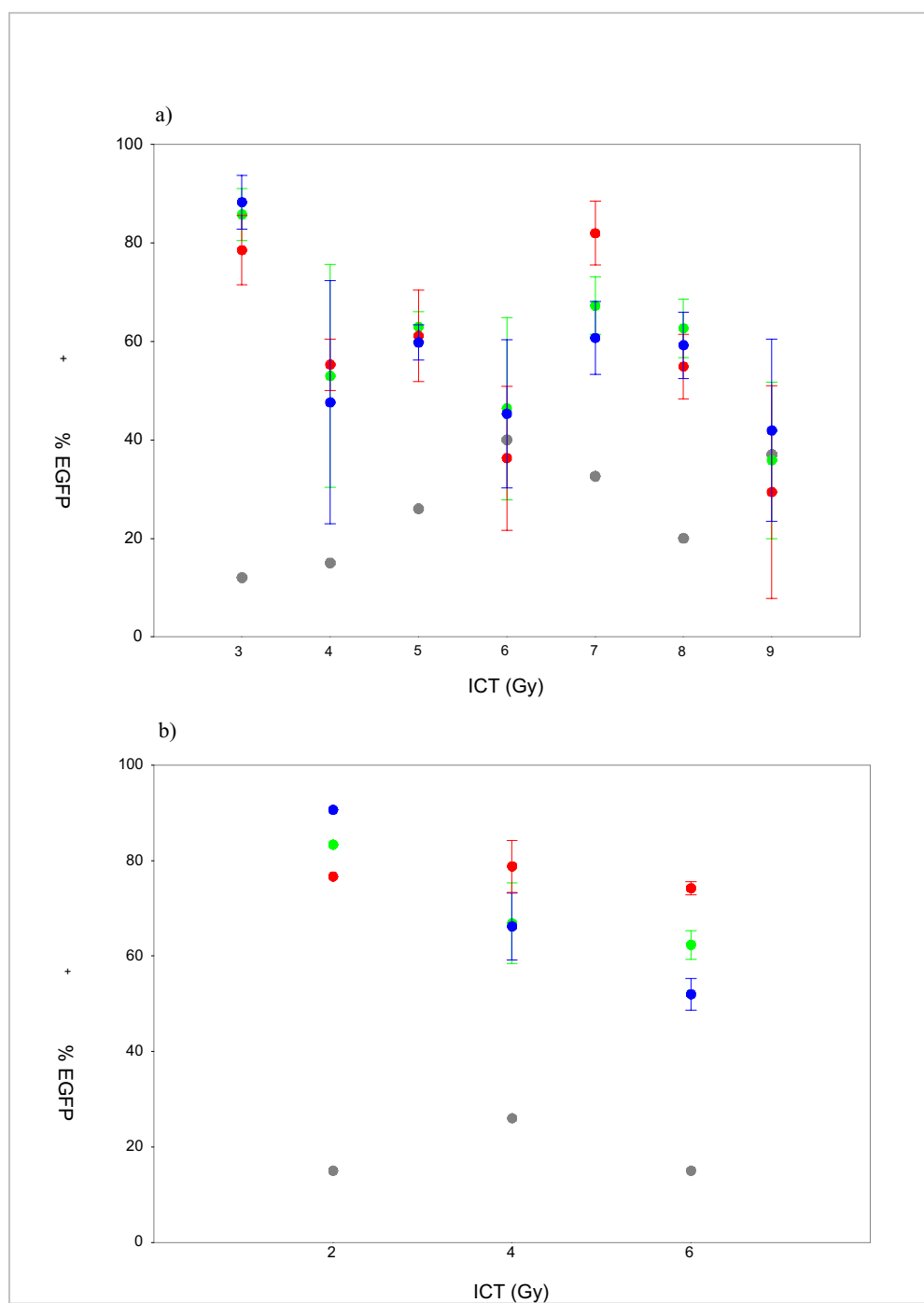


Fig.28. Percentatge de cèl·lules del MO total EGFP⁺ *in vitro* (cercles grisos) i percentatge de cèl·lules nucleades EGFP⁺ (mitjana i error estàndard) a SP (cercles verds), melsa (cercles blaus) i MO (cercles vermells) dels ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ (a) i 5×10^6 (b) cèl·lules transduïdes, 22 setmanes post-trasplantament.

El ratolí no condicionat trasplantat amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes que presentava un 53% de cèl·lules EGFP⁺ a SP als 40 dies del trasplantament, no se'n varen detectar 22 setmanes post-trasplantament a cap dels tres teixits hemopoètics perquè a llarg termini es va perdre l'empelt.

% cèl·lules EGFP a SP			
ICT (Gy)			
ratolí	6	4	2
1	58,2	50,3	83,3
2	68,2	72	0
3	60,6	78,2	
mitjana	62,3	66,8	
DE	5,2	14,7	
% cèl·lules EGFP a melsa			
ICT (Gy)			
ratolí	6	4	2
1	48,4	52,3	90,7
2	58,6	74	0
3	49	72,3	
mitjana	52	66,2	
DE	5,7	12,1	
% cèl·lules EGFP a MO			
ICT (Gy)			
ratolí	6	4	2
1	72,2	68	76,7
2	76,9	83,2	0
3	73,5	85,2	
mitjana	74,2	78,8	
DE	2,4	9,4	

Taula 10. Percentatge de cèl·lules EGFP⁺ del donant presents a la SP, melsa i MO dels ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes, 22 setmanes post-trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí, la mitjana i DE de cada grup d'ICT.

Els resultats obtinguts a llarg termini en els grups de ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes eren equivalents als observats en els diferents grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes (Taula 10, Fig.28.b). És a dir, el percentatge de cèl·lules EGFP⁺ a SP, melsa i MO dels ratolins irradiats amb 4 Gy era similar al del grup de ratolins irradiats amb 6 Gy.

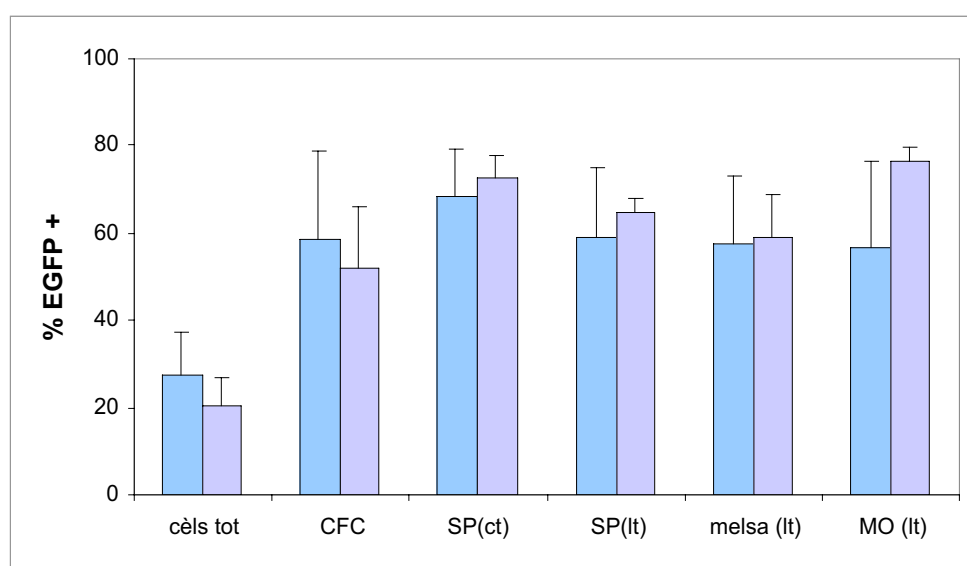


Fig.29. Gràfic resum de la mitjana i la DE del percentatge de cèl·lules i progenitors EGFP⁺ de MO *in vitro* (cèls totals i CFC). Igualment, es compara la mitjana del percentatge de cèl·lules EGFP⁺ dels diferents grups de ratolins trasplantats amb les dues dosis cel·lulars, presents a SP 40 dies (SPct) i 22 setmanes post-trasplantament (SPlt), a melsa i MO –resultats *in vivo*-. Les barres en blau indiquen els resultats referents als ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes i en lila, els resultats referents als ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes.

5. Estudi de la influència de la manipulació *ex vivo*, la dosi cel·lular i la irradiació, en l'empelt de cèl·lules hemopoètiques del MO murines transduïdes amb retrovirus

5.1. Efectes de la transducció retrovívica en la repoblació de ratolins, no irradiats i irradiats amb diferents dosis d'ICT, trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules del MO

Per poder estudiar els efectes de la transducció retrovívica en la repoblació de ratolins, en primer lloc, es varen irradiar els receptors amb diferents dosis d'ICT fins arribar a la dosi letal de 9 Gy, prèviament al trasplantament dels ratolins amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes. Paral·lelament es va voler estudiar la capacitat d'empelt d'aquestes cèl·lules transduïdes en ratolins no condicionats i per això s'incloué un grup de ratolins que no foren irradiats que també es trasplantaren amb el mateix nombre de cèl·lules.

Per altra banda, es trasplantaren el mateix nombre de grups experimentals amb cèl·lules fresques per poder comparar els efectes de la transducció *versus* la no manipulació en la repoblació de ratolins no irradiats i irradiats a diferents dosis d'ICT.

A cada grup d'irradiació es va analitzar el percentatge de cèl·lules del donant a SP dels receptors, 40 dies post-trasplantament (empelt a curt termini). A les 22 setmanes post-trasplantament s'analitzà l'empelt a SP, melsa i MO (empelt a llarg termini).

En tots els casos, es va considerar un resultat d'empelt positiu quan el percentatge de cèl·lules del donant era superior o igual a 0,1%. En total s'injectaren els següents ratolins per cada grup experimental:

Tractament	ICT (Gy)	MO transduït	MO no transduït
no condicionament	0	5	5
ICT	1	5	5
	2	5	4
	3	4	5
	4	2	5
	5	3	5
	6	4	5
	7	5	5
	8	5	5
	9	4	2

Taula 10. Número de ratolins avaluables per grup d'irradiació (ICT) i segons si es trasplantaren amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes o no transduïdes.

I. Empelt a curt termini

En el grup de ratolins no condicionats trasplantats amb cèl·lules transduïdes i amb cèl·lules no transduïdes (fresques), no es varen detectar cèl·lules del donant a la SP de cap dels ratolins receptors analitzats, 40 dies post-trasplantament.

El nivell d'empelt a curt termini als ratolins condicionats trasplantats amb cèl·lules fresques va ser sempre superior al detectat als receptors de cèl·lules transduïdes (Taula 11). No obstant, les diferències només van ser estadísticament significatives en els grups de ratolins irradiats amb 3, 4, 5, 6 i 8 Gy (Fig.30).

MO fresc									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	78	60	54.4	20.3	27.3	17	14.8	0.4	0.0
2	75	76	56.6	32	20.9	15	11.8	0.6	0.2
3		62.9	61.6	38.8	32.1	13	12.3	1.4	0.8
4		73.8	58.6	23.6	24.8	17.6	11.8	0.3	0.3
5		65.7	47.2	35.4	16	11.9	12.2		0.3
mitjana	76.5	67.7	55.7	30.0	24.2	14.9	12.6	0.7	0.3
DE	2.1	6.9	5.4	7.8	6.1	2.5	1.3	0.1	0.2

MO transduït									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	77,6	91,2	53,9	12,3	1,2	4,0	11,4	0,7	0,3
2	57,6	82,0	36,9	12,3	0,6	6,0	2,8	0,2	0,9
3	81,5	73,3	45,2	4,8	7,1		2,1	0,4	0,2
4	85,2	81,4	55,8	29,9			3,3	0,3	0,0
5		83,2	38,2					1,2	0,1
mitjana	75,5	82,2	46,0	14,8	3,0	5	4,9	0,6	0,3
DE	12,3	6,4	8,7	10,7	4,2	1,4	5,7	0,4	0,2

Taula 11. Percentatge de cèl·lules del donant a SP dels receptors irradiats i trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques o transduïdes, 40 dies post- trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí i la mitjana i la DE de cada grup d'ICT.

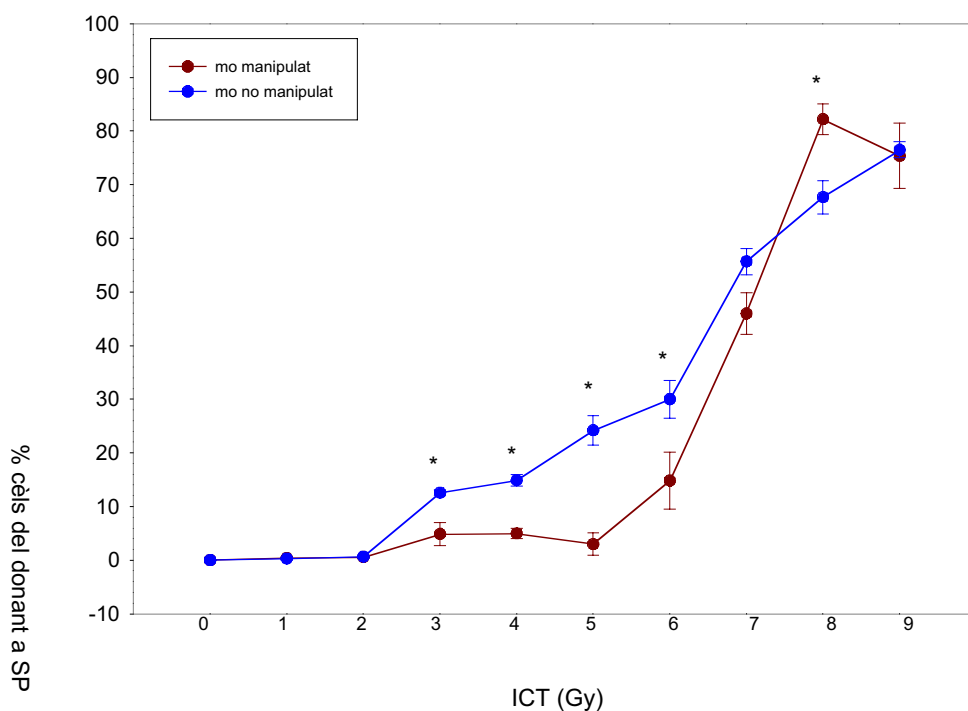


Fig.30. Percentatge de cèl·lules del donant (mitjana i error estàndard) a SP dels ratolins receptors trasplantats amb MO transduït (manipulat) i MO fresc (no manipulats), 40 dies post-trasplantament. (* = diferència amb significació estadística, $p < 0.05$).

II. Empelt a llarg termini

Tampoc s'observà empelt a llarg termini (SP, melsa i MO) en els ratolins no condicionats, tant si es varen trasplantar amb cèl·lules transduïdes com fresques.

Els nivells d'empelt a SP i melsa 22 setmanes post-trasplantament foren similars als observats a curt termini. En tots els casos, l'empelt hemopoètic resultà superior als ratolins trasplantats amb cèl·lules fresques (Taula 12a) encara que només s'apreciaren diferències estadísticament significatives en els grups de ratolins condicionats amb 3, 4, 5 i 6 Gy (Fig.31). El nivell d'empelt al MO dels grups de ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes era més baix que a la SP i a la melsa i, en tots els casos, l'empelt hemopoètic al MO dels ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes resultà inferior als ratolins trasplantats amb cèl·lules fresques (Taula 12b). No obstant, les diferències significatives s'observaren en els grups irradiats amb 6, 7 i 8 Gy (Fig.31).

% cèl·lules del donant a SP									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	90.1	61.3	37.0	42.0	27.8	26.0	5.9	0.1	0.0
2	87.9	69.7	56.4	42.4	32.4	16.3	12.8	1.0	0.7
3		74.8	60.3	29.7	42.5	42.4	14.5	22.0	4.5
4		88.7	69.7	16.2	26.7	27.1	24.5	0.2	0.0
5		89.5	48.6	35.5	18.2	11.2	16.2		0.3
mitjana	89	75.4	42.8	38.7	23.0	18.6	11.0	5.8	0.1
DE	1.5	12.2	12.3	10.8	8.9	12.0	6.7	10.8	1.9
% cèl·lules del donant a melsa									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	89.0	60.5	33.3	30.4	28.6	24.2	6.7	0.3	0.0
2	85.3	70.8	55.3	33.9	30.9	15.7	11.4	0.9	0.9
3		67.2	60.5	22.8	36.3	42.7	12.5	17.8	3.6
4		88.6	59.5	15.4	24.5	30.4	19.6	0.5	0.4
5		60.7	50.5	24.8	16.7	10.0	14.9		0.4
mitjana	87.1	69.6	51.8	25.5	27.4	24.6	13.0	4.9	1.0
DE	2.6	11.5	11.1	7.1	7.4	12.8	4.7	8.6	1.4
% cèl·lules del donant a MO									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	82.8	32.0	21.1	87.7	11.0	20.7	0.8	0.1	0.0
2	80.7	46.6	53.0	72.6	15.5	4.9	13.4	0.1	0.2
3		77.8	43.2	23.1	34.3	13.8	6.6	43.1	7.9
4		89.0	49.0	14.1	11.7	14.6	1.6	0.1	0.1
5		84.9	39.1	35.8	32.8	5.0	7.3		0.1
mitjana	81.7	66.1	41.1	46.7	21.1	11.8	5.9	10.8	1.7
DE	1.5	25.3	25.3	32.0	11.5	6.8	5.1	21.5	3.5

Taula 12a. Percentatge de cèl·lules del donant a SP, melsa i MO dels receptors irradiats i trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques, 22 setmanes post-trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí i la mitjana i DE de cada grup d'ICT.

