



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina

TESIS DOCTORAL

**Papel del Estroma Medular en la Mejora de la
Función Hematopoyética: Desde la Irradiación
hasta las Vesículas Extracelulares**

Directores

Dr. Fermín Sánchez-Guijo Martín

Dra. Sandra Muntión Olave

Prof^a. Dra. M^a Dolores Caballero Barrigón



Silvia Preciado Pérez

Salamanca, 2019

Dr. Fermín Sánchez-Guijo Martín, con D.N.I. 07869479Y, Doctor en Medicina, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca (USAL) y Responsable del Área de Terapia Celular y Hematopoyesis del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca (HUS).

Dra. M^a Sandra Muntión Olave, con D.N.I.16567353Q, Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca e Investigador Postdoctoral en el laboratorio de Terapia Celular del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca (HUS).

Dra. M^a Dolores Caballero Barrigón, con D.N.I. 15908973A Doctora en Medicina, Profesora Titular en la Universidad de Salamanca (USAL) y Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca (HUS).

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Papel del Estroma Medular en la Mejora de la Función Hematopoyética: Desde la Irradiación hasta las Vesículas Extracelulares” realizado por Dña. Silvia Preciado Pérez bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda optar al grado de Doctora de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firman la siguiente certificación en Salamanca a 5 de Julio de 2019

Dr. F. Sánchez-Guijo

Dra. S. Muntión

Prof^a. M^a D. Caballero

Este proyecto de tesis ha sido financiado por:

- ❖ Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad (expedientes PI12/01775 y PI16/01407)
- ❖ Universidad de Salamanca (Contrato Predoctoral de la Universidad de Salamanca cofinanciada por el Banco de Santander. Convocatoria 2016)
- ❖ Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (expedientes GRS1348/A/19 y GRS1621/A/17)
- ❖ Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (expedientes HUS308U14 y CAS079P17)

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos en las siguientes revistas:

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Luis A. Corchete; Teresa L. Ramos; Ana G. de la Torre; Lika Osugui; Ana Rico; Natalia Espinosa-Lara; Irene Gastaca; María Díez-Campelo; Consuelo del Cañizo; Fermín Sánchez-Guijo. (2019) The Incorporation of Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stromal Cell Into CD34⁺ Cells Increases Their Clonogenic Capacity and Bone Marrow Lodging Ability. *Stem Cells* 2019 (epub 11 June). doi: 10.1002/stem.3032.

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Ana Rico; Luis A. Pérez-Romasanta; Teresa L. Ramos; Rebeca Ortega; Javier Borrajo; Luis A. Corchete; Concepción Rodríguez; María Díez-Campelo; Luis I. Sánchez-Abarca; María Consuelo Del Cañizo; Fermín Sánchez-Guijo. Mesenchymal stromal cell irradiation interferes with the adipogenic/osteogenic differentiation balance improving their hematopoietic-supporting ability. *Biology of blood and marrow transplantation* 2018; 24: 443-451

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Ana Rico; Luis Antonio Corchete; Ana Gómez de la Torre; Teresa L Ramos; Concepción Rodríguez; Rebeca Ortega; Jorge Diego Martín Rufino; Miriam López Parra; Alba Redondo; Lika Osugui; Fermín Sánchez-Guijo. The incorporation of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells into hematopoietic progenitors increase their clonogenic capacity and their engraftment ability. 44th annual meeting for the EBMT. Lisboa, Portugal. 2018. Oral. "**Premio: EBMT BASIC SCIENCE AWARD**".

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Ana Rico; Rebeca Ortega; Luis Antonio Corchete; Concepción Rodríguez; Miriam López-Parra; María Díez-Campelo; Alba Redondo; Fermín Sánchez-Guijo. Low-Dose Irradiation of Mesenchymal Stromal Cell Alters the Adipogenic/Osteogenic Differentiation Capacity Improving their Hematopoietic-Supporting Ability. EHA-SWG Scientific Meeting on Shaping the Future of Mesenchymal Stromal Cells Therapy. Amsterdam, Holanda. 2017. Oral.

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Luis A. Pérez-Romasanta; Ana Rico; Rebeca Ortega; Irena Misiewicz-Krzeminska; Javier Borrajo; Luis A. Corchete; Teresa L. Ramos; Concepción Rodríguez; Miriam López-Parra; Alba Redondo; María Díez-Campelo; Luis I Sánchez-Abarca;

María Consuelo Del Cañizo; Fermín Sánchez-Guijo. Dosis Bajas de Irradiación alteran el Balance en la Diferenciación Osteogénica/Adipogénica de las Células Estromales Mesenquimales, mejorando su Capacidad de Soporte de la Hematopoyesis. LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Málaga, España. 2017. Oral

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Ana Rico; Luis A Corchete; Ana Gómez de la Torre; Teresa L. Ramos; Javier Borrajo; Concepción Rodríguez; Rebeca Ortega; Miriam López-Parra; Alba Redondo; Luis I Sánchez Abarca; María Consuelo Del Cañizo; Fermín Sánchez-Guijo. La incorporación de Vesículas Extracelulares procedentes de Células Mesenquimales a Células Progenitoras Hematopoyéticas favorece su capacidad de Injerto post-trasplante hematopoyético. LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Málaga, España. 2017. Oral

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Ana Rico; Rebeca Ortega; Irena Misiewicz-Kreminska; Luis Alberto Pérez-Romasanta; Javier Borrajo-Sánchez; Teresa Lopes Ramos; Luis Antonio Corchete; Concepción Rodríguez; María Díez-Campelo; Miriam López-Parra; Alba Redondo; Luis Ignacio Sánchez-Abarca; Del Cañizo María Consuelo; Sánchez-Guijo Fermín. Mesenchymal stromal cell irradiation interferes with the adipogenic/osteogenic differentiation balance improving their hematopoietic-supporting ability. 22nd Congress of European Hematology Association. Madrid, España. 2017. Póster

Silvia Preciado; Sandra Muntión; Luis-Alberto Pérez Romasanta; Luis Antonio Corchete; Teresa Lopes Ramos; Rebeca Ortega; Concepción Rodriguez Serrano; Alba Redondo; Luis Ignacio Sánchez-Abarca; Fermín Sánchez-Guijo; Consuelo Del Cañizo. Análisis Multiparamétrico del Efecto de la Irradiación sobre las células Mesenquimales de Médula Ósea. LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, XXXI de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. Valencia, España. 2015. Póster

Abreviaturas

AAD: Amino-Actinomicina-D

ALIX: *Programmed Cell death 6-interacting protein*

ALP: Fosfatasa Alcalina

ANGPT: Angiopoyetina

APC: Aloficocianina

BMEC: Células Endoteliales Sinusoidales de Médula Ósea

BM-MSC: Células Estromales Mesenquimales de Médula Ósea

CASP: Caspasas

CEBPA: *Enhancer Binding Protein Alpha*

Células CAR: *CXCL12 Abundant Reticular Cells*

CFU-E: Unidad Formadora de Colonias Eritroides

CFU-F: Unidad Formadora de Colonias de aspecto Fibroblástico

CFU-G: Unidad Formadora de Colonias Granulocíticas

CFU-GM: Unidad Formadora de Colonias Granulo-monocíticas

CFU-M: Unidad Formadora de Colonias Monocíticas

CFU-Meg: Unidad Formadora de Colonias Megacariocíticas

Células NK: *Células Natural Killer*

CMF: Citometría de Flujo

COL1A1: *Collagen Type I Alpha 1 Chain*

CXCR4: Receptor 4 de Quimiocinas

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

DDR: Respuesta al daño en el DNA

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EICR: Enfermedad Injerto contra Receptor

ESCRT: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*

FDA: *Food and Drug Administration*

FITC: Fluoresceína-5-Isocianato

FPS: Figuras por Segundo

G-CSF: Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias GranuloMonocíticas

GSK3: Glucógeno Sintasa Kinasa 3

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HLA: Complejo Mayor de Histocompatibilidad en Humanos

HSC: Célula *Stem* hematopoyética

HPC: Célula Progenitora Hematopoyética

HRP: Peroxidasa de Rábano Picante

HSP: Proteínas de Choque Térmico

ICT: Irradiación Corporal Total

IDO: Indoleamina 2,3-Dioxigenasa

ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares

IL-1: Interleucina 1

IL-3: Interleucina 3

IL3RA: Subunidad alfa del receptor 3 de la Interleucina

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-11: Interleucina 11

IFN γ : Interferón Gamma

IMDM: *Iscove's Modified Duplecco's*

IRR-MSC-VE: Vesículas Extracelulares liberadas por Células Estromales Mesenquimales Irradiadas

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular

ITGA-4: Integrina $\alpha 4\beta 1$

M-CSF: Factor Estimulante de Colonias Monocíticas

MCLP: Medio de cultivo a largo plazo

MET: Microscopio Electrónico de Transmisión

MHC I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad-1

MHC II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad-2

MNC: Células Mononucleadas

MO: Médula Osea

MSC: Célula Estromal Mesenquimal

MSC-VE: Vesículas Extracelulares liberadas por Células Estromales Mesenquimales

NBT/BCIP: *4-Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate Solution*

NGF: *Nerve Growth Factor*

NRP1: Neuropilina-1

NTA: *Nanoparticle Tracking Analyses*

NO: Óxido Nítrico

NOD SCID: *Non Obese diabetic Severe Combined Immunodeficiency*

OPG: Osteoprotegerina

PBS: Tampón Fosfato Salino

PDH: Piruvato Deshidrogenasa

PDK-1: Piruvato Deshidrogenasa Kinasa-1

PE: Ficoeritrina

PerCPCy5.5: Proteína Peridinin Clorofílica cianina

PGE₂: Prostaglandina E₂

PPARG: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*

PTH: Hormona paratiroidea

PVDF: *Polivinildenedifloride*

RANKL: Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear NF- κ B

RMA: *Robust Multi-array Average*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RUNX2: *Runt Related Transcription Factor 2*

SAM: *Significance Analysis of Microarrays*

SBF: Suero Bovino Fetal

SCF: Factor de Célula *Stem*

SDF-1: Factor derivado del estroma 1

SDS: Dodecil Sulfato Sódico

SNO: *Spindle-shaped N-cadherin Osteoblasts*

SP: Sangre Periférica

SPARC: Osteonectina

SPP1: Osteopontina

STAT: *Signal Transducer And Activator Of Transcription*

TGF β 1: *Transforming Growth Factor β 1*

THPO: Trombopoyetina

TIE-2: *Tyrosine Kinase With Immunoglobulin Like And EGF Like Domains 2*

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TPH: Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

TSG101: Proteína celular tumoral humana susceptible al gen 101

VCAM-1: Molécula de Adhesión a Célula Endotelial

VE: Vesículas Extracelulares

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema de la organización jerarquizada del sistema hematopoyético
- Figura 2.** Moléculas clave en el nicho osteoblástico
- Figura 3.** Nichos hematopoyéticos en la MO
- Figura 4.** Actividad inmunomoduladora de las MSC
- Figura 5.** Formación de VE en las MSC
- Figura 6.** Representación esquemática de la composición de una vesícula extracelular
- Figura 8.** Aislamiento y expansión de MSC.
- Figura 9.** Esquema de los estudios de inducción de la diferenciación en MSC.
- Figura 10.** Esquema de cultivos a largo plazo
- Figura 11.** Aislamiento de células CD34⁺ mediante AutoMACS
- Figura 12.** Esquema de aislamiento de VE de MSC
- Figura 13.** Esquema de co-cultivo de células CD34⁺ con MSC-VE
- Figura 14.** Esquema del estudio de xenotrasplante hematopoyético en modelo murino
- Figura 15.** Inyección de células via intraósea
- Figura 16.** Imágenes de la expansión de MSC control y MSC irradiadas
- Figura 17.** Caracterización inmunofenotípica de las MSC control e irradiadas
- Figura 18.** Estudio de viabilidad en MSC control e irradiadas
- Figura 19.** *Heatmap* de los 50 genes alterados más significativos en MSC irradiadas
- Figura 20.** Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en MSC control vs MSC irradiadas
- Figura 21.** Cuantificación de la liberación de SDF-1 al sobrenadante por parte de MSC control vs MSC irradiadas
- Figura 22.** Diferenciación multilineal de las MSC
- Figura 23.** Cuantificación de adipocitos a lo largo del proceso de diferenciación en MSC control vs MSC irradiadas
- Figura 24.** Análisis de la expresión de genes implicados en diferenciación en MSC control vs MSC irradiadas.
- Figura 25.** Análisis del grado de mineralización de MSC control vs MSC irradiadas
- Figura 26.** Análisis de la pureza de las células CD34⁺.
- Figura 27.** Capacidad de MSC control vs MSC irradiadas para mantener la hematopoyesis en cultivos a largo plazo
- Figura 28.** Cuantificación de adipocitos durante 5 semanas en el estroma formado en cultivos a largo plazo
- Figura 29.** Expresión de genes implicados en diferenciación en estromas de cultivos a largo
- Figura 30.** Grado de mineralización de estromas de cultivos a largo plazo
- Figura 31.** Cuantificación de partículas mediante Nanosight
- Figura 32.** Imágenes representativas de VE tomadas por microscopía electrónica de transmisión
- Figura 33.** Imágenes representativas de la caracterización mediante citometría de flujo de VE obtenidas de MSC no irradiadas y MSC irradiadas
- Figura 34.** Expresión de CD63 en VE de MSC
- Figura 35.** *Heatmap* de los 19 micro-RNAs que presentan cambios de expresión estadísticamente significativos entre MSC-VE e IRR-MS-VE
- Figura 36.** Análisis de la pureza de las células CD34⁺
- Figura 37.** Análisis de la incorporación de VE por células CD34⁺ mediante citometría de flujo
- Figura 38.** Análisis de la incorporación de VE por células CD34⁺ mediante microscopía confocal
- Figura 39.** Análisis de expresión de micro-RNAs en células CD34⁺ que han incorporado VE mediante RT-PCR
- Figura 40.** Análisis de expresión de micro-RNAs en células CD34⁺ que han incorporado VE mediante RT-PCR
- Figura 41.** Perfil de expresión génica células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporado IRR-MS-VE

- Figura 42.** Vías alteradas en células CD34⁺+MSC-VE vs células CD34⁺ solas
- Figura 43.** Vías alteradas en células CD34⁺+IRR-MSC-VE vs células CD34⁺ solas
- Figura 44.** Vías alteradas en células CD34⁺+IRR-MSC-VE vs células CD34⁺+MSC-VE
- Figura 45.** Estudio de viabilidad en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporado IRR-MSC-VE
- Figura 46.** Estudio de activación de caspasas en células CD34⁺ solas y células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE
- Figura 47.** Análisis de la fosforilación de STAT 5 mediante Wes Simple en células CD34⁺ solas y células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE
- Figura 48.** Análisis de proliferación de células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporado IRR-MSC-VE
- Figura 49.** Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE mediante RT-PCR
- Figura 50.** Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE mediante citometría de flujo
- Figura 51.** Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE mediante WES simple
- Figura 52.** Análisis de la capacidad clonogénica de células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE
- Figura 53.** Análisis del injerto de células CD34⁺ humanas solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporado IRR-MSC-VE en ratones NOD/SCID
- Figura 54.** Análisis del injerto de distintas subpoblaciones de células hematopoyéticas humanas en ratones NOD/SCID
- Figura 55.** Cuantificación de partículas mediante Nanosight
- Figura 56.** Análisis de la incorporación de VE por células CD34⁺ mediante citometría de flujo
- Figura 57.** Estudio de viabilidad en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3x10⁶MCS y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9x10⁶MCS
- Figura 58.** Análisis de la expresión de proteínas implicadas en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3x10⁶MCS y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9x10⁶MCS mediante citometría de flujo
- Figura 59.** Análisis de la capacidad clonogénica de células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3x10⁶MCS y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9x10⁶MCS
- Figura 60.** Análisis del injerto de células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3x10⁶MCS y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9x10⁶MCS en ratones NOD/SCID