% cèl·lules del donant a SP									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	51,6	92,1	36,2	10,2	10,4	8,9	0,4	0,9	0,0
2	64,5	64,2	49,6	16,9	15,0	2,4	0,4	0,1	0,0
3	71,2	53,1	28,2	10,7	13,7		0,7	0,3	0,1
4	93,0	56,3	25,7	18,3			4,8	0,2	
5		62,6	n.a.					3,5	
mitjana	70,1	65,7	42,2	14,0	13,0	5,6	1,6	1,0	0,0
DE	17,3	15,5	18,8	4,2	2,4	4,6	2,2	0,4	0,0
% cèl·lules del donant a melsa									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	56,2	89,8	36,7	6,2	8,8	8,7	0,3	0,9	0,1
2	64,2	80,0	54,7	16,3	9,4	2,7	1,0	0,1	0,1
3	68,5	58,9	33,4	10,0	11,3		0,6	0,2	0,1
4	90,1	64,1	38,2	15,4			4,6	0,1	0,1
5		74,9	n.a.					3,9	0,1
mitjana	69,8	73,5	48,6	12,0	9,8	5,7	1,6	1,0	0,1
DE	14,5	12,4	19,4	4,7	1,3	4,2	2,0	1,6	0,0
% cèl·lules del donant a MO									
ICT (Gy)									
ratolí	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	47,2	57,9	17,3	1,2	1,5	3,5	0,1	0,1	0,1
2	9,0	8,7	23,6	2,8	24,3	2,4	0,1	0,0	0,1
3	16,5	10,1	4,5	1,8	0,0		0,1	0,1	0,0
4	95,0	11,9	19,7	4,3	1,2		0,9	0,1	0,0
5		14,8	n.a.					0,6	0,1
mitjana	41,9	20,7	15,8	2,5	9,0	3	0,3	0,2	0,0
DE	39,1	20,9	7,3	1,3	13,2	0,8	0,4	0,3	0,0

Taula 12b. Percentatge de cèl·lules del donant a SP, melsa i MO dels receptors irradiats i trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes, 22 setmanes post-trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí i la mitjana i DE de cada grup d'ICT (n.a., no avaluat).

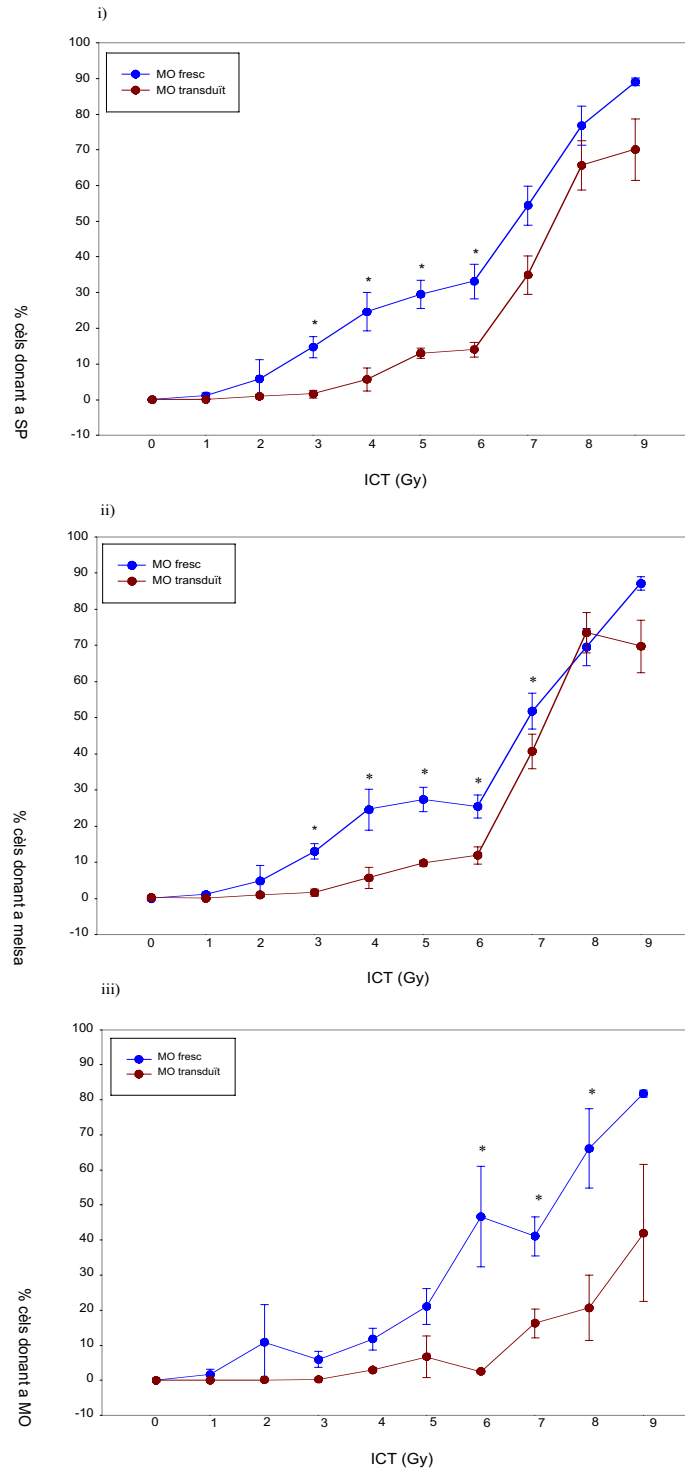


Fig.31. Percentatge de cèl·lules del donant (mitjana i DE) a SP (i), melsa (ii) i MO (iii) en els diferents grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules de MO fresc i $0,5 \times 10^6$ cèl·lules de MO transduït, 22 setmanes pòst-trasplantament. (* = diferència amb significació estadística, $p < 0.05$).

5.1.1. Efectes de la transducció retrovívica en la repoblació hemopoètica de ratolins condicionats amb una dosi de 4 Gy

Es va incloure un grup de 5 ratolins irradiats amb 4 Gy d'ICT, trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules de MO cultivades durant 4 dies i sotmeses al mateix protocol de transducció, però exposades durant els dos cicles d'infecció al sobrenadant de la línia empaquetadora NX-E (*mock transduction*). L'objectiu d'aquest experiment era discriminar l'efecte dels vectors retrovírics sobre les cèl·lules de MO, en la repoblació de ratolins condicionats.

A la Figura 32, s'observa el percentatge de cèl·lules del donant a SP dels receptors en els grups de ratolins irradiats amb 4Gy que foren trasplantats amb cèl·lules no manipulades ($14.4 \pm 2.5\%$), transduïdes amb el sobrenadant de la línia productora NX-E/EGFP ($5.0 \pm 1.4\%$) i transduïdes amb el sobrenadant de la línia empaquetadora NX-E ($9.6 \pm 7.0\%$). El nivell d'empelt a curt termini en el grup de ratolins trasplantats amb cèl·lules no manipulades resultà superior al de la resta de grups. No obstant, només s'observaren diferències estadísticament significatives entre els ratolins trasplantats amb MO fresc o no manipulat respecte els trasplantats amb cèl·lules transduïdes amb la línia NX-E/EGFP ($p = 0.004$).

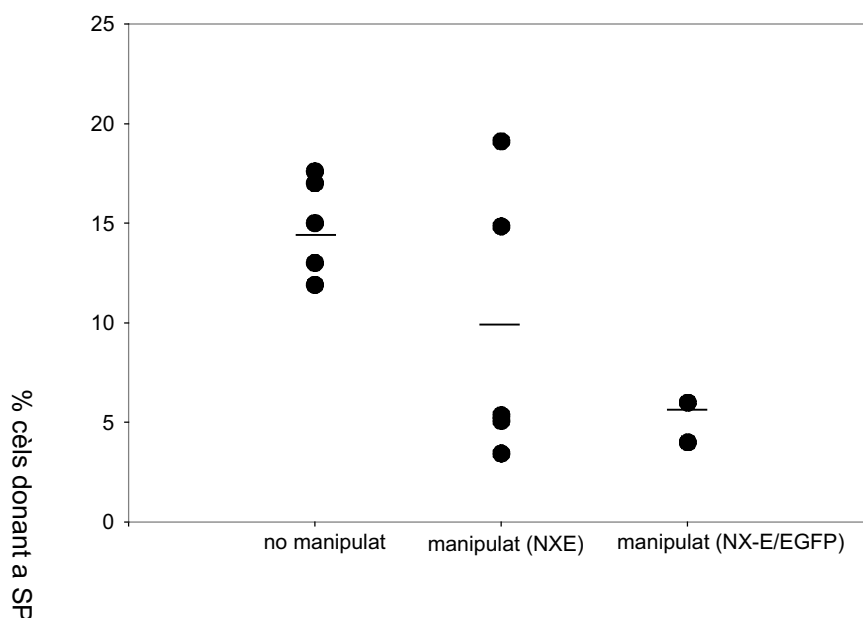


Fig.32. Percentatge de cèl·lules del donant a SP dels receptors irradiats amb 4 Gy d'ICT trasplantats amb cèl·lules no manipulades, transduïdes amb el s.n. de la línia NX-E i amb el s.n. de la línia NX-E/EGFP, 40 dies post-trasplantament. Cada cercle representa el resultat d'un ratolí. La línia horitzontal representa la mitjana de les dades.

Tal i com s'observa a la Figura 33, vint-i-dues setmanes post-trasplantament es va analitzar el percentatge de cèl·lules del donant a SP, melsa i MO de cada grup de ratolins.

Els resultats d'empelt a llarg termini a SP foren equivalents als observats a curt termini. És a dir, el nivell de quimerisme al grup de ratolins trasplantats amb cèl·lules fresques (24.6 ± 11.9 %) resultà significativament superior ($p = 0.037$) a l'obtingut al grup de ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes amb la línia NX-E/EGFP ($5.6 \pm 4.6\%$). No obstant, no s'apreciaren diferències estadísticament significatives en el nivell d'empelt a melsa i MO entre els tres grups de ratolins (Taula 13).

GRUP	SP (ct)		SP (lt)		melsa (lt)		MO (lt)	
	mitjana	DE	mitjana	DE	mitjana	DE	mitjana	DE
mo manipulats	14,4	2,5	24,6	11,9	24,6	12,8	11,8	6,8
NX-E	9,6	7	8,7	6,7	10,9	9	8,7	9,6
NX-E/EGFP	5	1,4	5,6	4,6	5,7	4,2	3	0,8

Taula 13. Percentatge de cèl·lules del donant a curt [$SP_{(ct)}$] i llarg termini [$SP_{(lt)}$, $melsa_{(lt)}$ i $MO_{(lt)}$] als receptors irradiats amb 4 Gy, trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules no manipulades o bé exposades al s.n. de les línies NX-E/EGFP i NX-E. Es representa la mitjana i la DE dels valors observats a cada grup experimental.

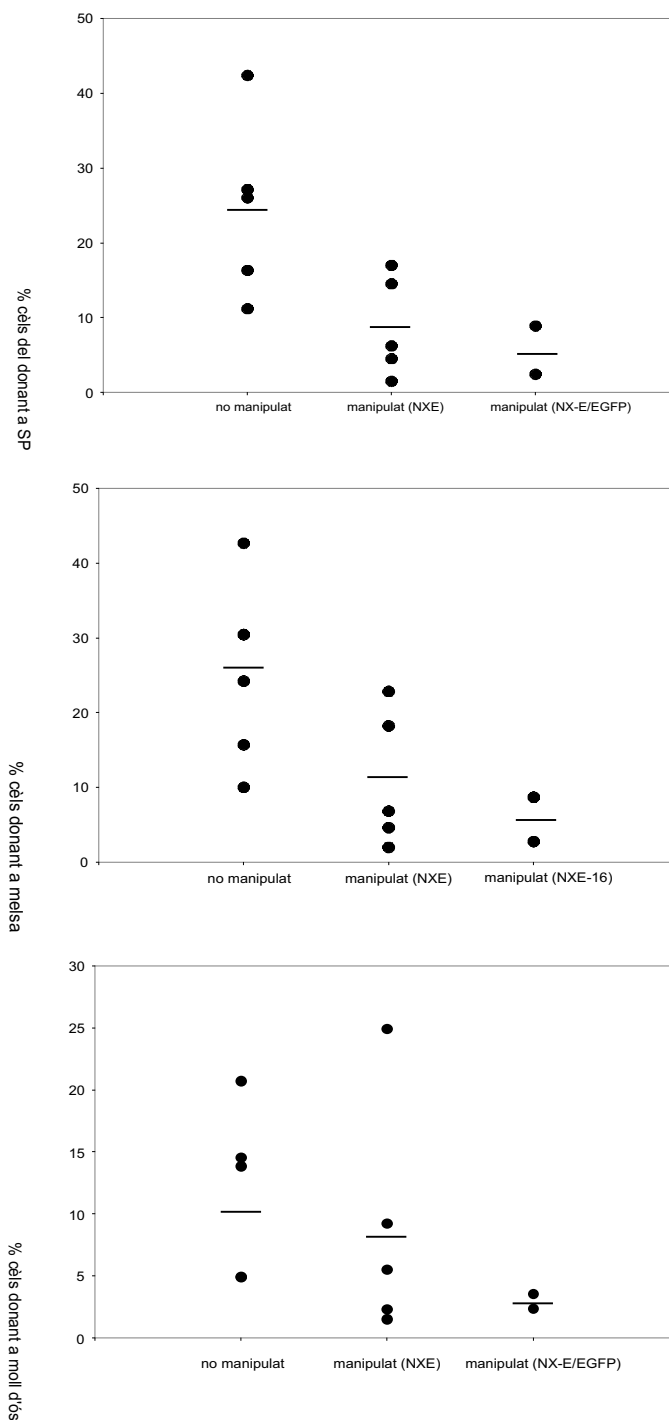


Fig.33. Percentatge de cèl·lules del donant a SP, melsa i MO dels receptors irradiats amb 4 Gy, 22 setmanes post-trasplantament. Cada cercle negre representa el resultat d'un ratolí. La línia horitzontal indica la mitjana de les dades.

5.2. Efectes de la dosi de cèl·lules trasplantades en la repoblació hemopoètica de ratolins irradiats amb dosis subletals d'ICT

Degut al baix percentatge de cèl·lules del donant, tant a curt com a llarg termini, que s'obtenia quan s'analitzaven els ratolins receptors irradiats a baixes dosis d'ICT trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes; es va voler estudiar si el fet d'augmentar el número de cèl·lules transduïdes que s'inoculaven als ratolins augmentaria els resultats d'empelt, tant en els grups de ratolins irradiats a baixes dosis d'ICT com en els ratolins no irradiats.

Basant-nos en estudis similars presents a la literatura, es va augmentar fins a 5×10^6 (10 vegades) el número de cèl·lules transduïdes que es trasplantava per receptor. Així doncs, es varen trasplantar 4 nous grups. Un amb ratolins no condicionats i 3 d'irradiats amb 2, 4 i 6 Gy. S'inocularen 3 ratolins per grup i a cada un s'analitzà l'empelt a curt i a llarg termini.

I. Empelt a curt termini

A la Figura 34, es pot observar el percentatge de cèl·lules del donant a SP 40 dies post-trasplantament en els diferents grups de ratolins inoculats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes i es compara amb ratolins inoculats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules.

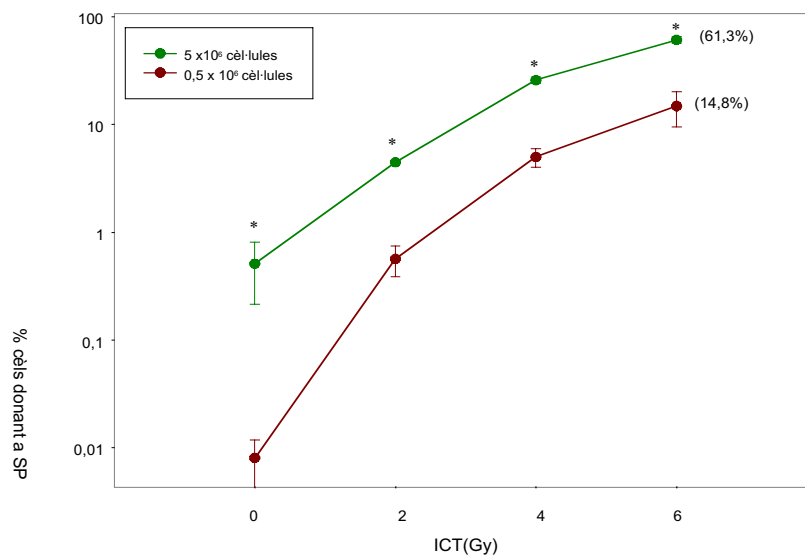


Fig.34. Percentatge de cèl·lules del donant (mitjana i error estàndard) a SP dels ratolins receptors de 5×10^6 i $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes. (* = diferència amb significació estadística, $p < 0.05$).

Quan es va augmentar 10 vegades el número de cèl·lules transduïdes inoculades per ratolí s'aconseguí detectar, a curt termini, cèl·lules del donant ($0.5 \pm 0.5\%$) a la SP dels receptors no condicionats.

Tal i com s'observa a la Taula 14, en tots els grups de ratolins el percentatge d'empelt a curt termini resultà significativament superior en els ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes que en els trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules.

ICT (Gy)	$0,5 \times 10^6$ cèls	5×10^6 cèls	p
0	0	0.5 ± 0.5	<0.05
2	0.6 ± 0.5	4.5	<0.05
4	5 ± 1.4	25.9 ± 3.2	<0.05
6	14.8 ± 10.7	61.3 ± 6.8	<0.05

Taula 14. Percentatge de cèl·lules del donant a SP dels ratolins receptors 40 dies després del trasplantament. Els valors representen la mitjana \pm DE dels ratolins analitzats per cada grup d'ICT.

II. Empelt a llarg termini

Els resultats obtinguts de l'anàlisi de l'empelt a llarg termini a SP, melsa i MO, en els diferents grups de ratolins trasplantats amb 5×10^6 de cèl·lules transduïdes queden detallats a la taula següent:

% cèl·lules donant a SP			
ICT (Gy)			
ratolí	6	4	2
1	46,3	18,9	5,8
2	63,2	29	5,9
3	49,6	23,6	n.a
mitjana	53	23,8	5,9
DE	8,9	5	0,1
% cèl·lules donant a melsa			
ICT (Gy)			
ratolí	6	4	2
1	53,6	27,1	5,8
2	64,9	22,4	5,1
3	60,6	24,1	n.a
mitjana	59,7	24,5	5,4
DE	5,7	2,4	0,5
% cèl·lules donant a MO			
ICT (Gy)			
ratolí	6	4	2
1	35,2	28,2	1,8
2	31,1	19,5	1,5
3	32,4	21,3	n.a
mitjana	32,9	23	1,6
DE	2,1	4,6	0,2

Taula 15. Percentatge de cèl·lules del donant a SP, melsa i MO dels receptors trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes, 22 setmanes post-trasplantament. S'indica el valor individual de cada ratolí i la mitjana i DE de cada grup d'ICT (n.a., no avaluat).