Lista de Tablas

- Tabla 1.** Características de los donantes de las muestras empleadas
- Tabla 2.** *Primers* empleados para el estudio de micro-RNAs mediante RT-PCR.
- Tabla 3.** Nombre, Fold Change y q-valor de los 50 genes alterados más significativos en MSC irradiadas con una dosis de 2,5Gy con respecto a MSC control en el estudio de arrays de expresión
- Tabla 4.** Listado de micro-RNAs cuyo Fold Change es >1,5
- Tabla 5.** Listado de micro-RNAs más expresados en MSC-VE
- Tabla 6.** Listado de vías alteradas en células CD34⁺MSC-VE vs células CD34⁺ basales ordenadas según p-valor ajustado y listado de genes alterados en cada vía
- Tabla 7.** Listado de vías alteradas en células CD34⁺IRR-MSC-VE vs células CD34⁺ basales ordenadas según pvalor ajustado y listado de genes alterados en cada vía
- Tabla 8.** Listado de vías alteradas en células CD34⁺IRR-MSC-VE vs células CD34⁺MSC-VE ordenadas según pvalor ajustado y listado de genes alterados en cada vía
- Tabla 9.** Listado de los micro-RNAs más expresados en VE y sus posibles genes diana de entre los genes que se encuentran infra-expresados en las células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE en el array, analizado mediante mirPath

Lista de Anexos

- Anexo 1.** Metodología para el marcaje de células para estudios de citometría de flujo y listado de los anticuerpos monoclonales empleados.
- Anexo 2.** Metodología para la extracción, purificación y cuantificación de RNA.
- Anexo 3.** Metodología para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR y listado de los *primers* empleados.
- Anexo 4.** Listados de genes sobre-expresados e infra-expresados en las comparaciones del perfil de expresión génica entre las diferentes condiciones de células CD34⁺.
- Anexo 5.** **Publicación nº1.** Mesenchymal Stromal Cell Irradiation Interferes with the Adipogenic/Osteogenic Differentiation Balance and Improves Their Hematopoietic-Supporting Ability. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018
- Anexo 6.** **Publicación nº2.** The Incorporation of Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stromal Cells Into CD34⁺ Cells Increases Their Clonogenic Capacity and Bone Marrow Lodging Ability. *Stem Cells*. 2019

Índice

1. Introducción	1
1. Célula Stem hematopoyética y hematopoyesis	3
2. Micromedioambiente Medular o Nicho Hematopoyético.....	5
3. Células Estromales Mesenquimales.....	10
4. Vesículas Extracelulares	13
5. Trasplante Hematopoyético.....	16
5.1. Tipos de trasplante hematopoyético.....	18
5.2. Acondicionamiento	20
5.3. Efectos del acondicionamiento sobre el sistema hematopoyético.....	22
5.4. Efectos del acondicionamiento sobre el estroma.....	23
5.5. Complicaciones tras el trasplante alogénico	24
6. Papel de MSC y MSC-VE en trasplante	26
2. Hipótesis	31
3. Objetivos	35
4. Material y Métodos	39
1. Materiales.....	41
1.1. Células y animales	41
2. Métodos	42
2.1. Células Estromales Mesenquimales de Médula Ósea (BM-MSc)	43
2.1.1. Aislamiento y expansión de BM-MSc.....	43
2.1.2. Irradiación de BM-MSc	44
2.1.3. Caracterización inmunofenotípica de BM-MSc	45
2.1.4. Estudio de la apoptosis en BM-MSc.....	46
2.1.5. Análisis del Perfil de Expresión Génica de BM-MSc mediante Chip Human Gene ST Arrays.....	47
2.1.6. Análisis de expresión génica de moléculas implicadas en hematopoyesis en BM-MSc mediante RT-PCR	48
2.1.7. Análisis de SDF-1 mediante ELISA en BM-MSc	48
2.1.8. Análisis de la diferenciación de BM-MSc	49
2.1.8.1. Diferenciación Osteogénica	50
2.1.8.2. Diferenciación Adipocítica	51
2.1.9. Análisis de la capacidad de soporte de la hematopoyesis de las BM-MSc mediante Cultivos a Largo Plazo	52
2.2. Aislamiento y Caracterización de células CD34 ⁺	55

2.2.1.	Aislamiento y Caracterización de células CD34 ⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada	55
2.2.2.	Aislamiento y Caracterización de células CD34 ⁺ aisladas a partir de cordón Umbilical	57
2.3.	Vesículas Extracelulares (VE)	58
2.3.1.	Aislamiento de VE de BM-MSC.....	58
2.3.2.	Caracterización de VE	60
2.3.2.1.	Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	60
2.3.2.2.	Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).....	60
2.3.2.3.	Citometría de Flujo (CMF)	61
2.3.2.4.	Western blot (Wb).....	62
2.4.	Incorporación de VE a células CD34 ⁺	65
2.4.1.	Análisis del Perfil de Expresión Génica de células CD34 ⁺ mediante Chip Human Gene ST Arrays.....	69
2.4.2.	Análisis de expresión de micro-RNAs en células CD34 ⁺ mediante RT-PCR	70
2.4.3.	Estudio de la Apoptosis en células CD34 ⁺	72
2.4.4.	Estudio de la activación de Caspasas en células CD34 ⁺	72
2.4.5.	Estudio de la fosforilación de STAT5 en células CD34 ⁺ mediante Western blot.....	73
2.4.6.	Análisis de ciclo celular en células CD34 ⁺	74
2.4.7.	Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34 ⁺ mediante RT-PCR	74
2.4.8.	Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34 ⁺ mediante CMF	74
2.4.9.	Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34 ⁺ mediante Western blot	75
2.4.10.	Ensayos de Formación de Colonias en células CD34 ⁺	76
2.4.11.	Modelo Murino de Xenotrasplante hematopoyético	77
2.5.	Análisis Estadístico.....	81
5.	Resultados	83
Capítulo 1	85
1.	Célula Estromales Mesenquimales de Médula Ósea (BM-MSC).....	87
1.1.	Aislamiento y expansión de MSC control e irradiadas	87
1.2.	Caracterización inmunofenotípica de MSC control e irradiadas	87
1.3.	Viabilidad en MSC irradiadas vs MSC control	88
1.4.	Perfil de expresión génica de MSC irradiadas vs MSC control	89
1.5.	Análisis de expresión de genes implicados en hematopoyesis en MSC irradiadas vs MSC control.	92
1.6.	Capacidad de diferenciación de las MSC irradiadas vs MSC control.....	93
1.7.	Capacidad de soporte de la hematopoyesis de MSC irradiadas vs MSC control	97

Capítulo 2.....	103
1. Aislamiento y caracterización de VE procedentes de MSC control y MSC irradiadas	105
1.1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	105
1.2. Microscopio Electrónico de transmisión (MET).....	106
1.3. Citometría de Flujo (CMF).....	106
1.4. Western blot (Wb)	108
1.5. Análisis de expresión de micro-RNAs en IRR-MSC-VE vs MSC-VE.....	108
2. Aislamiento y caracterización de progenitores hematopoyéticos de SP movilizada y cordón umbilical.....	111
3. Incorporación de MSC-VE e IRR-MSC-VE a células CD34⁺	112
3.1. Análisis mediante Citometría de Flujo.....	112
3.2. Análisis mediante Inmunofluorescencia	113
3.3. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de micro-RNAs.....	114
3.4. Perfil de expresión génica.....	116
3.4.1. Análisis Comparativo entre células CD34 ⁺ basales y células CD34 ⁺ + MSC-VE.....	117
3.4.2. Análisis Comparativo entre células CD34 ⁺ basales y células CD34 ⁺ + IRR-MSC-VE.....	119
3.4.3. Análisis Comparativo entre células CD34 ⁺ + MSC-VE y células CD34 ⁺ + IRR-MSC-VE.....	121
3.5. Relación de micro-RNAs mas expresados en MSC-VE con genes infra-expresados en células CD34 ⁺ tras la incorporación de MSC-VE.....	123
3.6. Viabilidad de células CD34 ⁺ que han incorporado VE vs células CD34 ⁺ basales.....	125
3.7. Activación de Caspasas en células CD34 ⁺ que han incorporado MSC-VE vs células CD34 ⁺ solas.....	126
3.8. Fosforilación de STAT 5 en células CD34 ⁺ que han incorporado MSC-VE vs células CD34 ⁺ basales.....	127
3.9. Capacidad proliferativa de células CD34 ⁺ que han incorporado VE vs células CD34 ⁺ basales.....	128
3.10. Análisis de expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34 ⁺ que han incorporado VE vs células CD34 ⁺ solas.....	129
3.11. Capacidad clonogénica de células CD34 ⁺ que han incorporado VE vs células CD34 ⁺ basales.....	131
3.12. Modelo murino	132
Capítulo 3.....	137
1. Caracterización de VE aisladas a partir de distintas dosis de MSC mediante NTA	139
2. Aislamiento y caracterización de progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical	140
3. Incorporación de dosis variables de MSC-VE a células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical.....	140
3.1. Análisis de la incorporación mediante citometría de flujo.....	140
3.2. Papel de la dosis de MSC-VE en la viabilidad de células CD34 ⁺	141

3.3. Estudio de la influencia de la dosis de MSC-VE en la expresión de moléculas relacionadas con la hematopoyesis en células CD34 ⁺ mediante Citometría de Flujo	142
3.4. Influencia de la dosis de MSC-VE en la capacidad clonogénica de células CD34 ⁺	144
3.5. Papel de la dosis de MSC-VE en la capacidad de injerto de las células CD34 ⁺ en ratones NOD-SCID	145
6. Discusión	149
Mención Internacional	165
7. Conclusions	167
Abstract.....	173
Bibliografía	183
Anexos	199

1. Introducción

1. Célula *Stem* hematopoyética y hematopoyesis

Las células *stem* se definen como células indiferenciadas capaces de dividirse, de auto-renovarse y de generar progenies funcionales de células especializadas¹. Su función biológica es la de mantener la homeostasis de los tejidos, renovando las poblaciones de células maduras y responder a situaciones de estrés reparando el daño tisular a lo largo de la vida del individuo². La célula *stem* hematopoyética (HSC), es el prototipo de célula *stem* multipotente presente en tejidos adultos. Fue la primera en describirse y es la mejor caracterizada debido a su fácil accesibilidad. Se localizan en una baja proporción (0.1%) en la médula ósea (MO) de individuos adultos y además están presentes en la sangre del cordón umbilical. Fueron Till y McCulloch en 1960 los que describieron inicialmente estas células y sus principales características³⁻⁶. Normalmente, la mayoría de las HSC permanecen en un estado quiescente en la MO con el fin de mantener un *pool* suficiente para abastecer de células sanguíneas maduras al individuo a lo largo de toda su vida y también con el fin de no acumular mutaciones asociadas a la replicación celular⁷. En condiciones de estrés, como pueden ser un sangrado abundante, una infección o un tratamiento quimioterápico que reduzca el número células sanguíneas adultas en sangre, las HSC abandonan su estado quiescente, se expanden y se diferencian rápidamente con el fin de regenerar la hematopoyesis⁸.

Las células maduras hematopoyéticas tienen una vida media muy corta por lo que su producción es constante. En el esquema típico de diferenciación jerárquica de la hematopoyesis, las HSC se sitúan en la posición más alta y dan lugar a diversos tipos de células hematopoyéticas en diferentes estados del proceso de diferenciación, más comprometidos a un determinado linaje y con menor capacidad de auto-renovación cuanto más abajo se sitúan en el esquema⁴. Se pueden distinguir tres tipos principales de células según su estado y su capacidad de diferenciación: las HSC, las HPC (células progenitoras hematopoyéticas) y las células maduras. Las HSC son células multipotentes y se caracterizan por la ausencia de marcadores de membrana específicos de los distintos linajes hematopoyéticos y la expresión de algunos marcadores de membrana como el CD34. Se puede emplear además la exclusión de células positivas para CD38 y CD45RA, marcadores de células más diferenciadas^{9, 10}.

Las HPC pueden ser multipotentes, oligopotentes o restringidas a un solo linaje hematopoyético. Las HPC oligopotentes, más comprometidas que las anteriores, representan una división en la jerarquía separándose en progenitores linfoides que darán lugar a los linfocitos B y T, células dendríticas y células NK maduras¹¹ y progenitores mieloides que darán lugar a eritrocitos, granulocitos, megacariocitos y macrófagos maduros¹² (**Figura 1**).

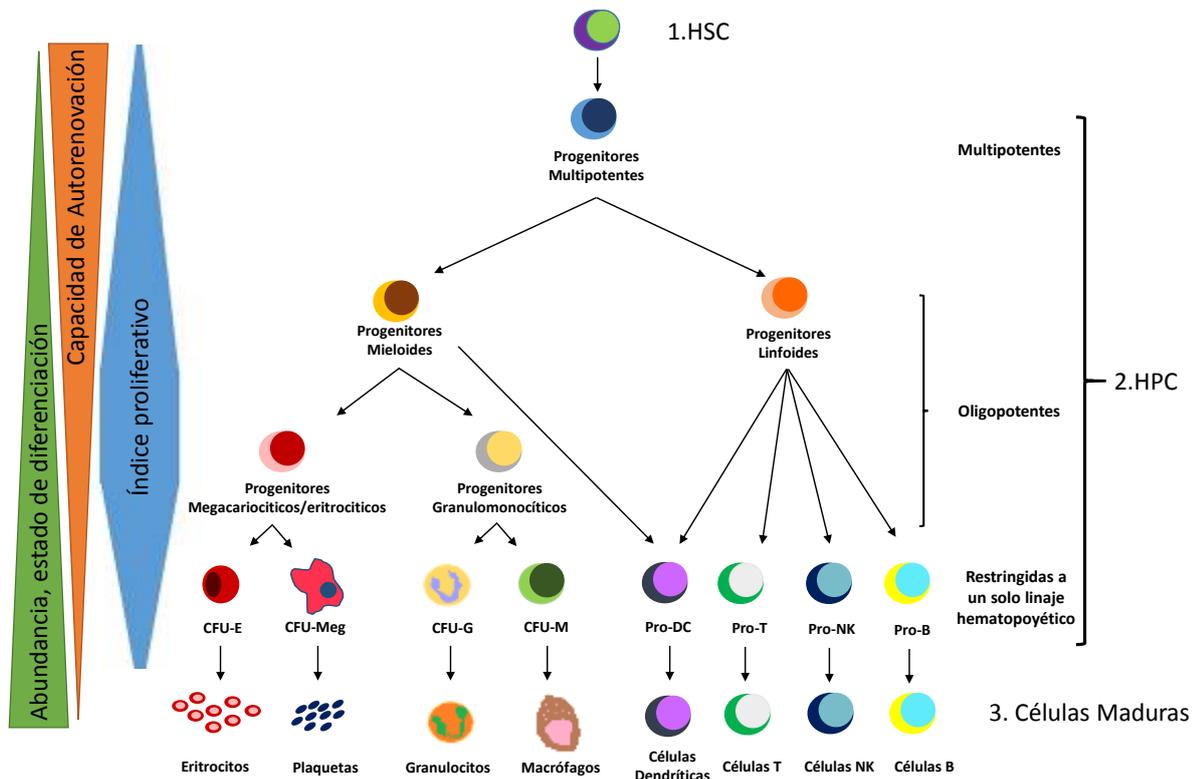


Figura 1. Esquema de la organización jerarquizada del sistema hematopoyético. HSC: Célula *stem* hematopoyética; HPC: Célula progenitora hematopoyética; CFU-E: Unidad formadora de colonias eritroides; CFU-Meg: Unidad formadora de colonias Megacariocíticas; CFU-G: Unidad formadora de colonias granulocíticas; CFU-M: Unidad formadora de colonias monocíticas; Células NK: Células *Natural Killer*.