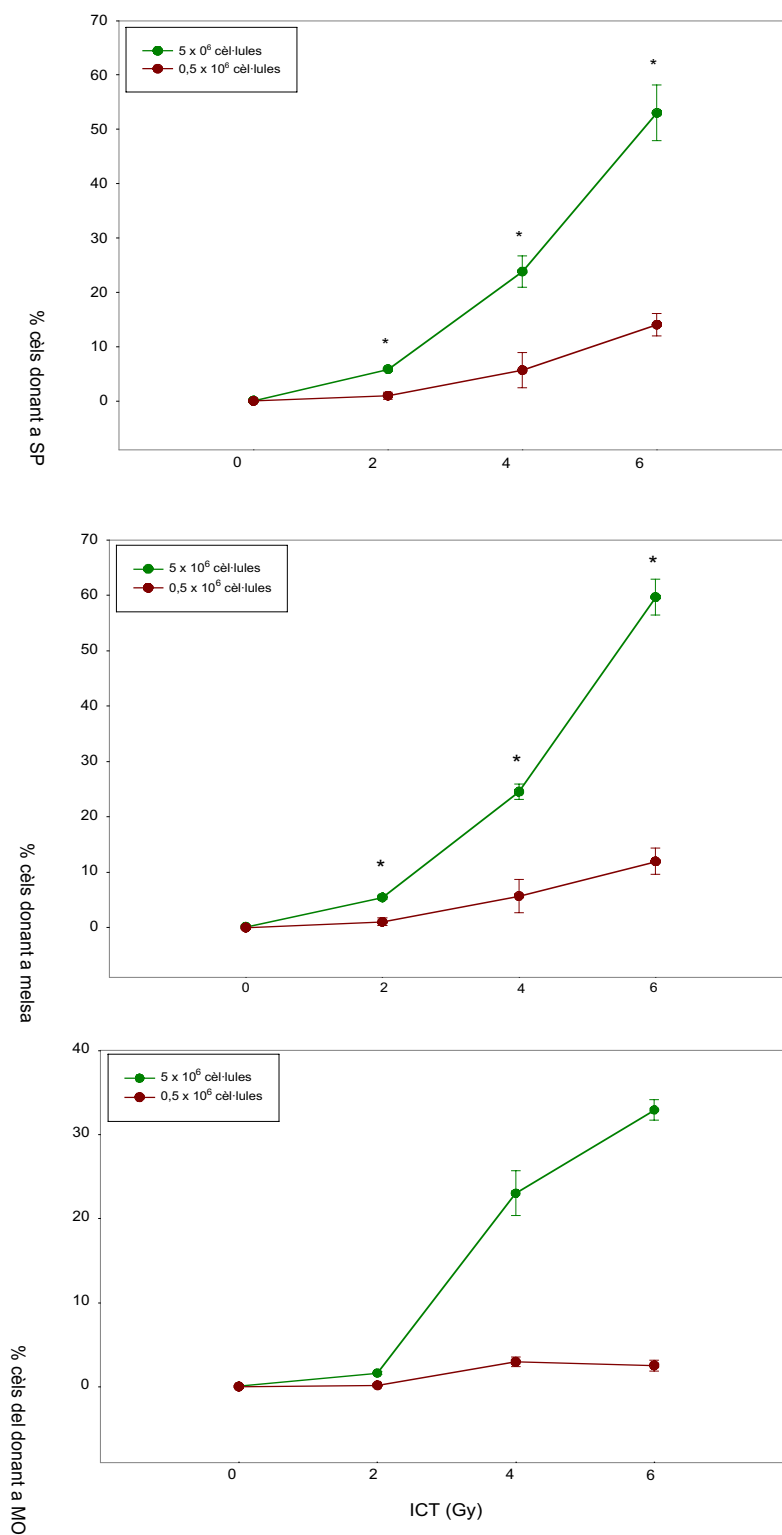


Fig. 35. Empelt a llarg termini a SP, melsa i MO als ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ i 5×10^6 cèl·lules transduïdes (* = diferència amb significació estadística; $p < 0,05$).

Tal i com s'evidencia a la Figura 35 , el percentatge de cèl·lules del donant sempre va ser significativament superior en els grups de ratolins trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes respecte als trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes, independentment del grup d'irradiació i del teixit analitzat (SP, melsa i MO).

No obstant, igual que en el cas dels ratolins no condicionats trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules, els ratolins receptors no condicionats inoculats amb 5×10^6 cèl·lules tampoc presentaren cèl·lules del donant a SP, melsa i MO, 22 setmanes post-trasplantament.

ICT (Gy)	SP			melsa			MO		
	0,5	5	ratio	0,5	5	ratio	0,5	5	ratio
2	1	5.9	5.9	1	5.4	5.4	0.2	1.6	8
4	5.6	23.8	4.3	5.7	24.5	4.3	3	23	7.7
6	14	53	3.8	12	59.7	5	2.5	32.9	13.2

Taula 16. Representació de l'augment mitjà de l'empelt a llarg termini (ratio) en els diferents grups d'ICT i teixits hemopoètics quan els ratolins receptors s'inocularen amb 5×10^6 (5) cèl·lules transduïdes respecte als mateixos grups trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ (0,5) cèl·lules.

5.3. Relació entre la dosi d'ICT (Gy) administrada i l'empelt aconseguit en ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ o 5×10^6 cèl·lules transduïdes o $0,5 \times 10^6$ cèl·lules no transduïdes.

Per avaluar la linealitat (o dosi-dependència) de l'irradiació sobre l'empelt, tant a curt com a llarg termini, de les cèl·lules del donant (transduïdes o no i en ambdues dosis de cèl·lules trasplantades) es va estudiar la relació entre les 2 variables pels tres grups experimentals: els ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes, $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques o 5×10^6 cèl·lules transduïdes. Per estudiar la relació entre l'empelt a llarg termini i la dosi d'ICT administrada es va construir la gràfica amb el total de parelles de dades XY (X=percentatge de cèl·lules del donant; Y=ICT) i es van comparar les rectes de regressió lineal corresponents als tres grups de ratolins. Mitjançant l'equació $y = ax + b$ es varen determinar els coeficients de correlació de Pearson (r) de 0,903, 0,935 i 0,801, dels tres grups, trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ o 5×10^6 de cèl·lules transduïdes, o amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques, respectivament (Fig.36).

A llarg termini (Fig.37), també es varen comparar les tres rectes de regressió lineal corresponents als tres grups de ratolins. Els coeficients de correlació de Pearson (r) obtinguts a SP (Fig.37a) en els grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ o 5×10^6 cèl·lules transduïdes, o amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques foren de 0,929, 0,896 i 0,810, respectivament. A la melsa (Fig.37a) s'obtingueren uns valors de r de 0,956, 0,984 i 0,837, en els grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ o 5×10^6 cèl·lules transduïdes, o amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques, respectivament i a MO (Fig.37b) uns valors de r de 0,903, 0,896 i 0,903, en els grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ o 5×10^6 cèl·lules transduïdes, o amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques, respectivament. El trasplantament de 5×10^6 cèl·lules transduïdes va resultar en un increment de l'empelt a llarg termini a MO de 10 vegades respecte el trasplantament de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes.

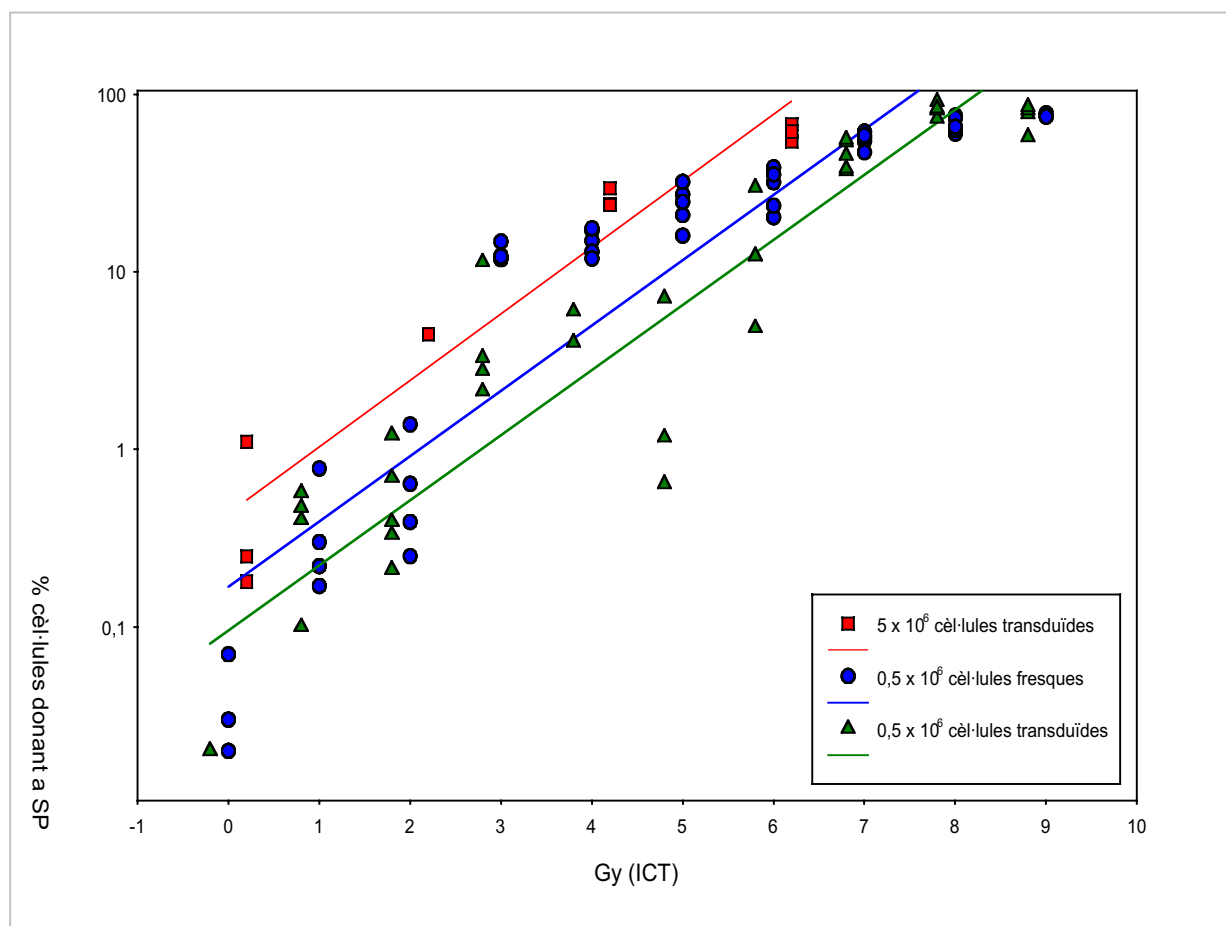


Fig.36. Relació entre la dosi d'ICT (Gy) i el nivell d'empelt (escala log) observada a SP dels grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes (triangles), 5×10^6 cèl·lules transduïdes (quadrats) o amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules no transduïdes (cercles), 40 dies post-trasplantament. Les diferències entre els tres grups eren estadísticament significatives ($p < 0,05$).

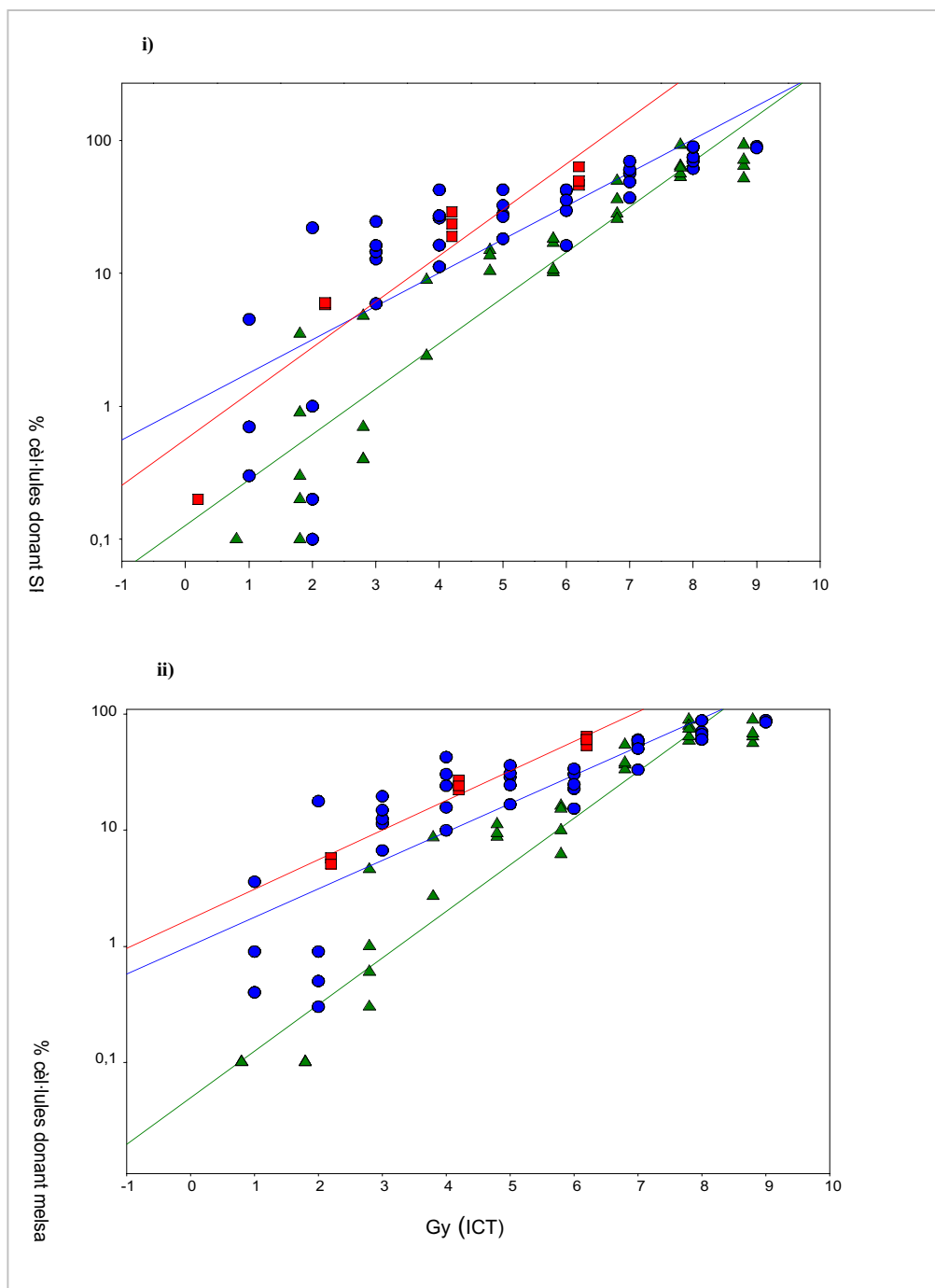


Fig.37a. Relació entre la dosi d'ICT (Gy) i el nivell d'empelt (escala log) observada a SP (i), melsa (ii) dels grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes (triangles), 5×10^6 cèl·lules transduïdes (quadrats) o amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules no transduïdes (cercles), 22 setmanes post-trasplantament. En tots dos teixits hemopoètics (SP, melsa), les diferències entre els tres grups eren estadísticament significatives ($p < 0,05$).

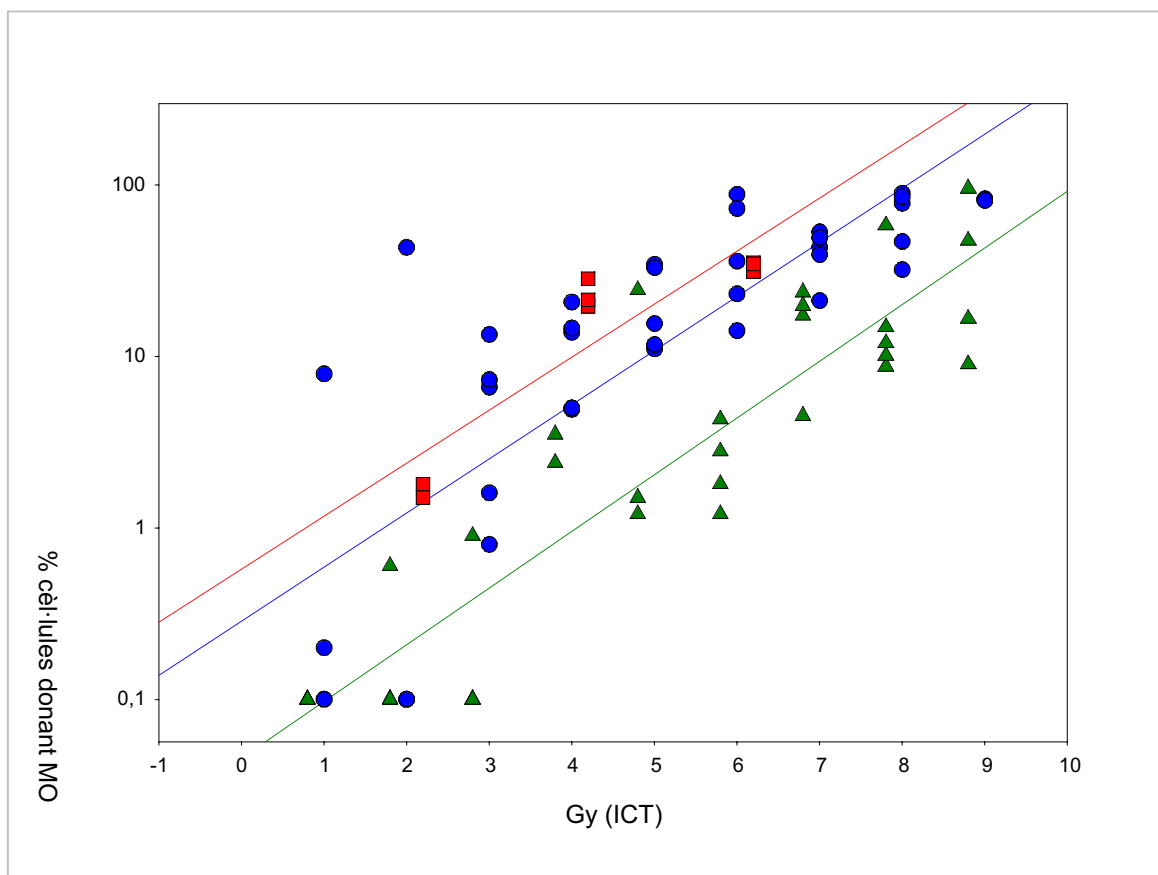


Fig.37b. Relació entre la dosi d'ICT (Gy) i el nivell d'empelt (escala log) a MO dels grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes (triangles), 5×10^6 cèl·lules transduïdes (quadrats) o amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules no transduïdes (cercles), 22 setmanes post-trasplantament. Les diferències entre els tres grups eren estadísticament significatives ($p < 0,05$).

DISCUSSIÓ

El TCH s'utilitza cada vegada més pel tractament d'algunes malalties malignes i genètiques del sistema hemopoètic. Per desgràcia, encara existeixen problemes importants en la seva aplicació, com ara la recurrència de la malignitat en els trasplantaments autòlegs, i la pèrdua o rebuig de l'empelt i el GVHD en els al·lotrasplantaments. Aquest fet explica l'elevat número d'estudis experimentals i clínics que s'estan duent a terme en aquest àmbit. Alguns dels problemes associats al trasplantament estan relacionats amb la naturalesa i intensitat dels règims preparatius previs al trasplantament. La majoria d'estratègies utilitzades pel trasplantament autòleg de cèl·lules mare hemopoètiques de MO requereixen tractaments mieloablatius (quimioteràpia o/i radioteràpia); essent l'ICT a elevades dosis, conjuntament amb l'administració de fàrmacs quimioteràpics com la ciclofosfamida i el busulfan, el règim de condicionament més utilitzat per la preparació de l'hoste pel TCH. Els règims de condicionament són tòxics, mal tolerats i tenen efectes secundaris greus a curt i a llarg termini. Com a conseqüència la morbiditat i la mortalitat relacionada amb el condicionament és molt elevada, sobretot en pacients majors de 55 anys o pacients joves que han presentat toxicitat greu amb la quimioteràpia convencional o que tenen una història prèvia de trasplantament. Ara bé, els tractaments preparatoris es consideren essencials per diverses raons: en el cas de malalties malignes, per eliminar les cèl·lules tumorals (de l'hoste), per immunosuprimir l'hoste i així evitar el rebuig de l'empelt en els TCH al·logènics i per crear espai físic ("nínxols" hemopoètics) a la cavitat medul·lar de l'hoste, perquè les cèl·lules trasplantades puguin empeltar. No obstant, en els darrers 20 anys estant apareixent estudis que han qüestionat el dogma tradicional que és necessària la creació d'espai físic al MO de l'hoste perquè empeltin les cèl·lules del donant (82, 83, 85, 86).

En aquest treball s'ha estudiat com influeix la mieloablació en l'empelt de progenitors hemopoètics murins transduïts i s'ha demostrat que el nivell d'empelt de cèl·lules hemopoètiques transduïdes és clarament depenent de la dosi d'ICT administrada prèviament al trasplantament. Alhora també s'ha demostrat que les cèl·lules transduïdes amb retrovirus tenen menys capacitat d'empelt a llarg termini que les cèl·lules no manipulades i que aquest defecte es pot millorar augmentant el número de cèl·lules trasplantades. Per investigar la influència de la irradiació en l'empelt de cèl·lules hemopoètiques transduïdes es varen trasplantar grups de 5 ratolins receptors C57BL/6J (CD45.2) no irradiats i irradiats amb diferents dosis creixents d'ICT (entre 1 i 9 Gy), amb $0,5 \times 10^6$ i 5×10^6 de cèl·lules transduïdes provinents del MO dels ratolins donants B6.SJL (CD45.1) pre-tractats amb 5-FU.

Es va analitzar l'empelt a curt (40 dies) i llarg termini (22 setmanes) i el percentatge de cèl·lules transduïdes de tots els grups experimentals. No es varen observar cèl·lules del donant a SP, melsa i MO dels ratolins no condicionats. En els grups de ratolins irradiats, el nivell d'empelt augmentava, tant a curt com a llarg termini, de manera exponencial amb la dosi d'ICT. Analitzant el percentatge de cèl·lules de l'empelt portadores del transgen es varen obtenir resultats similars en tots els grups de ratolins analitzats, independentment del nivell d'empelt i la dosi d'ICT administrada. Aquest fet suggereix que en aquest model experimental les possibles respostes immunes contra les cèl·lules que expressen el transgen no es produeixen o no afecten la supervivència *in vivo* de les cèl·lules transduïdes. A més, el manteniment durant 22 setmanes dels percentatges de les cèl·lules transduïdes indicava que probablement aquestes cèl·lules tenen la mateixa capacitat de repoblació a llarg termini que les cèl·lules no transduïdes. En aquest model murí, s'ha trobat que condicionant els ratolins amb una dosi d'ICT de només 2 Gy s'aconsegueixen nivells significatius d'empelt (5.9 % de mitjana de percentatge d'empelt a SP dels ratolins trasplantats amb 5×10^6 de cèl·lules transduïdes). Aquests resultats tenen moltes i importants implicacions en teràpia gènica, teràpia cel·lular i en el trasplantament d'òrgans sòlids. Per exemple per la inducció de tolerància immunològica al donant o a les cèl·lules transduïdes, la qual es podria aconseguir amb aquests nivells d'empelt hemopoètic estable. Finalment, aquests resultats demostren que la dosi cel·lular trasplantada i el procés de manipulació *ex vivo* requerit per transduir les cèl·lules mare hemopoètiques tenen una enorme influència en l'empelt hemopoètic, tant en ratolins irradiats letalment com en ratolins no condicionats, observacions que estan d'acord amb treballs previs (45, 96, 97, 188, 189).

Prèviament a la realització de l'estudi *in vivo* presentat en aquest treball, es va haver de desenvolupar un protocol per transduir eficientment progenitors hemopoètics murins. Els actuals protocols de transferència gènica a cèl·lules mare hemopoètiques persegueixen una transducció eficient d'aquestes cèl·lules *ex vivo* i alhora que es preservin les seves característiques de totipotencialitat i capacitat de repoblació *in vivo* a llarg termini. En l'actualitat, els vectors retrovírics són l'alternativa més prometedora ja que s'integren al material genètic de la cèl·lula infectada. No obstant, per a poder infectar les cèl·lules mare hemopoètiques mitjançant vectors retrovírics convencionals (basats en el VLMoMu) és imprescindible l'entrada en cicle de les cèl·lules i la major part de les cèl·lules mare hemopoètiques murines es troben en fase G₀. En el model murí, l'entrada en cicle de les cèl·lules s'indueix mitjançant el pretractament dels ratolins amb 5-FU (14) i/o la preincubació de les cèl·lules amb diferents combinacions de citocines (44, 45, 51).

Definir una combinació de factors de creixement que indueixi l'entrada en cicle de les cèl·lules mare per afavorir la seva transducció, però mantenint la seva funcionalitat, és un pas indispensable per l'èxit de la transferència gènica mediada per retrovirus al sistema hemopoètic. Actualment, els retrovirus són els únics vectors utilitzats als protocols clínics amb cèl·lules hemopoètiques. No obstant, encara que a nivell més experimental han sorgit els lentivirus com a opció teòricament més òptima per a la transducció de cèl·lules quiescents (neurons, cèl·lules mare hemopoètiques, hepatòcits) que els oncoretrovirus. L'avantatge d'utilitzar els lentivirus és que infecten tant les cèl·lules ciclants, en aquesta característica no es diferenciarien dels altres vectors retrovírics, com les no ciclants. Estudis preliminars demostren que els vectors basats en el VIH-1 són capaços d'infectar cèl·lules mare hemopoètiques amb capacitat repobladora a llarg termini (139, 140) (141).

En base a l'experiència que es tenia en la creació de línies productores de retrovirus, estables, mitjançant les quals s'havia aconseguit transduir eficientment els progenitors hemopoètics humans amb capacitat de repoblació *in vivo* (131, 158) (11), es va crear la línia productora ecotròpica de retrovirus que s'utilitzaria per transduir els progenitors murins. Estava demostrat que el vector retrovíric que s'utilitzà (vector híbrid FMEV) donava una expressió del transgen en progenitors hemopoètics mieloides elevada, respecte els vectors basats en el promotor del VLMoMu. El provirus conté la seqüència *leader* de MESV (*Murine Embryonic Stem Cell Virus*) i una versió modificada de l'LTR del SFFV (*Spleen Focus Forming Virus*). Aquest LTR va ser dissenyat per Ostertag i col (187) per minimitzar les possibilitats de recombinació del provirus i, per tant, el risc de produir virus salvatges i per augmentar l'expressió del vector en els progenitors hemopoètics (190). Com a gen marcador es va utilitzar l'EGFP, el qual confereix fluorescència a les cèl·lules que l'expressen quan aquestes són excitades amb llum UV. D'aquesta manera l'eficiència de la transducció es va poder determinar d'una manera fàcil i ràpida, per citometria de flux o microscòpia de fluorescència.

Es va crear una nova línia estable productora de retrovirus ecotròpics, derivada de la línia cel·lular epitelial de ronyó humà 293, la línia NX-E (cedida per Nolan G, <http://www.stanford.edu/group/nolan/>). Es varen transduir les cèl·lules NX-E amb el sobrenadant de la línia cel·lular productora PG13/EGFP (pseudotipada amb l'*env* del GALV). Posteriorment es varen separar clons únics de les cèl·lules infectades mitjançant el dispositiu d'autoclon del FACS i es va seleccionar el que presentava el títol víric més elevat (2×10^6 partícules víriques infectives $\times \text{ml}^{-1}$) (Fig.15, pàgina 86). La línia ecotròpica NX-E/EGFP va mantenir el títol estable tota la durada dels experiments. A més, el sobrenadant de la línia productora no contenia virus salvatges segons el Test del Rescat del Marcador assajat sobre fibroblasts murins NIH/3T3.

Un dels requeriments principals que ha de presentar una línia productora de retrovirus perquè sigui acreditat el seu ús en un protocol clínic de teràpia gènica és l'absència de virus salvatges infectius que es poden crear per recombinació dels gens virals bàsics i la seqüència ψ del vector. Per a minimitzar el risc de recombinació i posterior formació dels virus *helper* s'han generat línies empaquetadores que, en primer lloc, separen els gens virals en 2 plasmidis independents (*gag-pol* i *env*) i, en segon lloc, presenten varies delecions i mutacions que redueixen l'homologia entre seqüències del vector i dels elements d'empaquetament. D'aquesta manera, perquè es generin virus *helper* s'haurien de produir múltiples recombinacions (116). Finalment, quan es va estudiar per *Southern blot* la integració del vector pSF-E a la línia productora NX-E/EGFP, es va demostrar que estava correctament integrat a l'ADN de les cèl·lules i que hi havia dues còpies del vector per genoma cel·lular (Fig.19).

El protocol per a la transducció de progenitors hemopoètics utilitzat en els estudis *in vivo* d'aquest treball, comprenia, en primer lloc, un enriquiment en progenitors hemopoètics mitjançant el pre-tractament dels ratolins donants amb 5-FU (14). La fase inicial del protocol comprenia l'estimulació de les cèl·lules amb medi condicionat de la línia WEHI (IL-3) i BHK/MKL (SCF), per afavorir l'entrada en cicle de les cèl·lules mare murines. Es va avaluar l'efecte del període d'incubació (0, 24 i 48 hores) de les cèl·lules de MO en l'eficiència de transducció *in vitro* del total de les cèl·lules hemopoètiques mononuclears de MO i del percentatge de progenitors clonogènics (CFC) transduïts. No es varen observar diferències importants en l'eficiència de transducció quan s'estimulava prèviament a la infecció amb retrovirus (24 i 48 hores) o no s'estimulava amb citocines (Fig.21), probablement degut a l'efecte previ del 5-FU. Per raons de coordinació dels experiments de transducció *in vitro* (irradiació dels ratolins, preparació del sobrenadant de la línia productora, etc) es va decidir pre-incubar les cèl·lules 24 hores amb els medis condicionats abans del primer cicle d'infecció amb retrovirus. A més, es va incloure el fragment CH-296 de la fibronectina humana en el protocol de transducció de cèl·lules, perquè s'havia demostrat que augmentava considerablement les possibilitats de contacte entre els virus i les cèl·lules diana ja que s'afavoria la co-localització de les partícules víriques amb les cèl·lules hemopoètiques que expressen VLA-4 i VLA-5, humanes (165, 176), murines (51, 191) i de primats no humans (167, 192); mantenint la capacitat repobladora de les cèl·lules. El contacte entre els retrovirus i les cèl·lules diana també augmentà quan se centrifugaven les plaques de cultiu, una vegada afegit el sobrenadant víric (Taula 6, pàgina 95). Finalment, es realitzaven dos cicles d'infecció amb el sobrenadant de la línia productora (NX-E/EGFP) en dos dies consecutius. Es va obtenir un protocol molt eficient per a la transducció de progenitors hemopoètics murins (Fig.24).

Fins aquest moment no s'ha vist a la literatura cap treball que utilitzi un protocol basat en la utilització de sobrenedant, que millori el percentatge de transducció de progenitors murins obtingut en aquest treball, tant *in vitro* com *in vivo*. No obstant, hi ha un treball recent de Wognum i col en el qual utilitzant una altra combinació de citocines (SCF, Flt3-L i TPO) i el vector retrovíric MFG-EGFP, aconseguixen resultats similars (51). L'expansió amb citocines pot tenir efectes negatius com ara la inducció de la diferenciació de les cèl·lules mare hemopoètiques i la pèrdua de potencial de repoblació *in vivo*, inclús en animals irradiats letalment (45). Tot i això, encara que s'ha progressat a pas de gegant per assolir una transducció eficient i estable de les cèl·lules mare hemopoètiques, encara es coneix poc sobre els factors que influencien l'empelt i la capacitat de repoblació de les cèl·lules mare transduïdes.

El concepte convencional que la mieloablació és un requisit per obrir espai físic (nínxols) al MO per l'empelt de cèl·lules mare del donant ha estat posat en dubte, farà aproximadament 15 anys, des dels estudis on es demostrà per primera vegada presència d'empelt en ratolins no condicionats (82, 83). Més endavant el grup de Quesenberry han demostrat repetidament que trasplantant grans quantitats de cèl·lules mare hemopoètiques no manipulades aconseguïen empelts elevats en ratolins no condicionats (en el model murí singènic) (93, 193, 194). En un dels treballs més impressionant del grup, receptors no condicionats que varen rebre MO provinent de 2 fèmurs i 2 tíbies (200×10^6 cèl·lules del MO) durant 5 dies consecutius, 12 mesos post-trasplantament presentaven uns percentatges de cèl·lules del donant a SP, melsa i MO de 48%, 32% i 29%, respectivament (195). Encara que no existeix cap més grup que hagi publicat uns resultats similars, altres autors també han obtingut empelt singènic de cèl·lules del donant, encara que no tant elevats, en ratolins no condicionats (86). Malauradament, aquesta estratègia no es pot aplicar en humans a causa del nombre limitat de cèl·lules trasplantables que s'obtenen amb les tècniques actuals d'ús clínic.

Per altra banda, hi ha pocs treballs que hagin estudiat l'empelt de cèl·lules hemopoètiques singèniques a receptors condicionats amb baixes dosis d'ICT. En un dels treballs, Stewart i col suggereixen que l'empelt hemopoètic pot ser detectat en ratolins mínimament condicionats i el grau de quimerisme ve determinat per la competició entre les cèl·lules mare del donant i del receptor (93). Per demostrar-ho, inoculen entre 10 i 40×10^6 cèl·lules de MO de ratolins femella BALB/c a receptors mascles singènics exposats a dosis mínimes mieloablatives (50, 70, 100 i 200 cGy) i obtenen nivells elevats de quimerisme (d'un 40 a un 100% a MO) fins 2 mesos post-trasplantament. És interessant estudiar l'empelt en dosis mínimes de condicionament sobretot per la potencial aplicació en aconseguir quimerisme estable en els trasplantaments al·logènics (196-198). També es pot aconseguir quimerisme al·logènic estable trasplantant dosis elevades de cèl·lules (199, 200). Aquest

concepte té profundes implicacions i ja ha obert camí a noves teràpies, com ara els anomenats “minitransplantaments”, que ja han estat utilitzats en pacients amb càncers hematològics que per la seva edat o el seu risc no podien rebre un TCH al·logènic convencional (108). Els quimerismes mixts hemopoètics estables tenen aplicacions en el càncer, malalties autoimmunitàries i en el camp del trasplantament per la inducció de tolerància a les cèl·lules del donant. Per aquesta raó, la recerca de tractaments mínimament mieloablatius i/o immunosupressors, capaços d’induir quimerisme estable mixt hemopoètic, constitueix actualment un camp de recerca molt important.

Els resultats dels estudis *in vivo* realitzats en aquest treball demostren, en primer lloc, que la manipulació *ex vivo* de les cèl·lules mare hemopoètiques té un impacte clarament negatiu en l’empelt d’aquestes cèl·lules respecte les mateixes cèl·lules no manipulades tant a curt com a llarg termini, inclús a nivells d’ICT elevats. Per tant, aquest apartat es pot considerar una ampliació dels estudis existents, ja que es va analitzar el quimerisme en un rang més ampli de dosis d’ICT (de 1 a 9 Gy) i en ratolins no condicionats. A més, s’ha pogut realitzar l’estudi comparatiu de la capacitat d’empelt, a curt i a llarg termini, de cèl·lules del MO murines fresques i manipulades *ex vivo* (cultivades amb citocines i transduïdes amb retrovirus) en cada grup d’irradiació. Els nivells d’empelt a curt i a llarg termini en els receptors de cèl·lules no manipulades van ser sempre superiors als observats en els receptors de cèl·lules transduïdes, amb increments significatius d’empelt sobretot en els grups de ratolins irradiats entre 3 i 7 Gy d’ICT (Fig.30 i 31). És a dir, quan es trasplantà el mateix nombre de cèl·lules fresques que transduïdes, a ratolins mínimament condicionats, s’obtenien nivells d’empelt més elevats amb les cèl·lules fresques que amb les transduïdes.