El proceso de regulación de la hematopoyesis es muy complejo. En él intervienen tanto mecanismos regulatorios intrínsecos (factores de transcripción, genes, regulación epigenética, etc) como extrínsecos o señales procedentes del medio que les rodea, entre los que juegan un papel importante el nicho hematopoyético y las citocinas¹³.

2. Micromedioambiente Medular o Nicho Hematopoyético

En 1978, Schoefield propuso por primera vez que las HSC se situaban en un sitio anatómico específico en la MO, al que denominó nicho hematopoyético en el cual, las HSC estaban asociadas fuertemente a otros tipos celulares que, además de retenerlas y protegerlas, podrían tener influencia en su comportamiento¹⁴.

Se denomina micromedioambiente medular al conjunto de todos los elementos que conforman la MO. Se ha demostrado en múltiples estudios que el intercambio de información entre las HSC y el micromedioambiente es clave para el funcionamiento normal de la hematopoyesis. Las funciones del nicho hematopoyético son principalmente tres: el anidamiento o *homing* de las HSC, el mantenimiento de la HSC en estado quiescente y la regulación de su diferenciación hacia los diferentes linajes hematopoyéticos⁶. La interacción célula-célula, mediada por la expresión de moléculas de adhesión y sus ligandos y por citocinas y sus ligandos permite la regulación de los procesos de auto-renovación, diferenciación y proliferación de las HSC.

Desde el punto de vista anatómico se pueden distinguir dos nichos hematopoyéticos en la MO, diferentes en su estructura y localización y en su composición celular y función: el nicho osteoblástico y el nicho vascular^{15, 16} (**Figura 3**).

El nicho osteoblástico se sitúa en zonas cercanas a la superficie del hueso o cerca del endostio en zonas de hueso trabecular y alberga las HSC más inmaduras e indiferenciadas. Su función principal es la de mantener las HSC en un estado quiescente, es decir, mantener el pool de HSC¹⁷. Las células de linaje osteoblástico son el componente principal de este nicho, principalmente osteoblastos maduros aunque también forman parte de este nicho células más inmaduras como los pre-osteoblastos o las células estromales mesenquimales (MSC), y también osteocitos, osteoclastos, células endoteliales, megacariocitos, células del sistema nervioso y componentes de la matriz extracelular⁶. La primera evidencia de que las células implicadas en la formación de hueso tenían también una función clave en la hematopoyesis fue publicada en 1998 por Taichman R. que describió como una línea de osteoblastos humanos secretaban citocinas que promovían la proliferación de células hematopoyéticas

CD34⁺ en cultivo, entre ellas, el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), el factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), el factor estimulante de colonias monocíticas (M-CSF), las interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) y 7 (IL-7), la osteoprotegerina (OPG), el ligando del receptor activador del factor nuclear NF- κ B (RANKL), el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)^{18, 19}. Además de estas citocinas, los osteoblastos expresan el factor derivado del estroma 1 (SDF-1), una citocina clave en el anidamiento y mantenimiento de las HSC en estado quiescente cuyo receptor, Receptor 4 de quimiocinas (CXCR4), se expresa en las células hematopoyéticas²⁰. Otro de los factores clave secretados por las células de linaje osteoblástico es la osteopontina (SPP1) que, entre otras funciones, inhibe la proliferación de las HSC^{21, 22}.

Una de las poblaciones celulares más importantes del nicho osteoblástico son los *Spindle-shaped N-cadherin osteoblasts* (SNO), una subpoblación de osteoblastos que expresa altos niveles de N-cadherina. La N-cadherina se expresa tanto en HSC como en los SNO²³, es una molécula clave para establecer el contacto directo osteoblasto-HSC y esta interacción parece tener importancia en la retención de las HSC. Además, *Tyrosine Kinase With Immunoglobulin Like And EGF Like Domains 2* (TIE2), expresada por las HSC, se activa mediante Angiopoyetina 1 (ANGPT-1) que es secretada por los osteoblastos e induce la sobre-expresión de N-cadherina en las HSC. La interacción ANG1-TIE2 inhibe la proliferación de las HSC y las mantiene en estado quiescente²⁴. También es importante la secreción de trombopoyetina (THPO) por parte de los osteoblastos, implicada en la quiescencia de las HSC mediante de las señales recibidas a través de sus receptores Mpl²⁵.

Otras moléculas de gran importancia en la regulación de la hematopoyesis por parte de los osteoblastos son el ligando de Notch, Jagged 1²⁶ y el Factor de Célula *Stem* (SCF) que puede estar unido a membrana o ser secretado. SCF se une y activa al receptor KIT expresado en las HSC, es un estimulador potente de la adhesión de las HSC y HPC a las células del estroma ya que es capaz de activar además algunas integrinas presentes en el nicho²⁷.

Se observó en un estudio que en ratones a los que se les había mutado *Runt Related Transcription Factor 2* (RUNX2), factor de transcripción característico de osteoblastos inmaduros, la hematopoyesis se veía alterada y había un aumento de hematopoyesis

extramedular²⁸. No ocurría lo mismo cuando se empleaba el promotor de la osteocalcina para causar la ablación de los osteoblastos. La osteocalcina está presente en osteoblastos más maduros y en este caso la alteración en la hematopoyesis no era tan evidente²⁹. Por ello, se piensa que dentro de la población de osteoblastos, son los más inmaduros los que están más implicados en la regulación de las HSC, mientras que los osteoblastos más maduros podrían tener un efecto indirecto sobre la hematopoyesis³⁰.

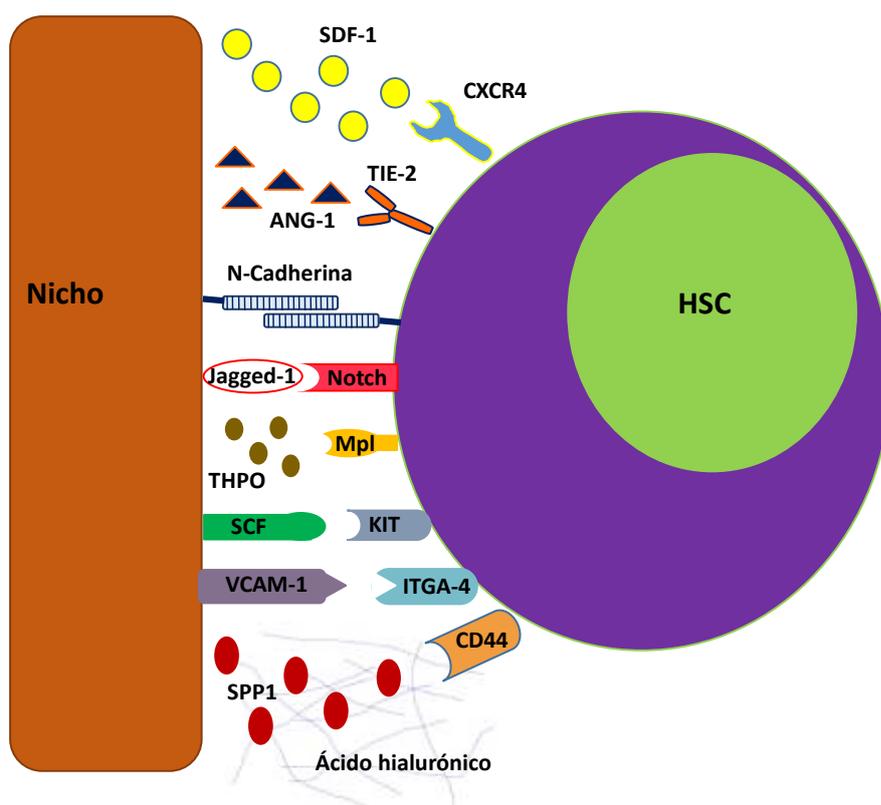


Figura 2. Moléculas clave en el nicho osteoblástico. Representación de los receptores y ligandos más importantes para la comunicación entre las HSC y las células que conforman el nicho osteoblástico. HSC: Célula *stem* hematopoyética; SDF-1: Factor derivado del estroma 1; CXCR4: Receptor 4 de Quimiocinas; ANGPT-1: Angiopoyetina 1; THPO: Trombopoyetina; SCF: Factor de célula *Stem*; VCAM-1: Molécula de adhesión a célula endotelial; ITGA-4: Integrina $\alpha4\beta1$; SPP1: Osteopontina.

Otro factor regulador clave en el nicho osteoblástico es la concentración de calcio. Debido a que la remodelación del hueso, en la que participan activamente los osteoclastos, tiene lugar en el endostio, las concentraciones de calcio son mayores en esta región del hueso

que en la zona central. Las altas concentraciones de calcio son esenciales para que las HSC se adhieran al nicho y facilitan las uniones mediante N-cadherinas³¹. Finalmente, también influye la concentración de oxígeno, que en el nicho osteoblástico es muy baja. Este hecho también contribuye el mantenimiento de las HSC en un estado quiescente³².

Por otro lado, el nicho vascular, se sitúa en zonas mediales de la MO, cerca de los vasos donde abundan células endoteliales que forman los sinusoides de la médula ósea (BMECs). Estas células expresan de forma constitutiva citocinas como SDF-1 (CXCL12) y moléculas de adhesión como E-selectina y la molécula de adhesión a célula endotelial-1 (VCAM1) que son importantes para la movilización, el *homing* y el injerto de las HSC^{33, 34}. Además de las BMEC, hay varios tipos de MSC que regulan el nicho vascular. Se ha visto que una población de MSC-Nestina⁺ colocaliza con HSC en zonas cercanas a los sinusoides y que contribuyen al mantenimiento las HSC³⁵, otras MSC que expresan CXCL12 de forma abundante, denominadas *CXCL12 Abundant Reticular (CAR) Cells* se encuentran tanto en el nicho osteoblástico como en el nicho vascular, aceleran la proliferación de las HSC y las mantienen en un estado indiferenciado²⁰. También están presentes otros tipos celulares en el nicho vascular, como monocitos y macrófagos³⁶, megacariocitos, células reticulares y células del sistema nervioso.

El papel fundamental de este nicho es el de la movilización y la iniciación de la diferenciación de las HSC. Las células en estado quiescente alojadas en el nicho osteoblástico migran hacia las zonas centrales del hueso, hacia nicho vascular, desde el que pueden salir al torrente sanguíneo para mantener la homeostasis o en diversas situaciones de estrés³⁷.

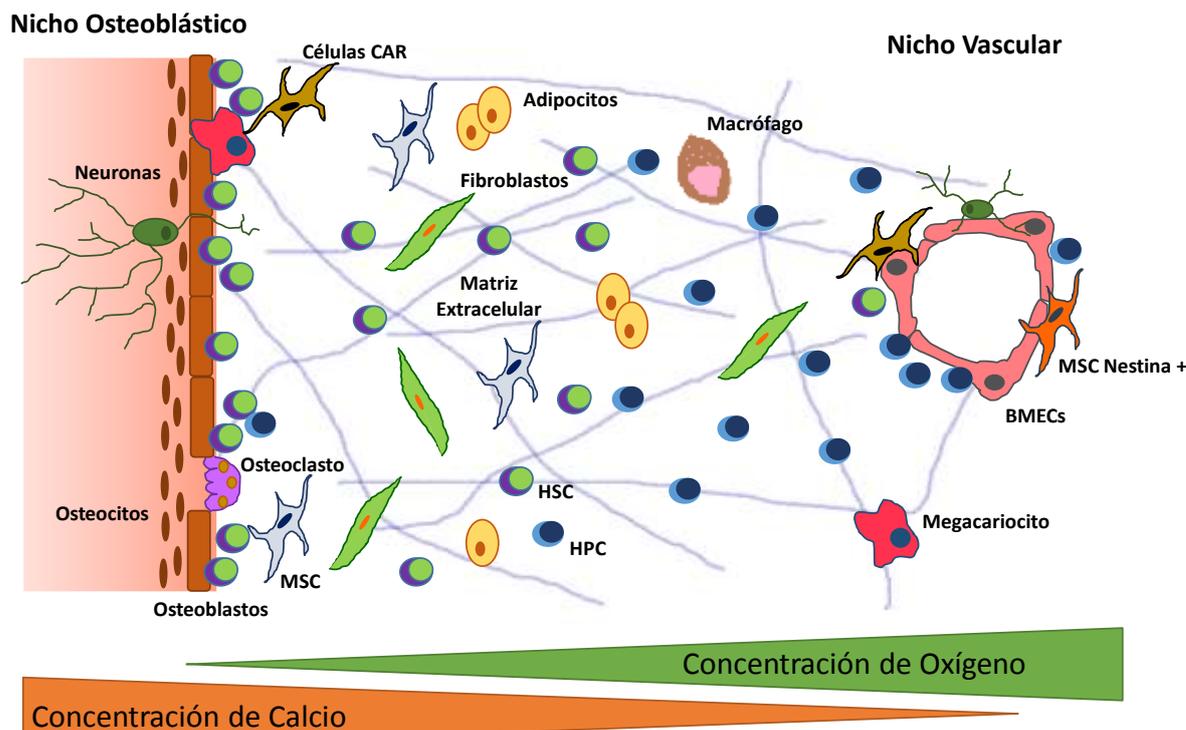


Figura 3. Nichos hematopoyéticos en la MO. El micromedioambiente de la MO está formado por varias poblaciones celulares y diversos componentes no celulares que contribuyen al mantenimiento de la hematopoyesis. Se pueden diferenciar un nicho osteoblástico y un nicho vascular. HSC: Célula *Stem* Hematopoyética; HPC: Célula Progenitora Hematopoyética; MSC: Célula Estromal Mesenquimal.