En receptors poc condicionats, la manipulació *ex vivo* de les cèl·lules anava en detriment de la capacitat d’empelt, tal i com assenyalen altres treballs. Inclús en el cas dels animals irradiats letalment a una dosi de 9 Gy, l’empelt a SP ($89 \pm 1,5$ vs $70,1 \pm 17,3\%$), melsa ($87,1 \pm 2,6$ vs $69,8 \pm 14,5\%$) i MO ($81,7 \pm 1,5$ vs $41,9 \pm 39,1\%$) obtingut 22 setmanes post-trasplantament era significativament superior en els animals trasplantats amb cèl·lules no manipulades que en els trasplantats amb cèl·lules transduïdes. A curt termini, les diferències d’empelt només s’accentuaven en els grups de 2 a 6 Gy. En definitiva, aquests resultats van en la mateixa línia d’altres treballs que també demostren que la manipulació *ex vivo*, en concret el cultiu amb citocines, de les cèl·lules mare hemopoètiques disminueix la seva capacitat d’empelt tant en ratolins no condicionats (96) com en receptors tractats amb dosis baixes d’irradiació (45). És possible que les condicions de cultiu utilitzades en alguns estudis (inclòs el present) siguin subòptimes pel manteniment de la funcionalitat de les CMH. No es pot descartar que l’estimulació de la mitosi de les CMH quiescents per acció dels factors de

creixement o del 5-FU (fet que es requereix per l'entrada dels retrovirus), reduís la capacitat de nidificació i/o de repoblació de les cèl·lules transduïdes (97, 189, 201).

En els grups de receptors no condicionats trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules (transduïdes i no transduïdes) no es detectà, ni a curt ni a llarg termini, presència de cèl·lules del donant. Quan es va incrementar en 10 vegades el número de cèl·lules transduïdes trasplantades per animal, s'observaren cèl·lules del donant ($0,5 \pm 0,5\%$) a SP dels receptors 40 dies post-trasplantament. No obstant, aquestes microquimeres s'havien perdut a les 22 setmanes del trasplantament. S'ha descrit una reducció en la capacitat d'empelt de cèl·lules hemopoètiques murines transduïdes mitjançant retrovirus en ratolins no condicionats (97). Utilitzant el model de trasplantament mascle/femella, aquests autors (grup de Quesenberry) varen trasplantar grans quantitats de cèl·lules del MO de mascle transduïdes a femelles singèniques normals. A pesar de l'elevat nombre de cèl·lules transduïdes *in vitro* i que el 10% de les cèl·lules del MO eren del donant 14 mesos post-trasplantament, no es varen detectar seqüències d'ADN del transgen (MDR-1) mitjançant PCR. Segons els autors, aquestes cèl·lules transduïdes presentarien un defecte en l'empelt. En aquest cas, les cèl·lules es cultivaren amb IL-3, IL-6, IL-11 i SCF.

Les quimeres hemopoètiques obtingudes en els grups de ratolins tractats amb dosis baixes d'ICT (2, 3, 4 i 5 Gy) trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules (transduïdes i no transduïdes) es mantenien estables, amb poca variació, fins les 22 setmanes del trasplantament. El mateix succeïa en els grups de ratolins irradiats amb dosis superiors d'ICT (de 6 a 9 Gy). No obstant, en tots els grups de ratolins, el percentatge de cèl·lules del donant era lleugerament inferior al MO que a la melsa i SP, on s'obtenien nivells similars d'empelt. Els nivells d'empelt obtinguts en els receptors irradiats amb dosis baixes d'ICT (de 1 a 5 Gy) però trasplantats amb cèl·lules fresques foren significativament més elevats que els grups homòlegs trasplantats amb el mateix número de cèl·lules transduïdes (Fig. 31).

Semblaria que la pèrdua d'empelt de les cèl·lules transduïdes era deguda a la manipulació *ex vivo* amb les citocines, més que als dos cicles d'infecció amb retrovirus, perquè no s'observaren diferències significatives en el nivell d'empelt entre receptors irradiats a 4 Gy trasplantats amb cèl·lules exposades al sobrenadant de la línia empaquetadora NX-E (*mock transduction*) i les mateixes cèl·lules transduïdes amb el sobrenadant de la línia productora NX-E/EGFP (Taula 13, pàgina 120). Per altra banda, els ratolins trasplantats amb cèl·lules fresques presentaven nivells d'empelt significativament més elevats que els anteriors grups experimentals. Alguns treballs indiquen que la presència d'IL-3 en el conjunt de factors de creixement utilitzats per l'expansió de les cèl·lules hemopoètiques murines *ex vivo* disminueix la capacitat LTR de la població estimulada (44, 45). Wogmun i col estudien la capacitat repobladora de cèl·lules hemopoètiques murines pre-tractades amb 5-FU,

transduïdes amb el gen EGFP en diferents combinacions de citocines i demostren que la composició de citocines utilitzada per activar les cèl·lules mare abans i durant la transducció retroviral té efectes quantitativament importants en la capacitat repobladora de les cèl·lules transduïdes. Comproven que l'estimulació amb SCF, Flt3-L i TPO reté una proporció significativa (aproximadament un 30%) de la capacitat repobladora de les cèl·lules de MO fresques. Quan afegien al cultiu IL-3 i IL-11 detecten una reducció important (10 vegades) de la capacitat STR i LTR de les cèl·lules EGFP⁺ (51). No obstant, altres autors havien demostrat prèviament que la IL-11 mantenia la capacitat LTR de les CMH (17, 19, 202).

En els experiments de transducció d'aquest treball, l'exposició a un protocol de transducció de 4 dies, va resultar, en els grups de ratolins on s'observaren diferències d'empelt estadísticament significatives (grups d'ICT de 3 a 6 Gy), en una reducció d'entre 2 a 8 vegades de la capacitat de repoblació *in vivo* de les cèl·lules transduïdes respecte les fresques, tant a curt (SP) com a llarg termini (SP, melsa i MO). La reducció de la capacitat LTR de les cèl·lules transduïdes podria ser explicada principalment per dues raons, que no són excloents: per canvis en les propietats de nidificació als nínxols hemopoètics de les cèl·lules transduïdes i per la pèrdua de la capacitat d'autorenovació de les CMH, degut a l'estimulació amb citocines.

S'ha demostrat que l'exposició de les cèl·lules de MO murines a factors de creixement, com ara l'IL-3, l'IL-6 i l'IL-11, resulta en una reducció (entre 2 i 10 vegades) de la freqüència de progenitors clonogènics i de cèl·lules repobladores de MO (50). Aquest fet alguns autors l'han atribuït als canvis induïts pels factors de creixement en l'expressió de determinades molècules d'adhesió i també, a estadis específics en el trànsit del cicle cel·lular de les cèl·lules estimulades (203). De totes maneres, és probable que la pèrdua de la capacitat LTR de les cèl·lules transduïdes també pugui ser deguda a la pèrdua de cèl·lules mare hemopoètiques durant el procés de transducció, degut a apoptosi o a la diferenciació de les cèl·lules mare per l'estimulació amb citocines, o bé a la suma de les dues raons exposades. S'han presentat varis treballs que demostren una pèrdua de la capacitat LTR de cèl·lules mare murines exposades a citocines (IL-3, IL-6, IL-11 i SCF) en ratolins singènics normals i irradiats (45, 96, 189, 204) i després de la transducció amb retrovirus facilitada per citocines en animals no condicionats (97). És possible que les condicions utilitzades en alguns estudis (incloent el present) no siguin les òptimes pel manteniment de la funcionalitat de les cèl·lules mare hemopoètiques. En aquest treball, els ratolins trasplantats amb cèl·lules no manipulades rebien el mateix nombre de cèl·lules que alguns dels ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes ($0,5 \times 10^6$). No obstant, durant el període del cultiu *ex vivo* el nombre total de cèl·lules va créixer una mitjana d'un 44%. Durant el cultiu *ex vivo* podria ser que algunes de les cèl·lules repobladores haguessin mort, o bé haguessin perdut les propietats de

nidificació o simplement que s'haguessin diferenciat. La disminució de la capacitat d'empelt de les cèl·lules manipulades es podria solucionar si: i) es reduís la durada del procés de manipulació per transduir les CMH (per exemple, utilitzant vectors basats en lentivirus) (205); ii) optimitzant les condicions de cultiu per expandir millor les cèl·lules mare i/o mantenir el seu potencial repoblador (202, 206) o, iii) augmentant el número de cèl·lules transduïdes que es trasplanten (194). Un factor addicional que podria complicar l'empelt hemopoètic és el pretractament dels ratolins donants amb 5-FU. Aquest fàrmac depleciona el MO de cèl·lules ciclants, enriquint-lo en cèl·lules repobladores (unes 10 vegades) que eventualment són induïdes a ciclar. El tractament amb 5-FU és necessari per aconseguir una transducció retrovívica eficient. De totes maneres, podria influenciar negativament l'empelt de les cèl·lules hemopoètiques (85, 95).

Quan es va augmentar 10 vegades (a 5×10^6 cèl·lules) el número de cèl·lules transduïdes inoculades per tal de poder estudiar si això augmentaria l'empelt en els grups de ratolins irradiats a baixes dosis d'ICT (2, 4 i 6 Gy); varen augmentar significativament els nivells d'empelt aconseguits a tots els grups de ratolins.

A curt termini, els resultats d'empelt en els tres grups d'ICT trasplantats amb 5×10^6 de cèl·lules transduïdes foren lleugerament superiors als obtinguts en ratolins trasplantats amb cèl·lules fresques, tal i com s'observa a la Figura 36. En concret els grups on s'observen diferències importants en l'empelt a curt termini eren els grups d'ICT 3, 4, 5 i 6 Gy, on la capacitat de repoblació de les cèl·lules transduïdes va resultar entre 2 i 8 vegades inferior a l'observat amb les no transduïdes. A llarg termini, a SP i melsa, les diferències d'empelt continuaven essent en els mateixos grups d'ICT i la capacitat LTR de les cèl·lules transduïdes disminuïa també entre 2 (6 Gy) i 8 (3 Gy) vegades. No obstant, al MO les diferències més acusades entre l'empelt de les cèl·lules transduïdes i no transduïdes es va detectar als grups d'ICT més elevada (6, 7 i 8 Gy). Segons aquest model, irradiant amb una dosi baixa d'ICT (per exemple 2 Gy) i augmentant fins a 5×10^6 la dosi de cèl·lules transduïdes trasplantades es podia aconseguir quimerisme hemopoètic estable a llarg termini (de mitjana, el 5,9 % de cèl·lules eren del donant a SP dels receptors irradiats amb 2 Gy i trasplantats amb 5×10^6 de cèl·lules transduïdes). Com ja s'ha comentat anteriorment, aquests resultats tenen interès en el camp de la teràpia cel·lular i gènica d'algunes malalties genètiques que afecten sistema hemopoètic (apartat 10, Introducció), on aconseguint nivells d'empelt o de correcció de l'ordre del 5% ja s'obtidria un benefici clínic (88, 207). També és interessant la seva implicació en l'estratègia terapèutica dels "minitrasplantaments"(108). La cerca de tractaments mínimament mieloablatius o immunosupressors que permetin la inducció de quimeres hemopoètiques mixtes estables després de la infusió de cèl·lules mare hemopoètiques del donant, constitueix actualment un dels focus principals de recerca de

l'onco-hematologia. Una altra possible aplicació seria la inducció de tolerància en el trasplantament al·logènic (sòlid).

Com a resultat complementari d'aquesta segona part del treball, es pot afirmar que es varen observar elevats coeficients de correlació (r) entre l'empelt i la dosi d'ICT administrada en els tres grups de ratolins analitzats: els trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ i 5×10^6 cèl·lules transduïdes i els trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules fresques (Fig. 36 i 37). Assumint que aquesta relació lineal i dosi-depenent és extensible a altres dosis cel·lulars i a cèl·lules manipulades en diferents condicions, es pot hipotetitzar que, donat un model específic conegut, es poden generar corbes de correlació que permetin estimar o predir la dosi d'ICT necessària per obtenir un nivell desitjat d'empelt després del trasplantament d'un número conegut de cèl·lules hemopoètiques (no manipulades o manipulades en unes condicions determinades). Estudis previs ja havien demostrat correlacions significatives entre la dosi de cèl·lules trasplantades (singèniques o al·logèniques) i el nivell d'empelt en ratolins no condicionats (194, 208).

Semblaria que, en el model singènic, la relació final entre les cèl·lules del donant i de l'hoste vindria determinada bàsicament per la competició entre les cèl·lules mare del donant i de l'hoste (Fig.6, pàgina 32), tal i com s'observa en els resultats d'empelt presentats en aquest treball i en altres treballs (93). La reducció del número de cèl·lules mare endògenes (per acció dels nivells mínims d'irradiació) que competirien amb les trasplantades afavoriria l'empelt. En aquest cas, els l'irradiació que s'utilitza per obrir espai al MO té el mínim efecte en la cel·lularitat total del MO. Per altra banda, els alts nivells d'empelt obtinguts per varis autors en ratolins no condicionats, quan s'administren dosis cel·lulars elevades, recolzen l'anterior model.

En el model singènic, amb nivells baixos d'ICT i trasplantant dosis elevades de cèl·lules es pot aconseguir quimerisme hemopoètic estable a llarg termini. Aquests estudis, entre ells el present, suggereixen estratègies per la creació de quimerisme hemopoètic estable en el model al·logènic, utilitzant: i) baixes dosis d'ICT i, ii) números relativament elevats de cèl·lules hemopoètiques del donant. L'obtenció d'al·loquimeres estables, a nivell experimental, té molt interès per la seva aplicació en varies malalties, com ara l'anèmia de cèl·lules falciformes, la talassèmia, la malaltia granulomatosa crònica, la malaltia de Gaucher, la mucopolisacaridosi, les immunodeficiències, etc.

En els trasplantaments al·logènics, perquè s'esdevingui una resposta efectiva de les cèl·lules T, calen dos senyals d'activació: la interacció primària té lloc entre el complex major d'histocompatibilitat (MHC) de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) i el receptor de les cèl·lules T i una segona interacció entre la molècula co-estimuladora i el seu receptor. En el model murí s'han definit varies vies co-estimuladores, les dues més estudiades són la família de molècules B7 (CD80 i CD86) presents a la APC que s'uneixen als seus receptors de les cèl·lules T (CD28 i CTLA4) i la molècula CD40 (present a les APC) que s'uneix al seu lligand (CD40L) a la cèl·lula T. Les cèl·lules T que reben el primer senyal en absència del senyal co-estimulador, es tornen anèrgiques o bé moren. Contràriament, els limfòcits T citotòxics que reben les dues senyals d'activació inicien l'expansió clonal i responen contra les cèl·lules al·logèniques. En aquest sentit, comencen a aparèixer els primers estudis on s'intenta bloquejar les vies co-estimuladores per establir tolerància específica. Alguns treballs aconseguen obtenir al·loquimeres mixtes estables només immunosuprimint, mitjançant el bloqueig de les vies co-estimuladores, prèviament al trasplantament de les cèl·lules del donant, tant en el model caní (209) com en el murí (210-212). No obstant, en la majoria de treballs, tant en el model murí com en el caní, els resultats obtinguts no són prou bons ja que les al·loquimeres aconseguides són baixes i només s'aconsegueixen en un percentatge dels animals experimentals.

En un treball recent, Quesenberry i col han establert un model murí per la creació d'al·loquimeres hemopoètiques estables a llarg termini (213). Mitjançant el pre-tractament dels receptors (BALB/c) amb l'anticòs monoclonal contra el lligand de CD40, irradiant a una dosi baixa d'ICT (100 cGy) i exposant-los a l'antigen prèviament al trasplantament de cèl·lules de la melsa dels donants (pre-sensibilitzat), aconseguen al·loquimeres estables (30-40%) 64 setmanes després del trasplantament, sense GVHD, infonent 40×10^6 de cèl·lules del donant.

Així doncs, la relació descrita en aquest treball entre la dosi d'ICT administrada i la manipulació de les cèl·lules trasplantades i l'empelt aconseguit podria ser de gran utilitat per induir immunotolerància contra les cèl·lules del donant amb condicionament subletal (irradiació a baixes dosis i immunosupressió) en receptors de trasplantament al·logènic. Per exemple, en humans s'ha descrit que l'al·loquimerisme hemopoètic mixt en el trasplantament d'individus amb talassèmia pot conduir a la correcció de la malaltia (214). Estratègies semblants s'han utilitzat en els primers estudis per induir tolerància en el trasplantament d'illots pancreàtics murins al·logènics (215) i xenotrasplantaments de pell de rata a ratolins (216, 217). En un estudi, aplicant entre 650 i 750 cGy d'ICT com a únic factor de condicionament varen aconseguir un empelt xenogènic (rata a ratolí) estable (30%) i una tolerància específica al donant (218).