De cualquier manera, los dos nichos están interrelacionados para conseguir un control perfecto del balance quiescencia, auto-renovación y diferenciación de las HSC y el mantenimiento de un número determinado de HSC y HPC con el fin de mantener la homeostasis y responder a diferentes tipos de estrés.

Aunque, como se ha descrito, los nichos son diferentes, también presentan elementos en común que permiten su integración y un funcionamiento conjunto, como son las propias HSC y HPC, células de soporte entre las que se encuentran células reticulares, fibroblastos y MSC, células musculares y nerviosas, vasos sanguíneos y algunos elementos no celulares como los que forman la matriz extracelular. La matriz extracelular es una red compleja compuesta por distintas macromoléculas como glicosaminoglicanos, fibronectina, laminina, colágeno I y IV, ácido hialurónico, osteopontina, entre otras³⁸. Las moléculas de la matriz extracelular, interactúan con las HSC participando también en su regulación. La osteopontina, secretada

por los osteoblastos, interacciona con el receptor CD44 e integrinas presentes en las HSC. CD44 también interacciona con el ácido hialurónico presente en la matriz extracelular³⁹.

La MO adulta, contiene también adipocitos. Hasta hace unos años, se pensaba que el único papel de los adipocitos era rellenar espacios en la MO. Sin embargo, los adipocitos son también miembros activos del micromedioambiente medular. Actúan como reguladores negativos de la hematopoyesis. De hecho, el número de adipocitos correlaciona inversamente con la actividad hematopoyética de la MO⁴⁰. *In vitro*, se ha demostrado que bloquean la granulopoyesis inhibiendo la liberación de G-CSF por parte de los macrófagos mediante la expresión de Neuropilina-1 (NRP1)⁴¹. Además, secretan *Transforming Growth Factor* β 1 (TGF β 1), de manera independiente a la expresión de NRP1. TGF β 1 es un conocido inhibidor de la hematopoyesis⁴².

3. Células Estromales Mesenquimales

Una gran parte de las células que conforman el micromedioambiente hematopoyético derivan de las células *stem* mesenquimales o células estromales mesenquimales (MSC)⁴³. Las MSC se caracterizan por ser una población heterogénea de células multipotentes de aspecto fibroblástico y de origen no hematopoyético presente en un bajo porcentaje en MO (0,001%)⁴⁴. Fueron descritas por primera vez por Friedenstein y colaboradores hace más de 40 años, demostraron que una pequeña proporción de células de MO eran capaces de adherirse a la superficie de frascos de cultivo y formar colonias de aspecto fibroblástico, cuando se cultivaban a baja densidad, que denominaron CFU-F⁴⁵. Además, estas células eran capaces de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* a osteoblastos, condrocitos y adipocitos⁴⁶.

Las MSC, además de dar lugar a diferentes células del micromedioambiente hematopoyético, forman parte de este y tienen un papel principal en el mantenimiento de la hematopoyesis a través de diferentes mecanismos como son el contacto celular, la secreción de citocinas y factores de crecimiento (SDF-1, SCF, ANGPT1, IL-7, VCAM, SPP1) o la producción de moléculas que forman la matriz extracelular como son, entre otros, la fibronectina, lamininina, colágeno y proteoglicanos^{35, 47}. Las MSC humanas pueden aislarse tanto de tejidos

fetales (cordón umbilical, líquido amniótico) como de tejidos adultos. Las fuentes de obtención de MSC más habituales son la MO y el tejido adiposo, debido a su fácil accesibilidad, aunque también se han aislado de otros muchos tejidos como pulpa dental⁴⁸, gelatina de Wharton del cordón umbilical, placenta, líquido sinovial, etc⁴⁹.

Debido a la falta de marcadores específicos para su identificación, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció unos criterios mínimos para definir una MSC basados en estas tres premisas: 1. Capacidad de adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo *in vitro*; 2. Expresión de CD73, CD90 y CD105 y la ausencia de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD19 o CD79 α y HLA-DR; 3. Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, condrocitos y adipocitos bajo determinadas condiciones de cultivo⁵⁰.

Además de diferenciarse a distintos tipos celulares, las MSC tienen una potente actividad inmunomoduladora (**Figura 4**). Son capaces de modular tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa inhibiendo a células inmunoreactivas como son los linfocitos Th1, los linfocitos B, las células dendríticas o las células NK e induciendo la expansión de linfocitos T reguladores o los macrófagos tipo 2⁵¹⁻⁵⁵. Esto se debe principalmente a que las MSC expresan bajos niveles de Complejo Mayor de Histocompatibilidad-1 (MHC I) y no expresan MHC II ni moléculas coestimuladoras CD40, CD40L, CD80, CD86, por lo tanto, tienen capacidad para activar linfocitos T mediante el MHC I pero no son capaces de desencadenar respuestas secundarias causando la anergia de estos linfocitos⁵⁶. Además, el efecto inmunomodulador de las MSC se basa en la secreción de factores solubles como Indoleamina 2,3-Dioxigenasa (IDO), prostaglandina E₂ (PGE₂), óxido nítrico (NO), *transforming growth factor* (TGF- β), interferón gamma (IFN γ) e interleucina 1 β (IL1 β)⁵⁷. La baja expresión de las moléculas MHC I les hace posible, además, escapar del reconocimiento antigénico, es decir, no son inmunogénicas.

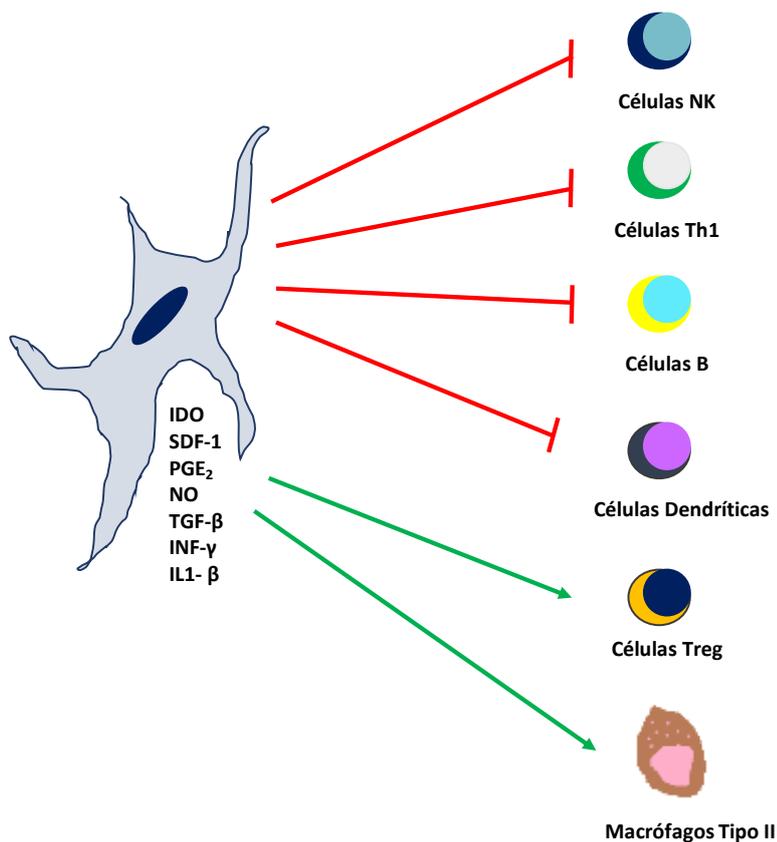


Figura 4. Actividad inmunomoduladora de las MSC. Las MSC inhiben a las células inmunoactivas y son capaces de inducir a las células T reguladoras. Secretan una serie de factores solubles como IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenasa; PGE₂: Prostaglandina E2; NO: Óxido nítrico; TGF-β: Transforming growth factor; INF-γ: Interferón gamma e IL1β: Interleucina 1β.

Hay evidencias de que las MSC tienen capacidad de *homing* hacia la MO y los focos de inflamación⁵⁸.

Estas propiedades han hecho que, hoy en día, las MSC sean una herramienta terapéutica atractiva para diversos programas de medicina regenerativa y también para el tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones en el sistema inmunitario.

De hecho, ya se han aplicado en la clínica en pacientes con distintas enfermedades como cardiomiopatía severa, infarto de miocardio, enfermedades osteoarticulares, retinopatía y pie diabético, osteogénesis imperfecta y otras, con resultados favorables⁵⁹⁻⁶³. Por otra parte, se han empleado también en enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn⁶⁴, donde ya se dispone de un producto celular aprobado basado en células

mesenquimales (darvadstrocel) o en hematología en el contexto del trasplante hematopoyético como se comentará en el punto 6 de la introducción.

Se ha observado en múltiples estudios que las MSC, tras haber sido inyectadas, no permanecen demasiado tiempo en el tejido diana y, sin embargo, sí que se siguen realizando su efecto durante un tiempo prolongado^{65, 66}. Por ello, es posible que su efecto terapéutico, más que deberse a su capacidad de injerto y diferenciación en los tejidos, se deba a su capacidad de liberar sustancias al medio de forma paracrina o bien mediante la secreción de vesículas extracelulares (VE)⁶⁷⁻⁶⁹.

4. Vesículas Extracelulares

Las VE son nanovesículas de membranas lipídicas liberadas por la mayoría de células tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, que constituyen un mecanismo importante de comunicación intercelular. Pueden ser aisladas a partir de diversos fluidos biológicos como suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo⁷⁰. Se describieron por primera vez en 1983 cuando un grupo de investigadores observó la presencia de cuerpos multivesiculares en reticulocitos que eran capaces de secretar vesículas al medio extracelular⁷¹.

Se distinguen distintos tipos de VE dependiendo de su tamaño y su biogénesis (**Figura 5**). Así encontramos principalmente por un lado los *exosomas* originados a partir de la vía endocítica por la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática cuyo tamaño es de unos 40-200nm y por otro lado las *microvesículas* originadas por la invaginación de la membrana plasmática debido a un aumento de calcio intracelular que provoca la pérdida de la asimetría de la membrana⁷², presentan un tamaño mayor entre 150nm-1µm. Las células también secretan otros tipos de vesículas como los cuerpos apoptóticos (50nm-2 µm), secretados principalmente por células en estado apoptótico o los oncosomas secretados por células malignas⁷³⁻⁷⁶.

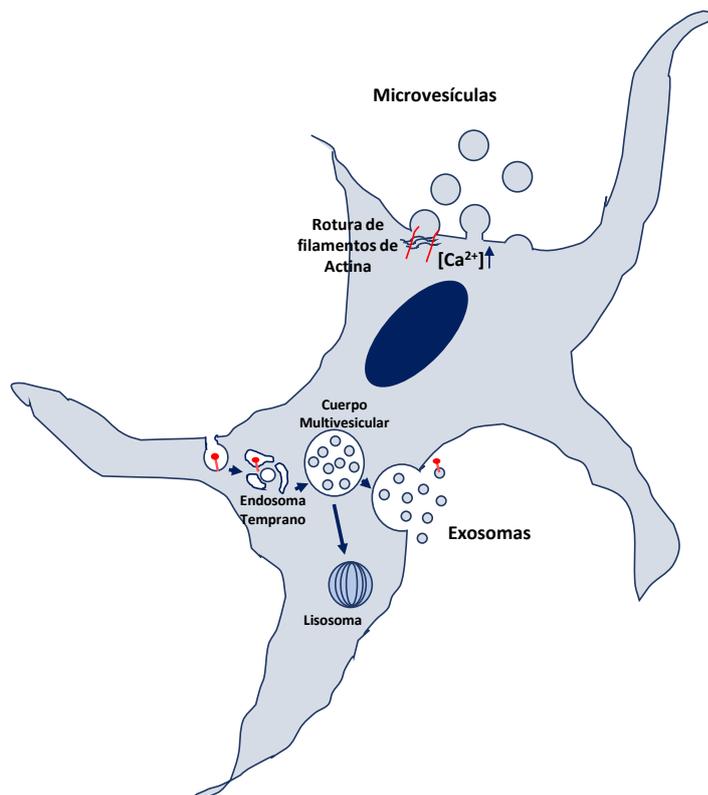


Figura 5. Formación de VE en las MSC. Se distinguen principalmente dos tipos de VE que son liberadas por las MSC y que difieren especialmente en su tamaño y biogénesis. Los *exosomas*, de menor tamaño y derivados de la vía endocítica por la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática y las *microvesículas*, de mayor tamaño y originadas por la fusión de la membrana plasmática.

Así como las microvesículas se liberan mediante un mecanismo sencillo ocurrido en la membrana plasmática y su contenido es meramente citoplasmático, el proceso de liberación de los exosomas es algo más complejo. Ocurre una internalización de proteínas de membrana mediante vesículas que son liberadas a endosomas tempranos. En los endosomas tempranos, las moléculas son recicladas a la membrana plasmática o secuestradas en vesículas internas de cuerpos multivesiculares. La formación de cuerpos multivesiculares está regulada por el *Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)* y proteínas asociadas. Los cuerpos multivesiculares pueden fusionarse con lisosomas y degradar su contenido o fusionarse con la membrana plasmática y liberar las vesículas internas al medio extracelular, que son los exosomas. La membrana de los exosomas, por tanto, tendrá la misma orientación que la membrana plasmática de la célula de la que provienen y el contenido de los exosomas será de origen tanto citoplasmático como de membrana plasmática como de moléculas de los

compartimentos endocíticos⁷⁵. Los dominios ricos en tetraspaninas y la composición lipídica de las diferentes partes de la membrana también influyen en la formación de VE.

Las VE están compuestas principalmente por proteínas de membrana y citoplasmáticas, RNA de pequeño tamaño codificantes (mRNA) y no codificantes (micro-RNA), DNA y lípidos (alta proporción de colesterol, esfingomiélin, ceramida y fosfatidilserina) que forman la membrana plasmática que protege el contenido de la vesícula y facilita su llegada a la célula diana (**Figura 6**). El contenido de las VE es muy variable dependiendo del tipo celular del que provienen^{73, 77, 78}. Varias proteínas están presentes de forma abundante en VE y, aunque no son específicas de VE, se suelen emplear como marcadores. Entre ellas están las tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), Rab GTPasas, Anexina, Flotilina, Clatrina, *Programmed cell death 6-interacting protein* (ALIX), Proteína celular tumoral humana susceptible al gen 101 (TSG101), proteínas del ESCRT y proteínas de choque térmico (HSP60 y HSP70)⁷⁹.

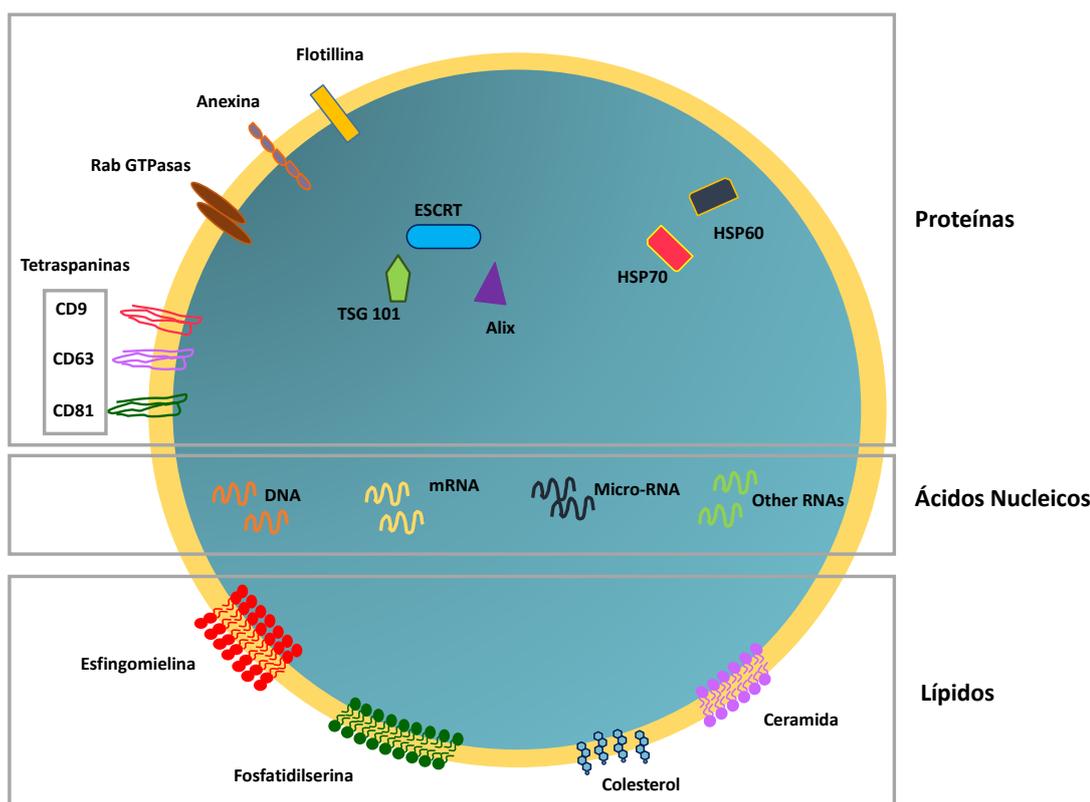


Figura 6. Representación esquemática de la composición de una vesícula extracelular. Las VE contienen proteínas, ácidos nucleicos (DNA, micro-RNAs y RNAs codificantes y no codificantes) y lípidos de los cuales la esfingomiélin, la fosfatidilserina, el colesterol y la ceramida son los más abundantes.

A pesar de sus diferencias, todas las VE presentan moléculas de superficie que les permiten llegar a células diana, ser endocitadas y modificar su estado fisiológico⁷⁴. Se ha demostrado que el mRNA que portan las VE puede ser traducido a proteína por la célula receptora⁸⁰.

En situaciones fisiológicas, el papel de las VE es fundamental para mediar la comunicación entre células con el fin de regular distintos procesos biológicos, transmitir señales, regular el sistema inmune, etc. En situaciones patológicas tienen un gran impacto favoreciendo la progresión y mantenimiento de enfermedades mediante la liberación de material genético y proteínas, la transmisión de virus y patógenos y modificando el ambiente tumoral haciéndolo más favorable al crecimiento del tumor, la invasión y la metástasis^{81, 82}.

Actualmente se está investigando el uso de VE con un fin terapéutico. Además de su efecto similar al inducido por la célula de origen, debido a su pequeño tamaño y flexibilidad, pueden atravesar membranas por lo que podrían actuar como vehículo natural para agentes terapéuticos o vacunas^{83, 84}. Además, se está estudiando su posible papel como biomarcadores para la detección precoz de distintas enfermedades como infecciones, enfermedades renales o distintos tipos de cáncer^{79, 85}.

5. Trasplante Hematopoyético

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) es un procedimiento terapéutico que consiste en la reconstitución de la hematopoyesis y el sistema inmune mediante la infusión de células progenitoras hematopoyéticas tras un tratamiento de acondicionamiento con quimio y/o radioterapia. Se emplea para el tratamiento de enfermedades hematológicas tanto malignas como no malignas y de algunas enfermedades no hematológicas.

Los objetivos principales del trasplante hematopoyético son la reconstitución de la hematopoyesis del receptor, el tratamiento de alteraciones hematopoyéticas no malignas de la MO como la insuficiencia medular o enfermedades autoinmunes y, en el caso de

hemopatías malignas, promover el efecto inmunoterápico del injerto contra las células leucémicas del receptor (mediado por las células T del injerto).

La historia del TPH comienza con el concepto de la existencia de una célula precursora de la que se originan todos los tipos de células hematopoyéticas. Es en 1951 cuando Lorenz y colaboradores descubren que la administración de células de MO de un ratón singénico evitaba los efectos letales de la irradiación a dosis mieloablativas⁸⁶. Tras unos años de estudios en roedores, y posteriormente en modelos caninos (en Seattle) el trasplante de progenitores hematopoyéticos se empezó a utilizar en la práctica clínica en 1957 por E.D. Thomas que trasplantó a seis pacientes con diversas enfermedades de los cuales solamente logró un injerto transitorio en dos casos⁸⁷. Más tarde, en 1965 G. Mathé logró conseguir un injerto duradero en un paciente pero falleció por lo que hoy se conoce como enfermedad injerto contra receptor (EICR)⁸⁸. A lo largo de los siguientes años se fueron descubriendo las limitaciones de estas experiencias y se empezaron a tener en cuenta factores clave como el acondicionamiento, la inmunosupresión y la histocompatibilidad.

El gran avance para la evolución del TPH fue el descubrimiento en 1957 del complejo mayor de Histocompatibilidad en humanos (HLA) por J. Dausset⁸⁹. Gracias a este hecho, se comprendió mejor el fenómeno del rechazo y se comenzaron a seleccionar donantes compatibles que permitirán un injerto duradero con un menor riesgo de EICR y antes de los años 70 varios grupos consiguieron llevar a cabo TPH con éxito⁹⁰. Más tarde, se ampliaron las fuentes de obtención de células progenitoras y se amplió el rango de posibles fuentes celulares alternativas lo que ha permitido que el TPH sea accesible a un mayor número de pacientes.

El desarrollo del trasplante hematopoyético alogénico se compone de varias fases: la selección del donante óptimo, el acondicionamiento del receptor, la obtención, manipulación y conservación de los progenitores hematopoyéticos del donante, la infusión de las células al receptor, el periodo de aplasia post-trasplante (es la fase crítica, en la que el riesgo de complicaciones infecciosas es mayor), la recuperación hematológica y, por último, la reconstitución inmune.

5.1. Tipos de trasplante hematopoyético

Dependiendo del origen de los progenitores, podemos encontrar diversos tipos de TPH:

- **Trasplante Autólogo:** En este caso los progenitores hematopoyéticos proceden del propio paciente. Antes del acondicionamiento, se procede a la movilización, recogida y criopreservación de los progenitores hematopoyéticos para su posterior re-infusión. Este tipo de trasplante conlleva un menor número de complicaciones para el paciente por la ausencia de reacciones inmunológicas pero la incidencia de recaída de la enfermedad base es mayor ya que se pueden re-infundir células tumorales contaminantes. Es el caso de linfomas, mieloma, tumores sólidos y algunas leucemias agudas.

- **Trasplante Singénico:** Se realiza entre hermanos gemelos univitelinos por ello, las células a inyectar son genéticamente idénticas a las del receptor por lo que no hay desarrollo de EICR y en la práctica es similar a un autotrasplante.

- **Trasplante Alogénico:** Los progenitores hematopoyéticos provienen de un donante sano familiar o un donante voluntario. En este caso, las células progenitoras del donante presentan diferencias genéticas con las del receptor. Se trata de buscar a un donante con la mayor identidad posible en sus antígenos del sistema HLA, por ello, hay varias posibilidades de donante:

- **Hermano HLA idéntico:** La probabilidad de tener un hermano HLA idéntico se sitúa en torno al 25% para los pacientes que disponen de un único hermano (y este porcentaje se incrementa ligeramente para los que disponen de varios hermanos). Se considera un donante HLA idéntico el que comparte los dos haplotipos HLA con el receptor. Es el trasplante alogénico con menor mortalidad asociada al trasplante.
- **Donante voluntario no emparentado:** Es una alternativa para los pacientes que no disponen de un hermano HLA idéntico. Se obtienen tras una búsqueda en los distintos registros internacionales de donantes de MO. Para considerar compatible a un donante no emparentado se exige que entre 7 y 12 de los

antígenos HLA sean iguales (antígenos HLA de clase I (A, B, C) y de clase II (DR, DQ, DP). Este tipo de trasplante tiene un alto impacto en la morbimortalidad por las diferencias genéticas e inmunológicas entre las células del donante y del receptor.

- **Donante haploidéntico:** Son donantes que comparten un haplotipo HLA con el receptor. En este tipo de trasplante, el donante es compatible con el receptor solo en un 50%, por lo que se emplea como alternativa para aquellos pacientes que carecen de un donante, emparentado o no emparentado, con mayor compatibilidad⁹¹. Esta estrategia terapéutica ha mejorado sus resultados en los últimos años, debido probablemente al empleo de ciclofosfamida postrasplante como profilaxis de EICR. Ello ha contribuido a que los resultados actuales de esta alternativa se aproximen a los del trasplante de donante no relacionado y ha permitido que la mayoría de pacientes que necesitan un alotrasplante dispongan de un donante (hermanos haploidénticos, padres, o hijos, dependiendo de la edad).

Además los TPH se clasifican en relación a la fuente de obtención de las células progenitoras. En este caso, se distinguen las siguientes fuentes:

- **Médula ósea:** Es el procedimiento de obtención de progenitores hematopoyéticos más antiguo y el único utilizado durante mucho tiempo. En este caso, la extracción se hace en quirófano, bajo anestesia general, mediante varias punciones-aspiraciones en las crestas ilíacas posteriores. El empleo de esta fuente ha disminuido progresivamente cuando han ido surgiendo fuentes alternativas de aislamiento de progenitores hematopoyéticos.

- **Sangre periférica Movilizada:** En la actualidad es la fuente más empleada de progenitores hematopoyéticos ya que es el método de recolección menos agresivo. Consiste en la movilización de las células progenitoras de MO a SP mediante la administración al donante de G-CSF. Posteriormente, se aíslan las células movilizadas de SP mediante leucaféresis. Mediante este método, se consigue aislar un mayor número de progenitores hematopoyéticos y con mayor rapidez de injerto que los aislados de otras fuentes por lo que el receptor consigue una recuperación hematopoyética e inmunológica precoz^{92, 93}.

- **Sangre de cordón Umbilical:** Se comenzó a emplear en el año 1988. En este caso, los progenitores hematopoyéticos se extraen tras el parto mediante punción de la vena umbilical. Este procedimiento es inocuo para el donante. Una gran ventaja de esta fuente es el estado de inmadurez de las células inmunitarias, lo implica que la compatibilidad genética con el receptor no necesita ser tan estricta por lo que se ha podido emplear en pacientes para los que no se dispone de un donante compatible⁹⁴. Sin embargo, el mayor inconveniente es el que se aísla una cantidad muy pequeña de progenitores por lo que el tiempo de recuperación de la hematopoyesis es más largo, lo que implica un mayor riesgo de infecciones. Esto último también está condicionado por el perfil *naive* del sistema inmune presente en el cordón. Esta fuente de progenitores ha sido clásicamente empleada mayoritariamente en pacientes pediátricos⁹⁵, y también en adultos, donde como se ha mencionado, ha sido desplazada por el empleo del trasplante haploidéntico de SP o MO.

La elección de la fuente de obtención de las células dependerá del estado de la enfermedad en el momento del trasplante y del peso del receptor pero también dependerá de la experiencia del centro y de las preferencias del donante.

5.2. Acondicionamiento

Previo al trasplante hematopoyético, los pacientes se someten al tratamiento de acondicionamiento. Este procedimiento implica la eliminación del sistema hematopoyético del propio paciente, creando un espacio físico en su MO que permita el injerto del nuevo sistema hematopoyético, la reducción de la cantidad de células malignas (en el caso de hemopatías malignas) y la producción de una inmunosupresión adecuada que favorezca igualmente el injerto de las células del donante y prevenga el rechazo de injerto.

Para el acondicionamiento se emplea quimioterapia y/o radioterapia. Según la intensidad de la inmunosupresión inducida, el acondicionamiento se clasifica en⁹⁶:

- **Acondicionamiento Mieloablatoivo:** La hematopoyesis del paciente se erradica por completo y solamente es posible la recuperación de la función medular con un trasplante hematopoyético.

- **Acondicionamiento No Mieloablatoivo o de Intensidad Reducida:** En este caso, la intensidad de la dosis permitiría teóricamente una recuperación autóloga de la hematopoyesis, aunque en la práctica se produce una reconstitución completa a partir de la hematopoyesis del donante en la mayoría de los casos, si bien en algunos de ellos puede existir un quimerismo mixto en SP o en MO, sobretodo en el periodo precoz postrasplante. Este tipo de acondicionamiento ha permitido ampliar la indicación del trasplante a personas de edad avanzada, pacientes que hayan sido trasplantados previamente con dosis mieloablativas (p. ej. trasplante autólogo previo) o pacientes con diversas comorbilidades que impidan la administración de un acondicionamiento mieloablatoivo.

La elección del tipo de acondicionamiento depende de la enfermedad del paciente, de la inmunocompetencia del donante, de la histocompatibilidad donante-receptor y de la composición del producto hematopoyético, principalmente.

El trasplante hematopoyético comenzó a investigarse para tratar potencialmente a personas que podrían recibir altas dosis de irradiación (p. ej. tras un ataque o accidente nuclear). Posteriormente se observó que la irradiación corporal total (ICT) podría ser útil como una herramienta terapéutica para el acondicionamiento. En los años 70 se mejoraron los regímenes de acondicionamiento añadiendo ciclofosfamida a la ICT, lo que permitía un mayor control de la enfermedad a largo plazo. Hasta mediados de los años 90, se mantuvo este régimen de acondicionamiento clásico (mieloablatoivo) que consistía en ICT a altas dosis combinada con ciclofosfamida o busulfan + ciclofosfamida⁹⁷. Debido a la alta toxicidad de este régimen de acondicionamiento, el trasplante hematopoyético era una terapia accesible solamente para pacientes jóvenes, menores de 40-50 años. Fue en los 90 cuando se empezó a entender mejor el efecto injerto contra leucemia por el que los linfocitos T del donante desempeñan un papel fundamental en la eliminación de las células leucémicas del receptor, lo que contribuye al objetivo curativo del procedimiento⁹⁸. Este descubrimiento permitió el desarrollo de regímenes de acondicionamiento menos agresivos como los regímenes no mieloablatoivos o de intensidad reducida que hacía posible el trasplante a personas mayores de 50 años. Hoy en día el acondicionamiento más ampliamente utilizado en el mundo sigue siendo el mieloablatoivo. Sin embargo, cada vez es mayor el número de casos en los que se utilizan regímenes no mieloablatoivos y de intensidad reducida^{99, 100}.