Els resultats obtinguts en l'estudi de l'expressió del transgen (EGFP) en els ratolins trasplantats amb cèl·lules transduïdes tenen profundes implicacions en el camp de la teràpia gènica. En primer lloc, els resultats obtinguts *in vitro* mostraven diferències clares entre la mitjana del percentatge de cèl·lules de MO total EGFP⁺ i el percentatge de progenitors CFC EGFP⁺ del cultiu. Per exemple, en el cas dels grups de ratolins trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes es varen realitzar 20 experiments de transducció de cèl·lules del MO del donant i es va obtenir una eficiència de transducció en cèl·lules totals del $27,2 \pm 10$ %. No obstant, el $57,8 \pm 19,5\%$ dels progenitors tipus CFC expressaven el transgen, essent equivalent la mitjana observada *in vivo*. Aquestes diferències s'expliquen probablement per la suma de diverses raons. En primer lloc, quan s'analitzava per citometria de flux el percentatge de cèl·lules EGFP⁺ del cultiu, en la finestra d'anàlisi s'incloïen involuntàriament poblacions cel·lulars (eritròcits, eritroblasts, cèl·lules mortes, etc) que emmascaraven el resultat i, per tant, s'infravalorava el percentatge real de cèl·lules que expressaven el transgen. Contràriament, en els cultius clonogènics, s'analitzava el percentatge de progenitors EGFP⁺ respecte el total del cultiu, constituït únicament per CFC. En segon lloc, podria ser que es transduís de manera més eficient en determinats subtipus de progenitors que en altres (CMH, CFU-GM, etc). El tercer factor que pot haver-hi contribuït seria que quan es trasplantaven les cèl·lules transduïdes encara no havia passat el temps suficient perquè totes les cèl·lules del cultiu que contenien el transgen expressessin la proteïna. Posteriorment hem comprovat que perquè totes les cèl·lules transduïdes expressin els nivells màxims de la proteïna calen un mínim de 48 hores després de l'exposició al vector i, en aquest estudi, les cèl·lules s'analitzaven 24 hores després de l'últim cicle d'infecció, el que pot haver infravalorat la veritable eficiència de transducció.

La discrepància observada entre l'eficiència de transducció de cèl·lules totals *in vitro* i l'observada *in vivo* o en progenitors tipus CFC indicaria una transducció més elevada de progenitors més immadurs amb capacitat de repoblació a llarg termini que d'altres cèl·lules del MO, probablement relacionada amb l'ús de CH-296. En progenitors humans (CD34⁺) derivats de SCU també s'obtenen bones eficiències de transducció (utilitzant protocols similars de transducció) i s'ha demostrat un empelt elevat de les cèl·lules transduïdes en ratolins NOD/SCID (131, 219). En concret, el nostre grup, en col·laboració amb el grup del Dr Bueren (CIEMAT, Madrid), utilitzant un protocol de transducció que implicava el cultiu de cèl·lules CD34⁺ de SCU amb Flt3-L, TPO, IL-6 i SCF i en presència de CH-296, vàrem obtenir unes elevades eficiències de transducció *in vitro* (60%) i vàrem demostrar que les cèl·lules transduïdes contribuïen a l'hemopoesi multilínatge de ratolins NOD/SCID durant més 120 dies post-trasplantament (11).

Els resultats dels estudis de transducció i trasplantament en gossos i primats com el macaco i el babuí encara estan bastant lluny dels obtinguts en el model murí. Utilitzant els avenços en el disseny de vectors i els nous protocols de transducció, els investigadors han obtingut fins un 10% de transducció en tots els llinatges hemopoètics després de la transducció retrovívica de les cèl·lules mare hemopoètiques dels primats (127, 167-169).

Referent a l'evolució temporal de l'expressió del gen marcador *in vivo*, 40 dies després del trasplantament de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes els receptors presentaven a SP uns percentatges de cèl·lules procedents del donant EGFP⁺ elevats (de mitjana, superiors al 50%), independentment de la dosi d'ICT administrada i l'empelt hemopoètic (Taula 7, pàgina 106). Aquests resultats, tal i com era d'esperar, s'apropaven més al percentatge de progenitors CFC EGFP⁺ del cultiu *in vitro* (pre-trasplantament) que als obtinguts en l'anàlisi *in vitro* les cèl·lules de MO EGFP⁺ per citometria de flux. Els grups de ratolins irradiats (2, 4 i 6 Gy) i trasplantats amb la dosi superior de cèl·lules transduïdes (5×10^6 cèl·lules) també presentaven nivells elevats (superiors a un 65%) de cèl·lules que expressaven en transgen *in vivo* a SP 40 dies post-trasplantament. Igualment que en els grups trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes, tampoc hi havia diferències en el percentatge de cèl·lules EGFP⁺ *in vivo* segons el nivell d'empelt observat o la dosi d'ICT administrada.

Cal destacar que en un ratolí no condicionat que es trasplantà amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes que va presentar només un 1% de cèl·lules del donant a curt termini, la meitat de les quals (53%) eren EGFP⁺. Aquests resultats continuaven essent similars 22 setmanes després de la infusió de les cèl·lules transduïdes (Fig.28). A SP, melsa i MO es varen obtenir nivells equivalents de cèl·lules procedents del donant que expressaven el transgen (superiors al 40% gairebé en la majoria dels casos i propers al 90% en algun cas) en els diferents grups de ratolins irradiats, trasplantats amb $0,5 \times 10^6$ cèl·lules transduïdes (Taula 9, pàgina 109). En els grups de ratolins irradiats i trasplantats amb 5×10^6 cèl·lules transduïdes es varen obtenir resultats semblants, és a dir, nivells d'expressió d'EGFP d'entre 50-80% a SP, melsa i MO.

En resum, l'expressió del transgen en els diferents grups d'ICT i en els diferents teixits hemopoètics (SP, melsa i MO) fou equivalent en tots els grups, independentment del número de cèl·lules transduïdes trasplantades, de la dosi d'irradiació administrada o del nivell d'empelt aconseguit. Els percentatges de cèl·lules EGFP⁺ *in vivo* eren alts i es mantenien estables a llarg del temps per cadascun dels grups d'ICT (Fig.28). A més, el manteniment d'aquests percentatges al llarg del temps indicava que probablement les cèl·lules EGFP⁺ tenien la mateixa capacitat de repoblació que les cèl·lules EGFP⁺; és a dir, es varen transduir autèntiques CMH. El fet que tots els grups de ratolins analitzats presentessin percentatges similars de cèl·lules hemopoètiques EGFP⁺ del donant, independentment de la dosi d'ICT

rebuda i del nivell d'empelt aconseguit, suggereix que, o bé no hi hagué respostes immunes contra les cèl·lules EGFP⁺ o bé les respostes eren dèbils i no afectaven la supervivència i funcionalitat de les cèl·lules transduïdes *in vivo*.

L'estudi de les possibles respostes immunes contra les cèl·lules que expressen antígens forans té especial interès en els camps de la teràpia gènica i cel·lular ja que és un dels principals obstacles per l'aplicació amb èxit d'ambdues teràpies. En un estudi recent del grup de Rosenzweig s'adreça aquest problema; trasplanten cèl·lules singèniques CD34⁺ transduïdes amb l'EGFP a micos (*Macaca mulatta*) sotmesos a una irradiació no letal (240 cGy) i detecten una forta inducció de resposta T citotòxica específica contra el transgen, associada a una pèrdua de cèl·lules modificades genèticament a SP. També demostren que la resposta dels limfòcits T citotòxics (CTL) ve restringida per MHC, és mediada pels limfòcits T CD8⁺, i dirigida a múltiples epítops de la molècula (220). Demostren que els limfòcits citotòxics són capaços de lisar eficientment les cèl·lules CD34 autòlogues transduïdes. A més, en els 50 % dels animals també es dona resposta humoral. En altres treballs s'ha demostrat que l'EGFP és immunogènica quan s'expressa en cèl·lules tumorals en models murins (221, 222). No obstant, treballs anteriors suggerien que de manera infreqüent l'aparició de respostes immunitàries contra gens foranis introduïts a les CMH és molt poc freqüent. Per exemple, a micos condicionats amb irradiació subletal (500 cGy), Rosenzweig i col havien observat entre un 5 i un 10% d'expressió de la proteïna murina CD24, de 4 a 6 mesos després del trasplantament (169). En un altre treball recent, també amb micos, es demostra que si s'aconsegueix que el gen forà s'expressi de manera estable a les CMH, el receptor es fa tolerant al producte del gen durant el temps que es mantingui l'MHC (223). Aquests resultats contrasten amb els del treball de Lutzko i col, on observen la generació de resposta immunitària humoral i resposta proliferativa en gossos deficients per l'enzim α -L-iduronidasa després del trasplantament de cèl·lules autòlogues del MO transduïdes amb el gen del la α -L-iduronidasa (224). Encara fan falta estudis que comparin directament la supervivència de cèl·lules que continguin el vector immunogènic i no immunogènica en el trasplantament amb condicionament no mieloablatiu per l'avaluació rigorosa del paper de les respostes immunitàries en la supervivència de les cèl·lules modificades genèticament després d'un trasplantament singènic. No obstant i en base als resultats de l'últim treball de Rosenzweig (220), els autors proposen que la inducció o no de tolerància contra els transgens expressats a les CMH singèniques té a veure amb: i) el grau d'immunosupressió del receptor (donat pel règim de condicionament), ii) l'immunogenicitat de la proteïna, iii) el grau d'expressió del transgen al timus (depèn de l'eficiència de transducció en cèl·lules amb capacitat de repoblació, de l'empelt aconseguit i potser de la potència dels promotors retrovírics utilitzats)

i iv) també hi podrien intervenir les citocines utilitzades tant per estimular les cèl·lules hemopoètiques com per facilitar la recuperació hematològica post-irradiació.

El fet que l'expressió del transgen *in vivo* als teixits hemopoètics es mantingués estable, tant a curt com a llarg termini (Fig.29), permet fer una sèria d'observacions, algunes de les quals ja han estat comentades amb anterioritat: i) les cèl·lules que es varen transduir tenien capacitat LTR, ii) les cèl·lules de l'empelt que varen incorporar el transgen probablement tenen la mateixa capacitat de repoblació que les que no l'incorporaren, iii) no s'esdevenen respostes immunitàries significatives contra la proteïna de medusa EGFP (tolerància immunològica) i, finalment, iv) que probablement no s'ha esdevingut silenciament de l'expressió d'EGFP, ja que és una de les causes principals de pèrdua d'expressió gènica. L'expressió estable i a llarg termini del transgen és una de les propietats desitjables d'un vector, sobretot en el cas de malalties genètiques en què es persegueix una correcció a llarg termini. En referència a l'apartat iv), un dels problemes que presenten els vectors retrovírics convencionals (basats en VLMoMu) és la tendència a la pèrdua de l'expressió del gen. Això és degut en part a que els promotors (LTR) del VLMoMu, que són rics en illes CpG, són susceptibles d'ésser metilats en determinat tipus cel·lulars que consegüentment silencien la transcripció gènica. La incidència d'aquest fenomen en els vectors derivats de VLMoMu és elevada (142). Degut a que un dels objectius del nostre treball fou optimitzar la transducció en cèl·lules hemopoètiques murines, es va desenvolupar un vector retrovíric (SF-EGFP) que tenia un promotor híbrid FMEV (SFFV/MESV) que ha estat dissenyat per augmentar l'expressió del transgen en progenitors hemopoètics mieloides i a la cèl·lula mare hemopoètica (187).

Una possible limitació del model murí utilitzat per mesurar l'empelt (ratolins donants CD45.1 i receptors CD45.2) és l'impacte que aquesta petita diferència immunològica pot tenir en l'empelt. En un treball molt recent de Van Os i col es parteix de la hipòtesi que si CD45 és una proteïna extracel·lular, les diferències entre els antígens del donant (CD45.1) i l'hoste (CD45.2) podrien induir respostes immunes contra les cèl·lules del donant i afectar l'empelt (225). Els resultats que presenten indiquen que en el model singènic de TCH basat en el CD45 s'assoleixen nivells inferiors d'empelt que en el TCH singènic basat en diferències electroforètiques en l'enzim citoplasmàtic GPI-1, i ho atribueixen a mecanismes immunològics (encara que això no ho arriben a demostrar). Demostren que amb nivells baixos d'ICT (2 i 4 Gy) i trasplantant dosis baixes de cèl·lules del MO, l'empelt resultà significativament inferior en els ratolins trasplantats amb MO singènic CD45 que en els ratolins infosos amb GPI-1. Quan s'augmentava la dosi d'ICT a 6 Gy, obtingueren nivells similars d'empelt en els dos models de trasplantament, suggerint que no existiria prou immunitat residual contra les cèl·lules del donant per causar diferències en l'empelt.

Anteriorment ja s'havia indicat que es podien generar cèl·lules T reactives anti-Ly5 específiques de la regió polimòrfica de la molècula Ly5 (226). De fet, també s'ha demostrat que el model murí singènic de TCH entre mascles i femelles histocompatibles de la mateixa espècie també pot estar influenciat per reaccions immunes contra els antígens del cromosoma Y (227).

En resum, la teràpia gènica dirigida a les CMH requereix la utilització de vectors eficients i segurs per aconseguir una transferència gènica i una expressió estable. A més, i no menys important, calen estratègies per facilitar l'empelt de les cèl·lules modificades i per anul·lar les possibles respostes immunitàries contra els productes dels transgens. En aquest estudi es proposa un model de trasplantament singènic amb cèl·lules modificades genèticament on, segons la dosi cel·lular administrada, la manipulació o no *ex vivo* de les cèl·lules trasplantades i la dosi d'irradiació rebuda es pot fer estimacions de l'empelt que s'obtindrà, tant a curt com a llarg termini. L'estudi té implicacions en el camp de la teràpia gènica si es té en compte que hi ha moltes malalties genètiques que afecten a la CMH que podrien ser tractades amb un trasplantament autòleg de cèl·lules modificades genèticament aplicant baixes dosis de condicionament, ja que els efectes secundaris dels tractaments convencionals de condicionament constitueixen la principal causa de la morbi-mortalitat en aquests pacients. No són menys importants les implicacions d'aquest estudi en la recerca de tractaments de condicionament mínimament mieloablatius i/o immunosupressors, capaços d'aconseguir quimerismes mixts hemopoètics estables en pacients amb càncer o malalties autoimmunitàries, o en receptors de trasplantaments al·logènics per la inducció de tolerància a les cèl·lules del donant.

CONCLUSIONS

I. Sobre el desenvolupament d'un protocol de transducció retroviral de progenitors hemopoètics murins amb capacitat de repoblació a llarg termini.

1. La línia productora ecotròpica NX-E/EGFP és una línia estable, presenta un títol víric elevat, no produeix partícules víriques amb capacitat replicativa (al sobrenadant) i conté el provirus SF-EGFP correctament integrat al seu genoma.
2. El marcatge amb EGFP és un sistema ideal per estudiar la transducció de les CMH ja que les característiques fluorescents de la proteïna permeten l'anàlisi directa (sense passos addicionals), multiparamètrica i a temps real de les cèl·lules marcades, mitjançant el microscopi de fluorescència o el citòmetre de flux, així com la separació de les cèl·lules transduïdes.
3. La variable que més influència la transducció dels progenitors hemopoètics murins és el pre-tractament de la superfície de cultiu amb el fragment de la fibronectina CH-296. La centrifugació de les plaques de cultiu també facilita la transducció.
4. El protocol de transducció basat en: la pre-incubació de les cèl·lules del MO amb medis condicionats com a font d'IL-3 i SCF, la utilització de CH-296, la centrifugació i la realització de dos cicles d'infecció amb el sobrenadant de la línia productora NX-E/EGFP permet una transducció eficient, reproducible i estable de les CMH murines.

II. Estudi de l'empelt de les cèl·lules transduïdes i de l'expressió del marcador en un model murí (*in vivo*).

5. El model de ratolins congènics CD45.1/CD45.2 és un bon sistema per a la detecció i quantificació de l'empelt de cèl·lules hemopoètiques murines.

6. L'expressió d'EGFP a SP, melsa i MO dels ratolins trasplantats era elevada ($62,2 \pm 14,6$ %), i es mantenia relativament estable en el temps en els diferents teixits analitzats, independentment de la dosi d'ICT administrada i de la dosi cel·lular trasplantada ($0,5 \times 10^6$ o 5×10^6), suggerint que el marcatge és altament eficient en cèl·lules amb capacitat de repoblació, que les CMH transduïdes tenen la mateixa capacitat de repoblació a llarg termini que les no transduïdes, i que tots els ratolins empeltats probablement han desenvolupat tolerància immunològica a l'EGFP.
7. La transducció *ex vivo* de les cèl·lules de MO prèviament al trasplantament disminueix la seva capacitat de repoblació, tant a curt com a llarg termini, respecte les cèl·lules de MO fresques, especialment en els receptors sotmesos a dosis d'irradiació moderades (entre 2 i 6 Gy).
8. L'augment del número de cèl·lules transduïdes trasplantades augmenta proporcionalment l'empelt hemopoètic dels ratolins trasplantats, tant a curt com a llarg termini, a SP, melsa i MO, independentment de la dosi d'irradiació administrada.
9. En el model murí utilitzat, existeix una elevada correlació entre la dosi d'ICT (entre 2 i 9 Gy) administrada i l'empelt aconseguit en els ratolins trasplantats, independentment de la manipulació i la dosi de cèl·lules infoses.

BIBLIOGRAFIA

1. Testa NG, Molineux G. Haemopoiesis. A practical approach. Oxford University Press; 1993.
2. Testa NG, Dexter M. The regulation of hemopoetic cell production. Hoffbrand VA, Lewis SM, Tuddenham EG. Postgraduate Haematology. Fourth edition ed: Butterworth Heineman; 1999.
3. Medvinsky AL, Gan OI, Semenova ML, Samoylina NL. Development of day-8 colony-forming unit-spleen hematopoietic progenitors during early murine embryogenesis: spatial and temporal mapping. *Blood* 1996;**87**:557-66.
4. Verfaillie C, Hurley R, Bhatia R, McCarthy JB. Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994;**16**:201-24.
5. Hodgson GS, Bradley TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell. *Nature* 1979;**281**:381-2.
6. Suda T, Suda J, Ogawa M. Proliferative kinetics and differentiation of murine blast cell colonies in culture: evidence for variable G₀ periods and constant doubling rates of early pluripotent hemopoietic progenitors. *J Cell Physiol* 1983;**117**:308-18.
7. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Spangrude GJ, Weissman IL. Functional heterogeneity is associated with the cell cycle status of murine hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 1993;**122**:897-902.
8. Capel B, Hawley RG, Mintz B. Long- and short-lived murine hematopoietic stem cell clones individually identified with retroviral integration markers. *Blood* 1990;**75**:2267-70.
9. Lemischka IR. What we have learned from retroviral marking of hematopoietic stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;**177**:59-71.
10. Kiem HP, Darovsky B, von Kalle C, Goehle S, Stewart D, Graham T, et al. Retrovirus-mediated gene transduction into canine peripheral blood repopulating cells. *Blood* 1994;**83**:1467-73.
11. Barquinero J, Segovia JC, Ramirez M, Limon A, Guenechea G, Puig T, et al. Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice. *Blood* 2000;**95**:3085-93.
12. Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira DS, Kelly M, et al. Transduction of human CD34⁺ CD38⁻ bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third-generation lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000;**1**:566-73.