Una de las estrategias de acondicionamiento no mieloablato más recientes fue introducida en 2001 por el grupo de Seattle. Consiste en la administración de dosis bajas de irradiación (200cGy) como único régimen de acondicionamiento (es el denominado “microalotrasplante”). Esta estrategia permite el injerto de las células del donante causando una baja toxicidad y da la oportunidad de ser trasplantados a pacientes mayores de 70 años (donde suele situarse el límite actual de los regímenes no mieloablato) o con comorbilidades que no pueden soportar acondicionamientos de carácter más agresivo¹⁰¹. Más tarde se han publicado otras estrategias de acondicionamiento no mieloablato basadas únicamente en dosis bajas de ICT¹⁰²⁻¹⁰⁴.

5.3. Efectos del acondicionamiento sobre el sistema hematopoyético

La gran mayoría de los agentes quimioterápicos afectan negativamente al sistema hematopoyético actuando sobre las células hematopoyéticas directamente pero también sobre el micromedioambiente que les rodea. El efecto es muy variable dependiendo del tipo de agente quimioterápico. La mayoría de ellos afectan al ciclo celular y al ADN/ARN celular, entre ellos se distinguen agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de mitosis, inhibidores de topoisomerasas o corticoesteroides. Las células tumorales proliferan con mayor rapidez, por lo que son más sensibles a los efectos de estos fármacos. Sin embargo, las células hematopoyéticas sanas también son dañadas con este tipo de acondicionamientos lo que causa efectos secundarios como la aplasia medular y la afectación del sistema inmunitario¹⁰⁵.

En cuanto al tratamiento con ICT, la radiosensibilidad se define como la mayor o menor afectación celular de los diferentes tejidos por las radiaciones ionizantes. Bergoniè et al. afirmaron en 1906 que la radiación ionizante es más eficaz sobre células que están en mitosis, células con una alta tasa de proliferación y poco diferenciadas¹⁰⁶. Las células progenitoras hematopoyéticas son células muy radiosensibles¹⁰⁷. En cuanto a los órganos que conforman el sistema hematopoyético y linfático, MO, ganglios linfático, bazo y timo son muy sensibles a

la irradiación mientras que la SP, que contiene células más maduras, no es tan radiosensible, a excepción de los linfocitos circulantes que son muy sensibles a la irradiación. Por ello, los efectos del acondicionamiento mediante ICT no son efectivos hasta días después del tratamiento, cuando las células maduras de la sangre son eliminadas de la circulación. Es entonces cuando los pacientes sufren un periodo de pancitopenia.

5.4. Efectos del acondicionamiento sobre el estroma

Así como el efecto de los distintos tipos de acondicionamiento sobre las células hematopoyéticas se ha estudiado en profundidad, se ha prestado poca atención a cómo afectan los agentes quimioterápicos y la radioterapia a las células que conforman el microambiente de la MO.

Se ha descrito por algunos grupos que tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos el estroma del receptor se encuentra alterado. Se observó en un estudio realizado en nuestro laboratorio cómo las MSC aisladas a partir de pacientes que habían sido sometido a un TPH tenían una menor capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis *in vitro* que las MSC de sus donantes sanos emparentados¹⁰⁸. Por un lado, esto puede ser debido a la propia enfermedad de base. Se ha visto en diversos estudios realizados también en nuestro grupo cómo en determinadas hemopatías entre las que se encuentran los Síndromes Mielodisplásicos, las Neoplasias Mieloproliferativas o la Púrpura Trombocitopénica Inmune, las MSC presentan alteraciones genómicas y funcionales que pueden afectar a su supervivencia, capacidad proliferativa, y capacidad de soporte de la hematopoyesis¹⁰⁹⁻¹¹¹. Por otro lado, también se ha visto que los regímenes de acondicionamiento causan un daño en las poblaciones que conforman la MO. En concreto, Adams y colaboradores observaron como agentes quimioterápicos como melfalan, ciclofosfamida o etopósido reducen la viabilidad y la capacidad de adhesión de estas células alterando la expresión de moléculas como VCAM-1, metaloproteinasas o SDF-1^{112, 113}. Otros estudios ha demostrado cómo la exposición a agentes quimioterápicos afecta a la morfología, la capacidad proliferativa, la capacidad de diferenciación y la capacidad de soporte de la hematopoyesis por parte de las MSC¹¹⁴⁻¹¹⁶.

En cuanto al acondicionamiento con ICT se ha visto cómo, tras el TPH, las células hematopoyéticas son del donante mientras que las MSC siguen siendo del receptor¹¹⁷. Estos resultados indican que las MSC son capaces de resistir dosis de irradiación que resultan letales para las células hematopoyéticas.

Se ha observado que, tras recibir dosis variables de irradiación, las MSC siguen expresando sus marcadores característicos de superficie, mantienen sus propiedades de adhesión y migración, su capacidad de diferenciación multilineal y su viabilidad^{118, 119}. La radiorresistencia de las MSC se atribuye a que se ha demostrado que presentan diversos mecanismos de protección frente a la irradiación como un mecanismo muy eficiente de reparación de daño en el DNA, un gran contenido de proteínas anti-apoptóticas y una gran capacidad anti-oxidante^{120, 121}.

Sin embargo, a pesar de ser resistentes a altas dosis de irradiación, la función celular de las MSC se puede ver modificada en algunos aspectos. Así, a altas dosis de irradiación puede aumentar la senescencia y disminuir su capacidad de proliferación. Además se ha demostrado que, aunque las MSC no pierden su capacidad de diferenciación, esta puede verse alterada incluso a dosis bajas de irradiación^{122, 123}. Parece claro que la capacidad de diferenciación adipogénica se ve disminuida tras la irradiación pero no está del todo claro si su capacidad de diferenciación osteoblástica está aumentada o no¹²²⁻¹²⁵. Hay algunas publicaciones que describen que el efecto de la irradiación sobre las MSC puede variar dependiendo de la dosis^{126, 127}. Sin embargo, hay poca información sobre los efectos de dosis bajas de irradiación en MSC humanas, que será objeto de estudio en este trabajo.

5.5. Complicaciones tras el trasplante alogénico

Debido a la complejidad del procedimiento, la afectación del sistema inmune, la liberación masiva de citocinas y la toxicidad producida por el acondicionamiento, tras el trasplante alogénico pueden darse multitud de complicaciones tanto a corto plazo (mucositis, enfermedad veno-oclusiva hepática, microangiopatía trombotica, cistitis hemorrágica, etc.) como a largo plazo (cataratas, hipotiroidismo, esterilidad, osteoporosis, etc), además de la posibilidad de recaídas o segundas neoplasias¹²⁸. Sin embargo, entre las complicaciones más

relevantes tras el trasplante de progenitores hematopoyético están además de las anteriores, el fallo de injerto, las infecciones y la EICR.

El fallo de injerto o el injerto “pobre” representa una causa importante de morbi-mortalidad asociada al TPH. Hay cuatro factores principales que lo condicionan: un número insuficiente de HSC del donante (suele ser relevante en el trasplante de sangre de cordón umbilical), un estroma defectuoso o con función deficiente del receptor (condicionado en parte por tratamientos previos como el acondicionamiento), la eliminación de las células del donante por parte de las células residuales que quedan en el receptor tras el acondicionamiento (más frecuente tras acondicionamientos no mieloablativos y con disparidad HLA) o la depleción de células T del producto celular infundido^{95, 108, 129, 130}. En algunos casos se pueden tratar con factores de crecimiento hematopoyético como G-CSF, eltrombopag, o inmunosupresores, aunque los resultados no son del todo satisfactorios. Otra opción es la administración de un refuerzo (“boost”) con células CD34⁺ del donante o la realización de un segundo trasplante¹³¹. Debido a la neutropenia, el riesgo de infecciones víricas, bacterianas y fúngicas en caso de fallo de injerto es elevado^{132, 133}.

Por otro lado, la principal complicación tras el TPH la constituye la EICR. Esta entidad se debe a que las células inmunocompetentes procedentes de la MO del donante reconocen como extraños diferentes epítomos de órganos y tejidos del receptor. En su fisiopatología interviene el daño tisular inducido por el acondicionamiento, infecciones y otros factores, que estimula la presentación antigénica de péptidos tisulares a los linfocitos T del donante. A pesar de que la mayoría de los trasplantes que se realizan son HLA idénticos y de que se emplea inmunosupresión profiláctica, la EICR continúa siendo una complicación importante que en su forma aguda (EICR aguda) afecta sobre todo a la piel, el tubo digestivo y/o el hígado^{134, 135}. El tratamiento de primera línea de la EICRa consiste en la adición de esteroides al tratamiento inmunosupresor profiláctico. Si la enfermedad persiste, no hay un tratamiento de segunda línea estándar. En este contexto se han empleado diversas estrategias de inmunosupresión, entre las que están las MSC, la fotoaféresis extracorpórea, ruxolitinib, inhibidores de calcineurina, micofenolato de mofetil, rapamicina, timoglobulina, pentostatina, entre otros¹³⁶.

La forma crónica de la EICR (EICRc) tiene una fisiopatología diferente y en ella intervienen factores relacionados con la disfuncionalidad del sistema inmune humoral. La afectación clínica en la EICRc puede ser muy variable y guarda similitudes con algunas enfermedades inmunes del tejido conectivo (p. ej. esclerodermia, enfermedad de Sjögren, etc.). El tratamiento en todo caso se basa también en incrementar la inmunosupresión^{137, 138}.

Uno de los mayores retos para conseguir el éxito en el TPH alogénico es encontrar el balance perfecto entre el efecto injerto contra leucemia y la EICR^{98, 139}.

6. Papel de MSC y MSC-VE en trasplante

A pesar de las diversas alternativas existentes (o todavía en proceso de investigación)¹⁴⁰ para el tratamiento de las complicaciones derivadas del trasplante hematopoyético, en ocasiones no se obtiene la respuesta clínica adecuada. La mayoría se basan en fármacos o factores de crecimiento con el fin de mejorar las condiciones de la población hematopoyética pero sin prestar atención a su micromedioambiente que, con frecuencia, se encuentra dañado en estas situaciones. Por ello, actualmente para mejorar o evitar dichas complicaciones, se está utilizando en ocasiones la terapia celular como tratamiento experimental.

En concreto, se están empleando las MSC, por sus propiedades inmunomoduladoras, su capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis y su capacidad de diferenciación a distintos tipos celulares. Estas propiedades las han convertido en una herramienta terapéutica atractiva para la reparación tisular y también para el tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones en el sistema inmunitario, como es el caso de la EICR y otras complicaciones postrasplante.

En los últimos años, se ha planteado la posibilidad de infundir MSC junto con las HSC con el fin tanto de mejorar la tasa de injerto hematopoyético como de reducir la EICR. Esta idea ha llevado a la realización de diversos ensayos clínicos en los que se ha comprobado la bioseguridad y la eficiencia de estas células. La mayoría de los ensayos clínicos se han basado en pacientes con EICRa resistente a esteroides¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Sin embargo, también se están

desarrollando ensayos clínicos con MSC para tratamiento de fallo de injerto en pacientes sometidos a trasplante hematopoyético¹⁴⁵⁻¹⁵¹.

Algunos estudios demuestran que las VE secretadas por las MSC pueden tener efectos parecidos a las propias células de las que provienen. Se ha descrito que las VE secretadas por las MSC (MSC-VE) juegan un papel clave en la comunicación entre el micromedioambiente medular y las HSC. Las MSC-VE contienen moléculas bioactivas como factores de crecimiento, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y que pueden ser incorporadas por HSC y modular su comportamiento¹⁵²⁻¹⁵⁴. En un estudio realizado previamente en nuestro grupo se observó cómo VE liberadas por MSC aisladas de pacientes con síndromes mielodisplásicos se incorporaban en HSC de donantes sanos modificando su expresión de micro-RNAs y aumentando su viabilidad y capacidad clonogénica¹⁵⁵. Esta comunicación no es unidireccional, también las células hematopoyéticas secretan VE que modifican el comportamiento de las células del micromedioambiente. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado como VE secretadas por células hematopoyéticas que contienen el gen BCR-ABL son capaces de transferir el oncogen (mRNA) a células endoteliales que pasan a expresar la oncoproteína¹⁵⁶.

Así, se ha demostrado en estudios pre-clínicos como las MSC-VE son capaces de ejercer un efecto inmunomodulador, de reparación de tejidos y favorecer el mantenimiento de la hematopoyesis^{68, 157-160}, pudiendo tener así un efecto terapéutico en el contexto del trasplante hematopoyético¹⁶¹. Aunque se han desarrollado ensayos clínicos en los que se han tratado a pacientes con MSC-VE¹⁶², todavía no existen ensayos clínicos con MSC-VE en los que se hayan tratado complicaciones derivadas del trasplante hematopoyético. Sin embargo, sí que se han empleado como uso compasivo para el tratamiento EICR en un único paciente publicado hasta la fecha con un resultado favorable¹⁶³.

La transferencia de moléculas a través de VE permitiría poder mejorar la capacidad de injerto de las HSC sin necesidad de terapia celular lo cual presenta una serie de ventajas respecto al empleo de las células de origen (las MSC en este caso). En primer lugar, son más estables y fáciles de almacenar periodos de tiempo largos, por lo que sería más fácil estandarizar una producción y almacenamiento a escala industrial. No están sujetas a la regulación de la FDA (*Food and Drug Administration*) o de la EMA (*European Medicines*

Agency) para medicamentos de terapias avanzadas sino que se consideran producto biológico. Además, no poseen potencial carcinogénico, riesgo de aneuploidias o aberraciones cromosómicas ya que no tienen capacidad de replicación, y debido a su pequeño tamaño, pueden cruzar casi todas las barreras, incluida la hematoencefálica¹⁶⁴.

2. Hipótesis

Hasta hace un par de décadas, la mayor parte de las estrategias terapéuticas para mejorar la función hematopoyética se han centrado en actuar sobre las células hematopoyéticas, bien incrementando su número, purificando aquellas poblaciones con mayor inmadurez o expandiendo *in vitro* su número, esto último especialmente en el contexto del trasplante de progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical. Sin embargo, en los últimos años el papel del microambiente, especialmente de las células mesenquimales, ha adquirido un notable interés.

La hipótesis de trabajo del presente estudio consiste en que algunas modificaciones del estroma medular (como la inducida por dosis bajas de irradiación) o la producción de vesículas extracelulares por parte de las células mesenquimales medulares podrían incrementar la función hematopoyética no sólo *in vitro* sino también *in vivo*, y por tanto contribuir a la mejora de los resultados del trasplante hematopoyético.

3. Objetivos

Objetivo General:

Analizar de forma multiparamétrica los efectos de las dosis bajas de irradiación de las células mesenquimales y los efectos de la incorporación de vesículas extracelulares de células mesenquimales a las células hematopoyéticas y su potencial papel en la mejora de la función hematopoyética

Objetivo 1

Estudiar los efectos de la irradiación a bajas dosis sobre las células mesenquimales y su impacto en la función hematopoyética

Objetivo 2

Analizar los efectos de la incorporación en las células hematopoyéticas CD34⁺ de vesículas extracelulares procedentes de células mesenquimales y su impacto en la función hematopoyética

Objetivo 3

Evaluar el efecto de la irradiación previa de las MSC en la capacidad de sus vesículas extracelulares para modificar la función hematopoyética de las células CD34⁺

Objetivo 4

Analizar el impacto de un incremento de la dosis de vesículas extracelulares en sus efectos sobre las células progenitoras hematopoyéticas

4. Material y Métodos

1. Materiales

1.1. Células y animales

Las células empleadas para los diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se obtuvieron a partir de muestras procedentes de donantes sanos. Para la obtención de células CD34⁺ se emplearon muestras de sangre periférica movilizada con G-CSF de donantes de TPH alogénico emparentado y muestras de sangre de cordón umbilical adquiridas del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona y del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, así como procedentes del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario de Salamanca. Las MSC se expandieron a partir de muestras de MO de donantes sanos que habían sido evaluados dentro del programa clínico de donación de médula ósea para la obtención de MSC en la Unidad de Producción Celular del Hospital Universitario de Salamanca.

En todos los casos, los sujetos firmaron el correspondiente consentimiento informado y los procedimientos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Salamanca, de acuerdo a los principios éticos de la declaración de Helsinki.

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Terapia Celular y Medicina Regenerativa en condiciones de esterilidad.

Las características de los donantes de los que proceden las muestras de las diversas fuentes celulares se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características de los donantes de las muestras empleadas

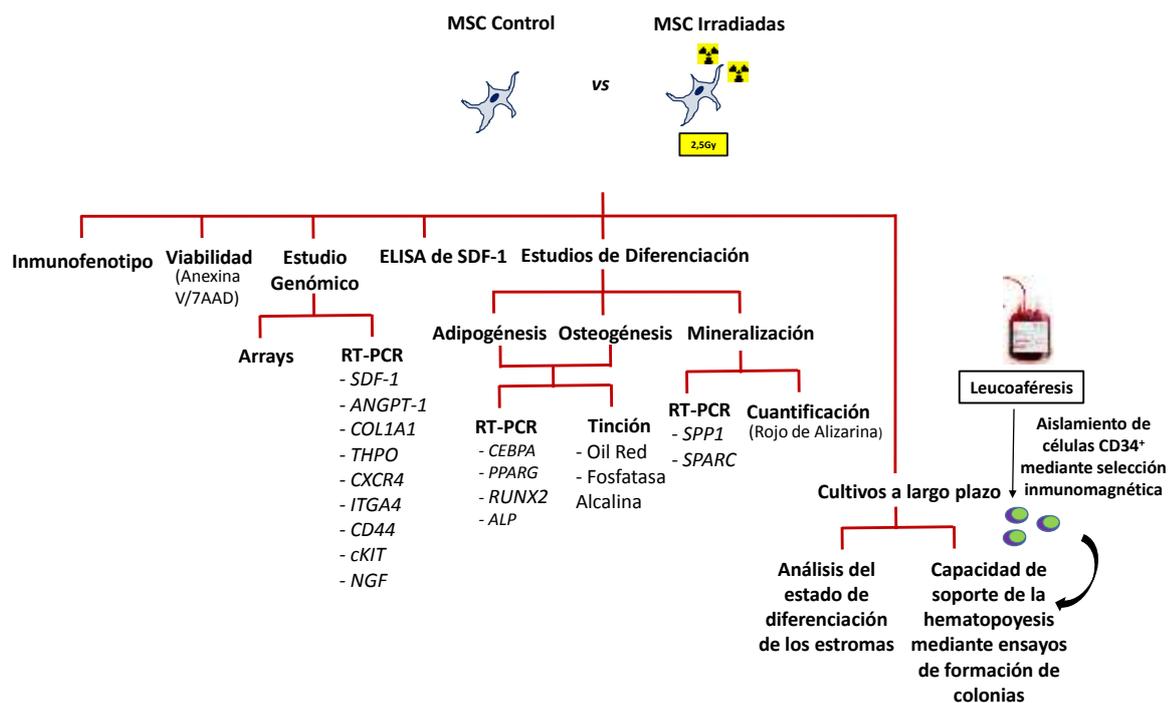
	Número	Edad	Sexo (H/M)
Médula ósea	70	39,5 (18-81)	(42/28)
Sangre Periférica Movilizada	45	43(19-71)	(30/15)
Sangre de Cordón Umbilical	33	-	-

H: Hombre; M: Mujer. Edad expresada como mediana (rango).

Para la realización de los estudios de xenotrasplante *in vivo*, se emplearon 60 ratones hembra NOD.CB17-Prkdc^{scid}/NcrCrI (NOD SCID) de 6-7 semanas. Estos animales carecen de linfocitos B y T maduros y de complemento hemolítico, presentando células dendríticas, macrófagos y células NK no funcionales.

2. Métodos

Diseño Experimental 1: Estudio del efecto de dosis bajas de irradiación sobre las BM-MSC



2.1. Células Estromales Mesenquimales de Médula Ósea (BM-MSC)

2.1.1. Aislamiento y expansión de BM-MSC

Reactivos Necesarios:

- ✓ *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Lonza)
- ✓ Ficoll (*Ficoll-Paque density 1.077g/ml*, GE Healthcare BioSciences)
- ✓ Medio de expansión*
- ✓ Tampón Fosfato Salino (PBS) (GIBCO)
- ✓ Tripsina (*Trypsin-EDTA (1X) 0.05%* GIBCO, Life Technologies)
- ✓ Frascos de Cultivo (*Corning Flask Canted Neck Nonpyrogenic Polystyrene*, Corning Incorporated)
- ✓ Azul Tripán (*Tripán Blue Solution*, Fluka, Sigma-Aldrich)

* El medio de expansión se elaboró utilizando *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (GIBCO, Life Technologies), 10% Suero Bovino Fetal (SBF) (*Fetal Bovine Serum*, GIBCO, Life Technologies) y 1% Antibiótico (Penicillin (105U/ml), Streptomycin (105µg/ml, GIBCO, Life Technologies).

Método:

Las MSC se aislaron a partir de muestras de MO obtenidas mediante punción en la cresta iliaca bajo sedación con propofol. Las muestras se recolectaron en tubos estériles (Vacuette Tube; Greiner bio-one) con 200µl de heparina sódica Hospira 5%.

Con el fin de evitar la presencia de coágulos, las muestras se pasaron a través de agujas de 18G (BD Blunt Fill Needle, Beckton Dickinson) y 25G (BD Microlance 3, Beckton Dickinson). A continuación, se diluyeron 1:3 en medio Hanks. Las células mononucleadas (MNC) se aislaron mediante una separación por gradiente de densidad con Ficoll por centrifugación durante 25 minutos a 1.600 rpm (**Figura 8**). Las MNC obtenidas se lavaron con medio Hanks, se contaron en cámara de Neubauer diluidas en Azul Tripán y se sembraron en frascos de cultivo a una concentración de 1 millón de MNC/cm². Las células se mantuvieron en estufa a 37°C, 90% de humedad y 5% CO₂ en medio de expansión*¹⁶⁵. El medio de expansión se renovó dos veces por semana, eliminando de este modo las células no adheridas. Una vez las células alcanzaron una confluencia del 85-90%, se despegaron del frasco de cultivo mediante tripsinización para sembrarlas en una superficie mayor. Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las

células adheridas al frasco de cultivo con PBS y se añadió la tripsina que se dejó actuar durante 5 minutos, tras los cuales se neutralizó y se lavaron con medio de expansión. Las células recogidas se sembraron de nuevo para su expansión a una concentración de 5.000 células/cm² en pase 1.

Se realizaron sucesivos subcultivos (o “pases”) con el fin de purificar la población mesenquimal y obtener un número suficiente de células. En pase 3, las células se caracterizaron siguiendo las recomendaciones de la International Society for Cellular Therapy (ISCT)⁵⁰ para su posterior utilización hasta pase 6.

2.1.2. Irradiación de BM-MSC

Reactivos Necesarios:

- ✓ *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Lonza)
- ✓ Medio de expansión

Método:

Una vez expandidas las MSC hasta pase 3, se cultivaron en paralelo dos alícuotas del mismo donante, de las cuales una se sometió a una única dosis de irradiación de 2,5 Gy mientras que la otra se utilizó como control (**Figura 8**).

Dependiendo de la superficie de cultivo las MSC se irradiaron con diferentes fuentes de irradiación. Así las MSC cultivadas en frascos de cultivo de 75cm² de superficie se irradiaron en un acelerador lineal médico Clinac 2100 Varian con una única dosis empleando una fuente de fotones de 6MeV liberada a una tasa de 2-3Gy/minuto. Mientras que para las MSC cultivadas en superficies menores (placas de 35mm de diámetro) se empleó un irradiador celular con fuente de cesio 137 (GammaCell 200, Nordion International, Ottawa, Ontario, Canadá), con una tasa de liberación de 2-3Gy/minuto.

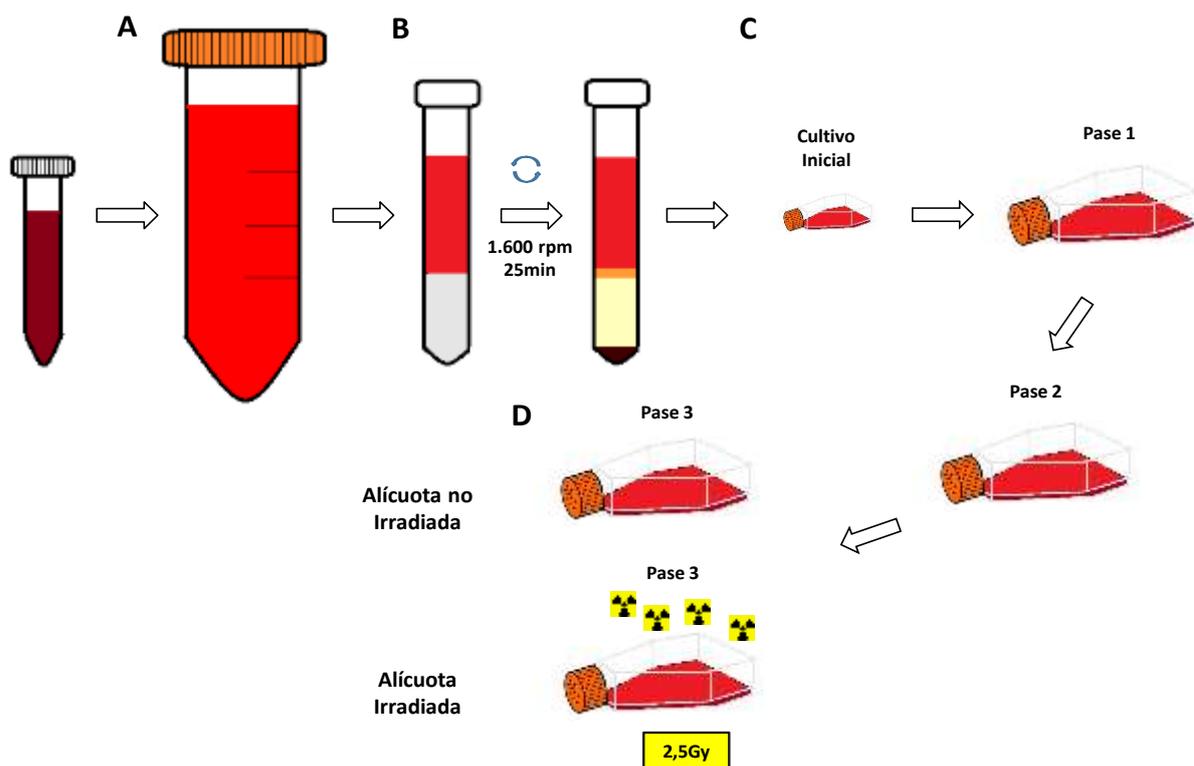


Figura 8. Aislamiento y expansión de MSC. A: Dilución de la muestra en Hanks. B: Separación de las células mononucleadas mediante gradiente de densidad con *ficoll*. C: Expansión de MSC. D: Irradiación de MSC en fase 3.

Tras la irradiación, tanto a las alícuotas irradiadas como las alícuotas control se les sustituyó de nuevo el medio de expansión y se mantuvieron en cultivo hasta la realización de los experimentos en las condiciones anteriormente descritas.

2.1.3. Caracterización inmunofenotípica de BM-MSK

Tanto las MSC irradiadas como las MSC control, se caracterizaron siguiendo los criterios de la ISCT, 3 días después de la administración de la irradiación. Para su caracterización mediante citometría de flujo, se utilizó el siguiente panel de anticuerpos monoclonales, según la metodología y las cantidades especificadas en el **Anexo 1**.

	FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
Tubo 1	CD34	CD73	CD45	CD105
Tubo 2	CD44	CD14	CD19	-
Tubo 3	CD90	CD166	HLA-DR	-

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) equipado con el software CellQuest (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). El análisis se llevó a cabo en el programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca). La expresión de cada marcador se expresó como media de fluorescencia.

2.1.4. Estudio de la apoptosis en BM-MSK

Reactivos Necesarios:

- ✓ PBS de citómetro (BD FACSToW™)
- ✓ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Jose, CA)
- ✓ Anticuerpo monoclonal CD90 conjugado en FITC (Ver tabla de anticuerpos **Anexo 1**)

Método:

Para el análisis de apoptosis, las células se recogieron en tubos de poliestireno (Falcon, Corning, México), se lavaron y se marcaron con un anticuerpo monoclonal CD90 con el fin de identificar la población celular de interés. El marcaje de las muestras se realizó según se indica en el **Anexo 1**. A continuación, las células se resuspendieron en 100µl de *Binding Buffer* 1X y se incubaron con el kit comercial de apoptosis que contiene Anexina V conjugada en PE y 7AAD conjugado en PerCPCy5.5 a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos.

Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Calibur y se analizaron con el programa Infinicyt. En todos los casos se adquirieron al menos 50.000 eventos. Los datos se expresaron como porcentajes. Se analizaron 5 muestras.

Las células se clasificaron en los siguientes subgrupos: vivas (Anexina V⁻/7-AAD⁻), en estado de apoptosis temprana (Anexina V⁺/7-AAD⁻), estado de apoptosis tardía (Anexina V⁺/7-AAD⁺) o muertas (Anexina V⁻/7-AAD⁺).