13. Harrison DE, Astle CM, Lerner C. Number and continuous proliferative pattern of transplanted primitive immunohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:822-6.
14. Harrison DE, Lerner CP. Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood* 1991;**78**:1237-40.
15. Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in G₀ and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:4013-7.
16. Lansdorp PM, Dragowska W. Maintenance of hematopoiesis in serum-free bone marrow cultures involves sequential recruitment of quiescent progenitors. *Exp Hematol* 1993;**21**:1321-7.
17. Tanaka R, Katayama N, Ohishi K, Mahmud N, Itoh R, Tanaka Y, et al. Accelerated cell-cycling of hematopoietic progenitor cells by growth factors. *Blood* 1995;**86**:73-9.
18. Reems JA, Torok-Storb B. Cell cycle and functional differences between CD34⁺/CD38^{hi} and CD34⁺/38^{lo} human marrow cells after in vitro cytokine exposure. *Blood* 1995;**85**:1480-7.
19. Trevisan M, Yan XQ, Iscove NN. Cycle initiation and colony formation in culture by murine marrow cells with long-term reconstituting potential in vivo. *Blood* 1996;**88**:4149-58.
20. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993;**81**:2844-53.
21. Nakahata T, Ogawa M. Clonal origin of murine hemopoietic colonies with apparent restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GMM) differentiation. *J Cell Physiol* 1982;**111**:239-46.
22. Yang FC, Watanabe S, Tsuji K, Xu MJ, Kaneko A, Ebihara Y, et al. Human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) stimulates the in vitro and in vivo development but not commitment of primitive multipotential progenitors from transgenic mice expressing the human G-CSF receptor. *Blood* 1998;**92**:4632-40.
23. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**:14482-6.
24. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;**401**:390-4.
25. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000;**288**:1660-3.

26. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;**6**:1229-34.
27. Whetton AD, Spooncer E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998;**10**:721-6.
28. Gupta P, Oegema TR, Jr., Brazil JJ, Dudek AZ, Slungaard A, Verfaillie CM. Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparan sulfates: requirement for optimal binding interactions of heparan sulfate with early-acting cytokines and matrix proteins. *Blood* 2000;**95**:147-55.
29. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998;**339**:746-54.
30. Wendling F. Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica* 1999;**84**:158-66.
31. Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998;**91**:1101-34.
32. Ku H, Hirayama F, Kato T, Miyazaki H, Aritomi M, Ota Y, et al. Soluble thrombopoietin receptor (Mpl) and granulocyte colony-stimulating factor receptor directly stimulate proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice in synergy with steel factor or the ligand for Flt3/Flk2. *Blood* 1996;**88**:4124-31.
33. Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 1990;**343**:76-9.
34. Lotem J, Sachs L. Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor beta 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood* 1992;**80**:1750-7.
35. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994;**55**:1-96.
36. Katayama N, Shih JP, Nishikawa S, Kina T, Clark SC, Ogawa M. Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors. *Blood* 1993;**82**:2353-60.
37. Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* 1994;**84**:408-14.
38. Wineman JP, Nishikawa S, Muller-Sieburg CE. Maintenance of high levels of pluripotent hematopoietic stem cells in vitro: effect of stromal cells and c-kit. *Blood* 1993;**81**:365-72.

39. Andrews RG, Bensinger WI, Knitter GH, Bartelmez SH, Longin K, Bernstein ID, et al. The ligand for c-kit, stem cell factor, stimulates the circulation of cells that engraft lethally irradiated baboons. *Blood* 1992;**80**:2715-20.
40. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:3760-4.
41. Nimer SD, Uchida H. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 expression. *Stem Cells* 1995;**13**:324-35.
42. Koike K, Ihle JN, Ogawa M. Declining sensitivity to interleukin 3 of murine multipotential hemopoietic progenitors during their development. Application to a culture system that favors blast cell colony formation. *J Clin Invest* 1986;**77**:894-9.
43. Lopez AF, Dyson PG, To LB, Elliott MJ, Milton SE, Russell JA, et al. Recombinant human interleukin-3 stimulation of hematopoiesis in humans: loss of responsiveness with differentiation in the neutrophilic myeloid series. *Blood* 1988;**72**:1797-804.
44. Yonemura Y, Ku H, Hirayama F, Souza LM, Ogawa M. Interleukin 3 or interleukin 1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:4040-4.
45. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* 1996;**87**:30-7.
46. Frenette PS, Subbarao S, Mazo I, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc, Nat. Acad. Sci. USA*. 1998;**95**:14423-28.
47. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999;**283**:845-8.
48. Jo DY, Rafii S, Hamada T, Moore MA. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell- derived factor-1. *J Clin Invest* 2000;**105**:101-11.
49. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000;**95**:3289-96.
50. Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant G, Grimes B. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by ex vivo expansion. *Blood* 1999;**93**:1557-66.

51. Wognum AW, Visser TP, Peters K, Bierhuizen MF, Wagemaker G. Stimulation of mouse bone marrow cells with kit ligand, FLT3 ligand, and thrombopoietin leads to efficient retrovirus-mediated gene transfer to stem cells, whereas interleukin 3 and interleukin 11 reduce transduction of short- and long-term repopulating cells. *Hum Gene Ther* 2000;**11**:2129-41.
52. Quesenberry P, Becker P, Nilsson S, Stewart M, Zhong S, Grimaldi C, et al. Stem cell engraftment and cell cycle phenotype: Stromal regulation of hemopoiesis and the role of subliminal growth factor production. *Leukemia* 1999;**13**:S92-3.
53. Becker PS, Nilsson SK, Li Z, Berrios VM, Dooner MS, Cooper CL, et al. Adhesion receptor expression by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status. *Exp Hematol* 1999;**27**:533-41.
54. Jones RJ, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, Sharkis SJ. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony- forming cells. *Nature* 1990;**347**:188-9.
55. Ploemacher RE, van der Loo JC, van Beurden CA, Baert MR. Wheat germ agglutinin affinity of murine hemopoietic stem cell subpopulations is an inverse function of their long-term repopulating ability in vitro and in vivo. *Leukemia* 1993;**7**:120-30.
56. Zijlmans JM, Visser JW, Kleiverda K, Kluin PM, Willemze R, Fibbe WE. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:8901-5.
57. Wolf NS, Kone A, Priestley GV, Bartelmez SH. In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342- rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol* 1993;**21**:614-22.
58. Lerner C, Harrison DE. 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol* 1990;**18**:114-8.
59. Bodine DM, McDonagh KT, Seidel NE, Nienhuis AW. Survival and retrovirus infection of murine hematopoietic stem cells in vitro: effects of 5-FU and method of infection. *Exp Hematol* 1991;**19**:206-12.
60. Spangrude GJ, Johnson GR. Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:7433-7.
61. Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;**89**:1502-6.

62. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y, Suda T. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 1992;**80**:3044-50.
63. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34- low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;**273**:242-5.
64. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol* 1998;**26**:353-60.
65. Randall TD, Lund FE, Howard MC, Weissman IL. Expression of murine CD38 defines a population of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;**87**:4057-67.
66. Zhao Y, Lin Y, Zhan Y, Yang G, Louie J, Harrison DE, et al. Murine hematopoietic stem cell characterization and its regulation in BM transplantation. *Blood* 2000;**96**:3016-22.
67. Bodine DM, Crosier PS, Clark SC. Effects of hematopoietic growth factors on the survival of primitive stem cells in liquid suspension culture. *Blood* 1991;**78**:914-20.
68. Jones RJ, Celano P, Sharkis SJ, Sensenbrenner LL. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 1989;**73**:397-401.
69. Zijlmans JM, Visser JW, Laterveer L, Kleiverda K, Heemskerk DP, Kluin PM, et al. The early phase of engraftment after murine blood cell transplantation is mediated by hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:725-9.
70. Harrison DE. Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood* 1980;**55**:77-81.
71. Thomas ED. A history of haematopoietic cell transplantation. *British Journal of Haematology* 1999;**105**:330-39.
72. Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, et al. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 1991;**77**:1717-22.
73. Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine cattle twins. *Science* 1945;**102**:400-3.
74. Hampson IN, Spooncer E, Dexter TM. Evaluation of a mouse Y chromosome probe for assessing marrow transplantation. *Exp Hematol* 1989;**17**:313-5.

75. van Os R, Konings AW, Down JD. Radiation dose as a factor in host preparation for bone marrow transplantation across different genetic barriers. *Int J Radiat Biol* 1992;**61**:501-10.
76. Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH. The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:7182-6.
77. Baird MC, Hendry JH, Testa NG. Radiosensitivity increases with differentiation status of murine hemopoietic progenitor cells selected using enriched marrow subpopulations and recombinant growth factors. *Radiat Res* 1990;**123**:292-8.
78. Ploemacher RE, van Os R, van Beurden CA, Down JD. Murine haemopoietic stem cells with long-term engraftment and marrow repopulating ability are more resistant to gamma-radiation than are spleen colony forming cells. *Int J Radiat Biol* 1992;**61**:489-99.
79. Takada A, Takada Y, Ambrus JL. Proliferation of spleen cells from mice infected with Friend Virus in the spleens of unirradiated and irradiated mice. *Experientia* 1971;**27**:315-6.
80. Takada Y, Takada A. Proliferation of donor hematopoietic cells in irradiated and unirradiated host mice. *Transplantation* 1971;**12**:334-8.
81. Brecher G, Tjio JH, Haley JE, Narla J, Beal SL. Transplantation of murine bone marrow without prior host irradiation. *Blood Cells* 1979;**5**:237-46.
82. Brecher G, Ansell JD, Micklem HS, Tjio JH, Cronkite EP. Special proliferative sites are not needed for seeding and proliferation of transfused bone marrow cells in normal syngeneic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;**79**:5085-7.
83. Saxe DF, Boggs SS, Boggs DR. Transplantation of chromosomally marked syngeneic marrow cells into mice not subjected to hematopoietic stem cell depletion. *Exp Hematol* 1984;**12**:277-83.
84. Carter RF, Abrams-Ogg AC, Dick JE, Kruth SA, Valli VE, Kamel-Reid S, et al. Autologous transplantation of canine long-term marrow culture cells genetically marked by retroviral vectors. *Blood* 1992;**79**:356-64.
85. Stewart FM, Crittenden RB, Lowry PA, Pearson-White S, Quesenberry PJ. Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice. *Blood* 1993;**81**:2566-71.
86. Wu DD, Keating A. Hematopoietic stem cells engraft in untreated transplant recipients. *Exp Hematol* 1993;**21**:251-6.

87. Bienzle D, Abrams-Ogg AC, Kruth SA, Ackland-Snow J, Carter RF, Dick JE, et al. Gene transfer into hematopoietic stem cells: long-term maintenance of in vitro activated progenitors without marrow ablation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:350-4.
88. Schiffmann R, Medin JA, Ward JM, Stahl S, Cottler-Fox M, Karlsson S. Transfer of the human glucocerebrosidase gene into hematopoietic stem cells of nonablated recipients: successful engraftment and long-term expression of the transgene. *Blood* 1995;**86**:1218-27.
89. Simonaro CM, Haskins ME, Abkowitz JL, Brooks DA, Hopwood JJ, Zhang J, et al. Autologous transplantation of retrovirally transduced bone marrow or neonatal blood cells into cats can lead to long-term engraftment in the absence of myeloablation. *Gene Ther* 1999;**6**:107-13.
90. Nelson DM, Metzger ME, Donahue RE, Morgan RA. In vivo retrovirus-mediated gene transfer into multiple hematopoietic lineages in rabbits without preconditioning. *Hum Gene Ther* 1997;**8**:747-54.
91. Ohashi T, Yokoo T, Iizuka S, Kobayashi H, Sly WS, Eto Y. Reduction of lysosomal storage in murine mucopolysaccharidosis type VII by transplantation of normal and genetically modified macrophages. *Blood* 2000;**95**:3631-3.
92. Barquinero J, Kiem HP, von Kalle C, Darovsky B, Goehle S, Graham T, et al. Myelosuppressive conditioning improves autologous engraftment of genetically marked hematopoietic repopulating cells in dogs. *Blood* 1995;**85**:1195-201.
93. Stewart FM, Zhong S, Wu J, Hsieh C, Nilsson SK, Quesenberry PJ. Lymphohematopoietic engraftment in minimally myeloablated hosts. *Blood* 1998;**91**:3681-7.
94. Huhn RD, Tisdale JF, Agricola B, Metzger ME, Donahue RE, Dunbar CE. Retroviral marking and transplantation of rhesus hematopoietic cells by nonmyeloablative conditioning. *Hum Gene Ther* 1999;**10**:1783-90.
95. Ramshaw HS, Rao SS, Crittenden RB, Peters SO, Weier HU, Quesenberry PJ. Engraftment of bone marrow cells into normal unprepared hosts: effects of 5-fluorouracil and cell cycle status. *Blood* 1995;**86**:924-9.
96. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, IL-11, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts [published erratum appears in *Exp Hematol* 1995 Jun;**23**(6):568]. *Exp Hematol* 1995;**23**:461-9.

97. Kittler EL, Peters SO, Crittenden RB, Debatis ME, Ramshaw HS, Stewart FM, et al. Cytokine-facilitated transduction leads to low-level engraftment in nonablated hosts. *Blood* 1997;**90**:865-72.
98. Bernad A, Varas F, Gallego JM, Almendral JM, Bueren JA. Ex vivo expansion and selection of retrovirally transduced bone marrow: an efficient methodology for gene-transfer to murine lymphohaemopoietic stem cells. *Br J Haematol.* 1994;**87**:6-17.
99. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 1998;**91**:756-63.
100. Giralt S, Estey E, Albitar M, van Besien K, Rondon G, Anderlini P, et al. Engraftment of allogeneic hematopoietic progenitor cells with purine analog-containing chemotherapy: harnessing graft-versus-leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997;**89**:4531-6.
101. Martino R, Sierra J. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after immunosuppressive but non-myeloablative conditioning: "miniallografts" are no small matter. *Haematologica* 1998;**83**.
102. Ildstad ST, Wren SM, Boggs SS, Hronakes ML, Vecchini F, Van den Brink MR. Cross-species bone marrow transplantation: evidence for tolerance induction, stem cell engraftment, and maturation of T lymphocytes in a xenogeneic stromal environment (rat to mouse). *J Exp Med* 1991;**174**:467-78.
103. Colson YL, Wren SM, Schuchert MJ, Patrene KD, Johnson PC, Boggs SS, et al. A nonlethal conditioning approach to achieve durable multilineage mixed chimerism and tolerance across major, minor, and hematopoietic histocompatibility barriers. *J Immunol* 1995;**155**:4179-88.
104. Colson YL, Lange J, Fowler K, Ildstad ST. Mechanism for cotolerance in nonlethally conditioned mixed chimeras: negative selection of the Vbeta T-cell repertoire by both host and donor bone marrow-derived cells. *Blood* 1996;**88**:4601-10.
105. Tomita Y, Sachs DH, Khan A, Sykes M. Additional monoclonal antibody (mAb) injections can replace thymic irradiation to allow induction of mixed chimerism and tolerance in mice receiving bone marrow transplantation after conditioning with anti-T cell mABs and 3-Gy whole body irradiation. *Transplantation* 1996;**61**:469-77.

106. Storb R, Yu C, Barnett T, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in dog leukocyte antigen-identical littermate dogs given lymph node irradiation before and pharmacologic immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1999;**94**:1131-6.
107. Kawai T, Cosimi AB, Colvin RB, Powelson J, Eason J, Kozlowski T, et al. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995;**59**:256-62.
108. Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R. Mini-allografts: ongoing trials in humans [editorial]. *Bone Marrow Transplant* 2000;**25**:345-50.
109. Anderson WF. Human gene therapy. *Science* 1992;**256**:808-13.
110. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995;**270**:475-80.
111. Anderson WF. Human Gene Therapy. *Nature* 1998;**392 (supp)**:25-30.
112. Romano G, Michell P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000;**18**:19-39.
113. Gunzburg WH, Salmons B. Virus vector design in gene therapy. *Mol Med Today* 1995;**1**:410-7.
114. Herniou E, Martin J, Miller K, Cook J, Wilkinson M, Tristem M. Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J Virol* 1998;**72**:5955-66.
115. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*. CSHL Press. 1997.
116. Miller AD. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* 1990;**1**:5-14.
117. Forestell SP, Dando JS, Chen J, de Vries P, Bohnlein E, Rigg RJ. Novel retroviral packaging cell lines: complementary tropisms and improved vector production for efficient gene transfer. *Gene Ther* 1997;**4**:600-10.
118. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1992 Jan;12(1):433]. *Mol Cell Biol* 1990;**10**:4239-42.
119. Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 1989;**57**:659-66.

120. Albritton LM, Kim JW, Tseng L, Cunningham JM, Scadden D. Envelope-binding in the cationic amino acid transporter determines the host range of ecotropic murine retroviruses. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *J Virol* 1993;**67**:2091-6.
121. Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 1991;**352**:725-8.
122. Miller DG, Edwards RH, Miller AD. Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:78-82.
123. Persons DA, Allay JA, Allay ER, Smeyne RJ, Ashmun RA, Sorrentino BP, et al. Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors in vitro and identification of genetically modified cells in vivo. *Blood* 1997;**90**:1777-86.
124. Halene S, Wang L, Cooper RM, Bockstoce DC, Robbins PB, Kohn DB. Improved expression in hematopoietic and lymphoid cells in mice after transplantation of bone marrow transduced with a modified retroviral vector. *Blood* 1999;**94**:3349-57.
125. Schuening F, Storb R, Nash R, Stead RB, Kwok WW, Miller AD. Retroviral transfer of genes into canine hematopoietic progenitor cells. *Adv Exp Med Biol* 1988;**241**:9-18.
126. Dunbar CE, Seidel NE, Doren S, Sellers S, Cline AP, Metzger ME, et al. Improved retroviral gene transfer into murine and Rhesus peripheral blood or bone marrow repopulating cells primed in vivo with stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:11871-6.
127. Kiem HP, Heyward S, Winkler A, Potter J, Allen JM, Miller AD, et al. Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* 1997;**90**:4638-45.
128. Orlic D, Girard LJ, Anderson SM, Do BK, Seidel NE, Jordan CT, et al. Transduction efficiency of cell lines and hematopoietic stem cells correlates with retrovirus receptor mRNA levels. *Stem Cells* 1997;**1**:23-8.
129. Miller AD, Garcia JV, von Suhr N, Lynch CM, Wilson C, Eiden MV. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 1991;**65**:2220-4.

130. von Kalle C, Kiem HP, Goehle S, Darovsky B, Heimfeld S, Torok-Storb B, et al. Increased gene transfer into human hematopoietic progenitor cells by extended in vitro exposure to a pseudotyped retroviral vector. *Blood* 1994;**84**:2890-7.
131. van Hennik PB, Verstegen MM, Bierhuizen MF, Limon A, Wognum AW, Cancelas J A, et al. Highly efficient transduction of the green fluorescent protein gene in human umbilical cord blood stem cells capable of cobblestone formation in long-term cultures and multilineage engraftment of immunodeficient mice. *Blood* 1998;**92**:4013-22.
132. Emi N, Friedmann T, Yee JK. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 1991;**65**:1202-7.
133. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:8033-7.
134. Rebel VI, Tanaka M, Lee JS, Hartnett S, Pulsipher M, Nathan DG, et al. One-day ex vivo culture allows effective gene transfer into human nonobese diabetic/severe combined immune-deficient repopulating cells using high-titer vesicular stomatitis virus G protein pseudotyped retrovirus. *Blood* 1999;**93**:2217-24.
135. Link CJ. Adenoviral vectors go retro. *Nature Biotechnology* 2000;**18**:150-1.
136. Zheng C, Baum BJ, Iadarola MJ, O'Connell BC. Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector. *Nat Biotechnology* 2000;**18**:176-80.
137. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996;**272**:263-7.
138. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 1998;**72**:8150-7.
139. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 1999;**283**:682-6.
140. Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, Trono D. High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 2000;**96**:3392-8.

141. Barrette S, Douglas JL, Seidel NE, Bodine DM. Lentivirus-based vectors transduce mouse hematopoietic stem cells with similar efficiency to Moloney murine leukemia virus-based vectors. *Blood* 2000;**96**:3385-91.
142. Challita PM, Kohn DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:2567-71.
143. Grez M, Akgun E, Hilberg F, Ostertag W, Stocking C, Jung A, et al. Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. Functional analysis of a retroviral host-range mutant: altered long terminal repeat sequences allow expression in embryonal carcinoma cells. Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:9202-6.
144. Challita PM, Skelton D, el-Khoueiry A, Yu XJ, Weinberg K, Kohn DB. Multiple modifications in cis elements of the long terminal repeat of retroviral vectors lead to increased expression and decreased DNA methylation in embryonic carcinoma cells. *J Virol* 1995;**69**:748-55.
145. Baum C, Eckert HG, Stockschrader M, Just U, Hegewisch-Becker S, Hildinger M, et al. Improved retroviral vectors for hematopoietic stem cell protection and in vivo selection. *J Hematother* 1996;**5**:323-9.
146. Dao MA, Yu XJ, Nolte JA. Clonal diversity of primitive human hematopoietic progenitors following retroviral marking and long-term engraftment in immune-deficient mice. *Exp Hematol* 1997;**25**:1357-66.
147. Lemischka IR. Clonal, in vivo behavior of the totipotent hematopoietic stem cell. *Semin Immunol* 1991;**3**:349-55.
148. Sorrentino BP, Brandt SJ, Bodine D, Gottesman M, Pastan I, Cline A, et al. Selection of drug-resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 1992;**257**:99-103.
149. Mavilio F, Ferrari G, Rossini S. Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral -vector mediated gene transfer. *Blood* 1994;**83**:1988-97.
150. Conneally E, Bardy P, Eaves CJ, Thomas T, Chappel S, Shpall EJ, et al. Rapid and efficient selection of human hematopoietic cells expressing murine heat-stable antigen as an indicator of retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 1996;**87**:456-64.
151. Pawliuk R, Kay R, Lansdorp P, Humphries RK. Selection of retrovirally transduced hematopoietic cells using CD24 as a marker of gene transfer. *Blood* 1994;**84**:2868-77.

152. Hanazono Y, Dunbar CE. Genetic Marking. In: Thomas D, Blome KG, Forman SJ, editors. Hematopoietic cell transplantation. 2nd Edition. Blackwell Science Inc. 1999.
153. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992;**111**:229-33.
154. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;**263**:802-5.
155. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence [letter]. *Nature* 1995;**373**:663-4.
156. Yang TT, Cheng L, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:4592-3.
157. Bierhuizen MF, Westerman Y, Visser TP, Dimjati W, Wognum AW, Wagemaker G. Enhanced green fluorescent protein as selectable marker of retroviral-mediated gene transfer in immature hematopoietic bone marrow cells. *Blood* 1997;**90**:3304-15.
158. Limon A, Briones J, Puig T, Carmona M, Fornas O, Cancelas JA, et al. High-titer retroviral vectors containing the enhanced green fluorescent protein gene for efficient expression in hematopoietic cells. *Blood* 1997;**90**:3316-21.
159. Briones J, Puig T, Limon A, Pétriz J, García J, Barquinero J. Retroviral gene transfer into human hematopoietic cells: an in vitro kinetic study. *Haematologica* 1999;**84**:483-8.
160. Joyner A, Keller G, Phillips RA, Bernstein A. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* 1983;**305**:556-8.
161. Correll PH, Kew Y, Perry LK, Brady RO, Fink JK, Karlsson S. Expression of human glucocerebrosidase in long-term reconstituted mice following retroviral-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Hum Gene Ther* 1990;**1**:277-87.
162. Fraser CC, Eaves CJ, Szilvassy SJ, Humphries RK. Expansion in vitro of retrovirally marked totipotent hematopoietic stem cells. *Blood* 1990;**76**:1071-6.
163. Correll PH, Colilla S, Dave HP, Karlsson S. High levels of human glucocerebrosidase activity in macrophages of long-term reconstituted mice after retroviral infection of hematopoietic stem cells. *Blood* 1992;**80**:331-6.
164. Bodine DM, Karlsson S, Nienhuis AW. Combination of interleukins 3 and 6 preserves stem cell function in culture and enhances retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**:8897-901.

165. Moritz T, Dutt P, Xiao X, Carstanjen D, Vik T, Hanenberg H, et al. Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood* 1996;**88**:855-62.
166. Van Beusechem VW, Valerio D. Gene transfer into hematopoietic stem cells of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 1996;**7**:1649-68.
167. Kiem HP, Andrews RG, Morris J, Peterson L, Heyward S, Allen JM, et al. 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* 1998;**92**:1878-86.
168. Tisdale JF, Hanazono Y, Sellers SE, Agricola BA, Metzger ME, Donahue RE, et al. Ex vivo expansion of genetically marked rhesus peripheral blood progenitor cells results in diminished long-term repopulating ability. *Blood* 1998;**92**:1131-41.
169. Rosenzweig M, MacVittie TJ, Harper D, Hempel D, Glickman RL, Johnson RP, et al. Efficient and durable gene marking of hematopoietic progenitor cells in nonhuman primates after nonablative conditioning. *Blood* 1999;**94**:2271-86.
170. Goodell MA. CD34⁺ or CD34⁻: Does it really matter? *Blood* 1999;**94**:2545-2547.
171. Sato T, Laver JH, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1999;**94**:2548-54.
172. Dao MA, Hannum CH, Kohn DB, Nolte JA. FLT3 ligand preserves the ability of human CD34⁺ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction. *Blood* 1997;**89**:446-56.
173. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, et al. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;**89**:2644-53.
174. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 2000;**105**:1013-21.
175. Kollet O, Aviram R, Chebath J, ben-Hur H, Nagler A, Shultz L, et al. The soluble interleukin-6 (IL-6) receptor/IL-6 fusion protein enhances in vitro maintenance and proliferation of human CD34(+)CD38(-/low) cells capable of repopulating severe combined immunodeficiency mice. *Blood* 1999;**94**:923-31.

176. Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock RA, Kato I, Williams DA. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther* 1997;**8**:2193-206.
177. Dao MA, Hashino K, Kato I, Nolta JA. Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1998;**92**:4612-21.
178. Hennemann B, Oh IH, Chuo JY, Kalberer CP, Schley PD, Rose-John S, et al. Efficient retrovirus-mediated gene transfer to transplantable human bone marrow cells in the absence of fibronectin. *Blood* 2000;**96**:2432-9.
179. Dick JE, Kamel-Reid S, Murdoch B, Doedens M. Gene transfer into normal human hematopoietic cells using in vitro and in vivo assays. *Blood* 1991;**78**:624-34.
180. Larochelle A, Vormoor J, Hanenberg H, Wang JC, Bhatia M, Lapidot T, et al. Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 1996;**2**:1329-37.
181. Dao MA, Nolta JA. Use of the bnx/hu xenograft model of human hematopoiesis to optimize methods for retroviral-mediated stem cell transduction (Review). *Int J Mol Med* 1998;**1**:257-64.
182. Brenner M. Use of gene marking technologies in oncology. *Forum* 1998;**8**:342-53.
183. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;**288**:669-72.
184. Algara M, Foro P, Reig A, Kadar E, Sureda A, Valls A. *Oncología* 1996;**19**:469.
185. Lee JC, Hapel AJ, Ihle JN. Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line. *J Immunol* 1982;**128**:2393-8.
186. Sachs L. *Applied Statistics: a handbook of techniques*. New York: Springer-Verlag; 1978.
187. Baum C, Hegewisch-Becker S, Eckert HG, Stocking C, Ostertag W. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 1995;**69**:7541-7.
188. Varas F, Bernad A, Bueren JA. Restrictions in the stem cell function of murine bone marrow grafts after ex vivo expansion of short-term repopulating progenitors. *Experimental Hematology* 1998;**26**:100-9.

189. Qin S, Ward M, Raftopoulos H, Tang H, Bradley B, Hesdorffer C, et al. Competitive repopulation of retrovirally transduced haemopoietic stem cells. *Br J Haematol* 1999;**107**:162-8.
190. Williams DA, Nienhuis AW, Hawley RG, Smith FO. *Gene Therapy 2000*. American Society of Hematology (ASH) 2000:376-93.
191. van der Loo JC, Xiao X, McMillin D, Hashino K, Kato I, Williams DA. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J Clin Invest* 1998;**102**:1051-61.
192. Donahue RE, Wersto RP, Allay JA, Agricola BA, Metzger ME, Nienhuis AW, et al. High levels of lymphoid expression of enhanced green fluorescent protein in nonhuman primates transplanted with cytokine-mobilized peripheral blood CD34(+) cells. *Blood* 2000;**95**:445-52.
193. Quesenberry PJ, Ramshaw H, Crittenden RB, Stewart FM, Rao S, Peters S, et al. Engraftment of normal murine marrow into nonmyeloablated host mice. *Blood Cells* 1994;**20**:348-50.
194. Rao SS, Peters SO, Crittenden RB, Stewart FM, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Stem cell transplantation in the normal nonmyeloablated host: relationship between cell dose, schedule, and engraftment. *Exp Hematol* 1997;**25**:114-21.
195. Blomberg M, Rao S, Reilly J, Tiarks C, Peters S, Kittler E, et al. Repetitive bone marrow transplantation in nonmyeloablated recipients. *Exp Hematol* 1998;**26**:320-4.
196. Colson YL, Zadach K, Nalesnik M, Ildstad ST. Mixed allogeneic chimerism in the rat. Donor-specific transplantation tolerance without chronic rejection for primarily vascularized cardiac allografts. *Transplantation* 1995;**60**:971-80.
197. Prigozhina TB, Gurevitch O, Zhu J, Slavin S. Permanent and specific transplantation tolerance induced by a nonmyeloablative treatment to a wide variety of allogeneic tissues: I. Induction of tolerance by a short course of total lymphoid irradiation and selective elimination of the donor-specific host lymphocytes. *Transplantation* 1997;**63**:1394-9.
198. Zheng XX, Markees TG, Hancock WW, Li Y, Greiner DL, Li XC, et al. CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J Immunol* 1999;**162**:4983-90.

199. Rachamim N, Gan J, Segall H, Krauthgamer R, Marcus H, Berrebi A, et al. Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 1998;**65**:1386-93.
200. Reisner Y, Bachar-Lustig E, Li HW, Aversa F, Velardi A, Martelli MF. The role of megadose CD34+ progenitor cells in the treatment of leukemia patients without a matched donor and in tolerance induction for organ transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**872**:336-48.
201. Güenechea G, Segovia JC, Albella B, Lamana M, Ramirez M, Regidor C, et al. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood* 1999;**93**:1097-105.
202. Albella B, Segovia JC, Guenechea G, Pragnell IB, Bueren JA. Preserved long-term repopulation and differentiation properties of hematopoietic grafts subjected to ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin 11. *Transplantation* 1999;**67**:1348-57.
203. Habibian HK, Peters SO, Hsieh CC, Wu J, Vergilis K, Grimaldi CI, et al. The fluctuating phenotype of the lymphohematopoietic stem cell with cell cycle transit. *J Exp Med* 1998;**188**:393-8.
204. Varas F, Bernad A, Almendral JM, Bueren JA. Relevance of myeloablative conditioning in the engraftment of limiting numbers of normal and genetically marked lympho-hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1996;**18**:981-9.
205. Barrette S, Douglas J, Orlic D, Anderson SM, Seidel NE, Miller AD, et al. Superior transduction of mouse hematopoietic stem cells with 10A1 and VSV-G pseudotyped retrovirus vectors. *Mol Ther* 2000;**1**:330-8.
206. Holyoake TL, Freshney MG, McNair L, Parker AN, McKay PJ, Steward WP, et al. Ex vivo expansion with stem cell factor and interleukin-11 augments both short-term recovery posttransplant and the ability to serially transplant marrow. *Blood* 1996;**87**:4589-95.
207. Dunbar CE, Kohn DB, Schiffmann R, Barton NW, Nolte JA, Esplin JA, et al. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: in vivo detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther* 1998;**9**:2629-40.

208. Down JD, Tarbell NJ, Thames HD, Mauch PM. Syngeneic and allogeneic bone marrow engraftment after total body irradiation: dependence on dose, dose rate, and fractionation. *Blood* 1991;**77**:661-9.
209. Yu C, Storb R, Mathey B, Deeg HJ, Schuening FG, Graham TC, et al. DLA-identical bone marrow grafts after low-dose total body irradiation: effects of high-dose corticosteroids and cyclosporine on engraftment. *Blood* 1995;**86**:4376-81.
210. Wekerle T, Sayegh MH, Ito H, Hill J, Chandraker A, Pearson DA, et al. Anti-CD154 or CTLA4Ig obviates the need for thymic irradiation in a non- myeloablative conditioning regimen for the induction of mixed hematopoietic chimerism and tolerance. *Transplantation* 1999;**68**:1348-55.
211. Durham MM, Bingaman AW, Adams AB, Ha J, Waitze SY, Pearson TC, et al. Cutting edge: administration of anti-CD40 ligand and donor bone marrow leads to hemopoietic chimerism and donor-specific tolerance without cytoreductive conditioning. *J Immunol* 2000;**165**:1-4.
212. Naparstek E, Delukina M, Or R, Nagler A, Kapelushnik J, Varadi G, et al. Engraftment of marrow allografts treated with Campath-1 monoclonal antibodies. *Exp Hematol* 1999;**27**:1210-8.
213. Quesenberry PJ, Zhong S, Wang H, Stewart M. Allogeneic chimerism with low-dose irradiation, antigen presensitization, and costimulator blockade in H-2 mismatched mice. *Blood* 2001;**97**:557-64.
214. Andreani M, Manna M, Lucarelli G, Tonucci P, Agostinelli F, Ripalti M, et al. Persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia. *Blood* 1996;**87**:3494-9.
215. Parker DC, Greiner DL, Phillips NE, Appel MC, Steele AW, Durie FH, et al. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:9560-4.
216. Markees TG, Phillips NE, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, et al. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 1997;**64**:329-35.
217. Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, et al. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *J Clin Invest* 1998;**101**:2446-55.

218. Abou el-Ezz AY, Boggs SS, Johnson PC, Li H, Patrene KD, Itskowitz MS, et al. A minimal conditioning approach to achieve stable multilineage mouse plus rat chimerism. *Transpl Immunol* 1995;**3**:98-106.
219. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999;**93**:3736-49.
220. Rosenzweig M, Connole M, Glickman R, Yue SP, Noren B, DeMaria M, et al. Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood* 2001;**97**:1951-9.
221. Stripecke R, Carmen Villacres M, Skelton D, Satake N, Halene S, Kohn D. Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther* 1999;**6**:1305-12.
222. Gambotto A, Dworacki G, Cicinnati VV, Kenniston T, Steitz J, Tuting T, et al. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* 2000;**7**:2036-40.
223. Heim DA, Hanazono Y, Giri N, Wu T, Childs R, Sellers SE, et al. Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model. *Mol Ther* 2000;**1**:533-44.
224. Lutzko C, Kruth S, Abrams-Ogg AC, Lau K, Li L, Clark BR, et al. Genetically corrected autologous stem cells engraft, but host immune responses limit their utility in canine alpha-L-iduronidase deficiency. *Blood* 1999;**93**:1895-905.
225. van Os R, Sheridan TM, Robinson S, Drukteinis D, Ferrara JL, Mauch PM. Immunogenicity of Ly5 (CD45)-antigens hampers long-Term engraftment following minimal conditioning in a murine bone marrow transplantation model. *Stem Cells* 2001;**19**:80-7.
226. Chen W, Chatta GS, Rubin WD, Clark JG, Hackman RC, Madtes DK, et al. T cells specific for a polymorphic segment of CD45 induce graft-versus-host disease with predominant pulmonary vasculitis. *J Immunol* 1998;**161**:909-18.
227. Simpson E, Roopenian D, Goulmy E. Much ado about minor histocompatibility antigens. *Immunol Today* 1998;**19**:108-12.