2.1.5. Análisis del Perfil de Expresión Génica de BM-MSC mediante Chip Human Gene ST Arrays

Reactivos Necesarios:

- ✓ *Super Script RNase H reverse transcriptase* (Invitrogen, CA, USA)
- ✓ *WT Plus reagent kit* (Affymetrix)

Método:

El RNA extraído y purificado de las MSC control e irradiadas en tercer pase (n=5), según se detalla en el **Anexo 2**, se empleó para analizar el patrón de expresión génica de estas células. Para ello, se utilizó la plataforma de Affymetrix *Human Gene 2.0 ST Array*. En primer lugar se realizó la transcripción reversa del RNA según la técnica descrita por van Dongen¹⁶⁶, se agregaron 100ng de RNA total a un volumen de 20µl constituido por la mezcla de hexámeros *random* y de *Super Script RNase H reverse transcriptase*. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 42°C, 3 minutos a 99°C y 30 minutos a 25°C. Una vez se obtuvo el cDNA, se realizó una transcripción para la síntesis de RNA complementario y se marcó con fluorescencia empleando el kit *WT Plus Reagent kit*. Para ello, se mezcló cDNA con 10x *HY Reaction Buffer*, 10x *Biotin Labeled Ribonucleotides*, 10x DTT, 10x *RNase Inhibitor Mix* y 20x RNA Polymerase y la mezcla se incubó durante 5 horas.

A continuación, se procedió a la fragmentación de 5,5µg de RNA con MgCl₂ y *Fragmentation Buffer* (200mM Tris-acetate pH 8,1, 500mM KOAc, 150mM MgOAc) manteniendo la mezcla a 95°C. De ahí se obtuvieron fragmentos de RNA complementario de entre 35 y 200 pares de bases. 5,5µg del RNA fragmentado de cada muestra, se hibridaron sobre el GeneChip de Affimetrix durante 16 horas a 45°C con rotación constante de 0,4g. Seguidamente se realizó la tinción con estreptavidina-ficoeritrina (SAPE 10mg/ml) y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados (3mg/ml). Después de sucesivos lavados, los chips

se escanearon empleando el *sistema GeneChip System* de Affymetrix (*GeneChip Hybridization Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450 and GeneChip Scanner 7G*).

Los datos crudos proporcionados fueron normalizados en R utilizando la técnica RMA (*Robust Multi-array Average*)¹⁶⁷ mediante *Affymetrix Expression Console* (v1.4.1.46). Se eliminaron los efectos de agrupación (*batch effects*) utilizando el algoritmo ComBat en R¹⁶⁸. Los dendrogramas y el escalamiento multidimensional no supervisados se realizaron con el programa estadístico SIMFIT (v7.3.1), utilizando la distancia Euclidea como medida de agrupación y el promedio de grupos como criterio de agrupamiento. Las sondas con bajos niveles de expresión (\log_2 expresión < 6,6) se eliminaron con el fin de mejorar los resultados del análisis. Los cambios en la expresión génica fueron determinados mediante la técnica estadística SAM (v2.0)¹⁶⁹, considerando como cambio significativo un q-valor menor de 0,05.

2.1.6. Análisis de expresión génica de moléculas implicadas en hematopoyesis en BM-MSC mediante RT-PCR

Para el estudio de la expresión de algunos genes implicados en el mantenimiento de la hematopoyesis mediante RT-PCR, se utilizó RNA extraído tres días después de la irradiación, de 10 muestras de MSC control e irradiadas en tercer pase, mediante el procedimiento detallado en el **Anexo 2**. Se analizaron los siguientes genes: *SDF-1*, *ANGPT-1*, *COL1A1* y *THPO*, empleando *GUSB* como gen control (*primers* empleados y procedimiento detallados en el **Anexo 3**).

2.1.7. Análisis de SDF-1 mediante ELISA en BM-MSC

Reactivos Necesarios:

- ✓ Human SDF-1a (CXCL12A) ELISA Kit (Thermo Scientific)

Método:

Con el fin de cuantificar la cantidad de proteína SDF-1 liberada al sobrenadante de MSC control e irradiadas se recogió el sobrenadante de ambas condiciones a 4, 12, 24 y 72 horas tras la irradiación y se procedió a analizar la cantidad de SDF-1 empleando el kit de ELISA, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello, se preparó la curva estándar provista por el kit y se añadieron 100µl del sobrenadante recogido a las diferentes horas en las diferentes condiciones por duplicado. Las muestras se incubaron con un anticuerpo biotinado, se lavaron antes de incubar con estreptavidina-HRP y finalmente se incubaron con el sustrato de la enzima. Se midió la absorbancia de cada pocillo en un equipo *UltraEvolution* (TECAN) a 450 y 570nm empleando el *software* XFLUOR4 Versión V 4.50.

2.1.8. Análisis de la diferenciación de BM-MSC

Reactivos Necesarios:

- ✓ Medio de diferenciación osteogénica (*NH Osteodiff Medium*, Miltenyi Biotec)
- ✓ Medio de inducción adipogénica (*Poietics™ Adipogenic Induction Medium*, Lonza, Walkersville, MD, USA)
- ✓ Medio de mantenimiento adipogénico (*Poietics™ Adipogenic Maintenance Medium*, Lonza, Walkersville, MD, USA)
- ✓ Metanol (Miltenyi Biotec, Merck KGaA, Germany)
- ✓ Tampón fosfato salino (PBS) (GIBCO)
- ✓ NBT/BCIP (*4-Nitro blue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate Solution*, Roche Diagnostics, Germany)
- ✓ Oil-Red-O Solution (Certistain, Merck KGaA, Germany)
- ✓ Isopropanol (VWR Chemicals)
- ✓ Paraformaldehído (*Formaldehyde 4%*, Carlo Erba Reagents)
- ✓ Hematoxilina (*Hematoxylin Solution*, Sigma-Aldrich)
- ✓ Rojo de Alizarina (*Alizarin Red S, Certified*, Sigma-Aldrich)
- ✓ Ácido acético (*Acetic Acid 96%*, Merck)
- ✓ Hidróxido de Amonio (*Ammonium Hydroxide volumetric standard 5 on solution in water*, Sigma, Germany)

Método:

2.1.8.1. Diferenciación Osteogénica

Para el estudio de la diferenciación de las MSC a osteoblastos, se sembraron las MSC a una concentración de $3,5 \times 10^3$ células/cm² en Nunc (*SlideFlask*, ThermoScientific) de 9 cm² (estudio diferenciación mediante tinción) o en placas (*Easy Grip Tissue Culture Dish*, Corning Incorporated) de 35mm de diámetro (estudio de mineralización mediante tinción y RT-PCR). Las células se mantuvieron en medio de expansión hasta alcanzar una confluencia del 30-40%. En este momento, unas alícuotas se irradiaron mientras que otras se mantuvieron sin irradiar y 1 hora después, el medio de expansión fue sustituido por medio de diferenciación osteogénica en una de las placas irradiadas y en una de las placas no irradiadas mientras que en las otras placas se mantuvo el medio de expansión para ser utilizadas como control negativo de la diferenciación (**Figura 9**). El medio se renovó dos veces por semana y tras 10 días de cultivo, las células se lavaron con PBS, se fijaron con metanol frío durante 5 minutos y se procedió a su tinción mediante la solución NBT/BCIP y el contraste con hematoxilina con el fin de detectar la actividad fosfatasa alcalina.

Para el análisis de la mineralización (n= 10) mediante cuantificación de los depósitos de calcio, tras 21 días de cultivo, las células se lavaron con PBS, se fijaron con metanol frío durante 7 minutos y se procedió a su tinción con Rojo de Alizarina. Para la cuantificación, se añadió ácido acético al 10% sobre las células teñidas con Rojo de Alizarina y después de 20 minutos las células se despegaron, se calentaron a 85°C y tras un enfriamiento rápido se centrifugaron 30 minutos a 16.000g con el fin de obtener el sobrenadante celular. Por último, para neutralizar el ácido, se añadió hidróxido de amonio al sobrenadante celular y se cuantificó el color midiendo la absorbancia a 405nm en un equipo *Synergy 4* (Biotec)¹⁷⁰.

En el caso de las células que iban a ser utilizadas para RT-PCR (n=10), tras 21 días de cultivo, las células se tripsinizaron y se mantuvieron en Trizol para continuar con el protocolo según se describe en el **Anexo 2**. Se analizaron los siguientes genes: *RUNX2*, *ALP* (Fosfatasa Alcalina), *SPP1* y *SPARC* empleando *GUSB* como gen control (*primers* y procedimiento detallados en el **Anexo 3**).

2.1.8.2. Diferenciación Adipocítica

Para el estudio de la diferenciación de las MSC a adipocitos, las MSC se sembraron a una concentración de $22,5 \times 10^3$ células/cm² en Nunc de 9cm² (para tinción) o en pocillos de 35mm de diámetro (para RT-PCR). Las células se cultivaron en DMEM hasta alcanzar una confluencia del 80%. En este momento, al igual que se hizo con las MSC inducidas a diferenciación osteogénica, dos alícuotas se irradiaron mientras que las otras dos se mantuvieron sin irradiar y 1 hora tras la irradiación, el DMEM se sustituyó por el medio de inducción adipogénica o por nuevo DMEM (control negativo de diferenciación) (**Figura 9**). El medio se renovó dos veces por semana alternando medio de inducción y medio de mantenimiento adipogénico, empezando por el medio de inducción y finalizando el día 21 con medio de mantenimiento. En este momento las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído durante 35-40 minutos. Posteriormente se tiñeron con solución Oil-Red para determinar la presencia de vacuolas lipídica (n=7).

Las células que se iban a emplear para estudios de RT-PCR (n=10), se resuspendieron en Trizol tras los 21 días del proceso de diferenciación y se extrajo el RNA según se detalla en el **Anexo 2**. Se analizaron los genes *Enhancer Binding Protein Alpha (CEBPA)* y *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARG)* empleando *GUSB* como gen control (*primers* y procedimiento detallados en el **Anexo 3**).

Diferenciación osteogénica: $3,5 \times 10^3$ MSC/cm²
Diferenciación Adipogénica: $22,5 \times 10^3$ MSC/cm²

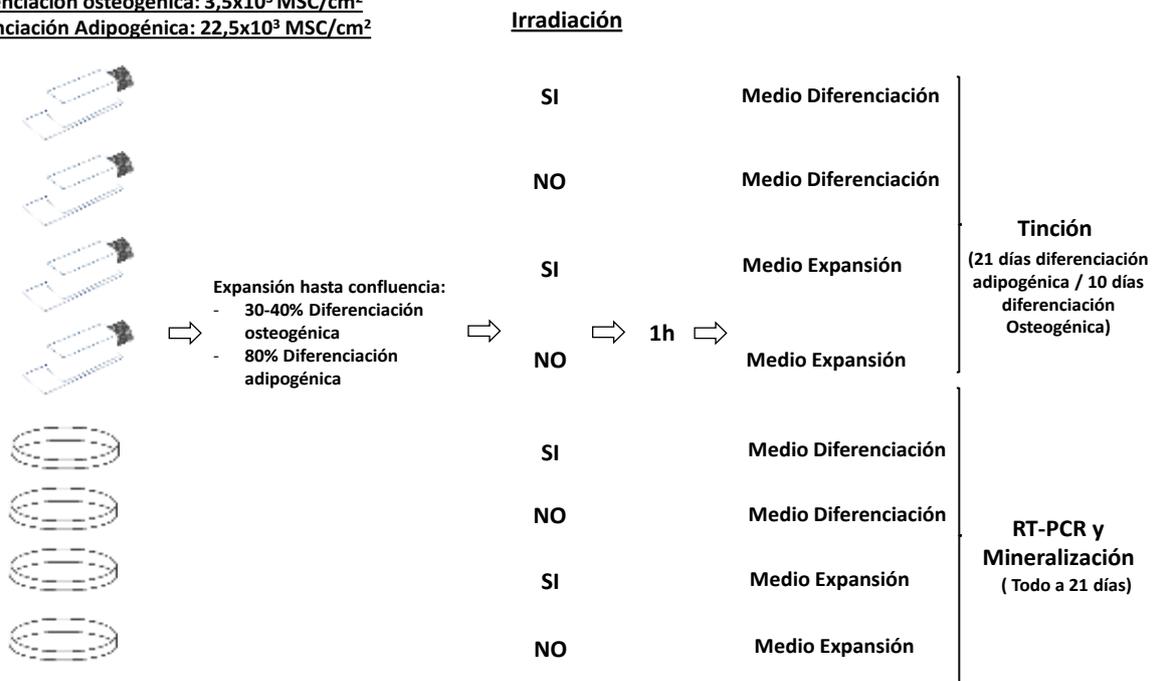


Figura 9. Esquema de los estudios de inducción de la diferenciación en MSC. Procedimiento seguido para estudiar la capacidad de diferenciación adipocítica y osteoblástica de las MSC mediante tinción, RT-PCR y mineralización.

2.1.9. Análisis de la capacidad de soporte de la hematopoyesis de las BM-MSc mediante Cultivos a Largo Plazo

Reactivos Necesarios:

- ✓ Medio de expansión (detallado en 2.1.1 Aislamiento y expansión de BM-MSc)
- ✓ Medio de cultivo a largo plazo (MCLP)*
- ✓ Metilcelulosa (*StemMACS™ HSC-CFU complete w/o Epo*, Miltenyi Biotec)
- ✓ Azul Tripán (*Tripan Blue Solution*, Fluka, Sigma-Aldrich)

* El MCLP se elaboró utilizando IMDM (*Iscove's Modified Duplecco's Medium*, Gibco, Invitrogen Corporation), Suero de Caballo (Lab Clinics), Suero Bovino Fetal (*Fetal Bovine Serum*, GIBCO, Life Technologies), Hidrocortisona (Sigma-Aldrich) y antibiótico (*Penicillin* (105U/ml) *Streptomycin* (105µg/ml), GIBCO, Life Technologies). El IMDM a una osmolaridad de 350mOsm/l se suplementó con un 10% de suero bovino fetal, un 10% de suero de caballo, un 1% de antibiótico y un 1% de hidrocortisona 5×10^{-5} M. Una vez preparado se pasó a través de filtros de 20µM para eliminar agregados.

Método:

Para establecer los cultivos a largo plazo, se sembraron 150.000 MSC en placas de 35mm de diámetro y se mantuvieron en estufa a 37°C, 90% de humedad y 5% CO₂ con medio de expansión hasta alcanzar una confluencia del 85-90%. En este momento, una de las alícuotas se irradió mientras que la otra se mantuvo sin irradiar (como control). Pasada una hora tras la irradiación, el medio de expansión se sustituyó por MCLP en las dos alícuotas. Las MSC se mantuvieron una semana en este medio con el fin de inducir su diferenciación a estroma y así formar *in vitro* un estroma de MO a partir de MSC.

Una vez creado el estroma, con el fin de analizar qué estroma era capaz de mantener mejor la hematopoyesis, se añadieron al cultivo 300.000 células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada como se detalla en el apartado 2.2.1. Este cultivo se mantuvo durante 5 semanas y durante este período se evaluó semanalmente el número de adipocitos presentes en el estroma, la confluencia del estroma y la presencia de áreas de Cobblestone. Además, semanalmente la mitad del medio se sustituyó por MCLP fresco, recogiendo de este modo la mitad de las células CD34⁺ (**Figura 10**). Con estas células hematopoyéticas del cultivo se estudió, mediante un ensayo clonogénico, su capacidad para formar colonias CFU-GM. Para ello, 2.500 células CD34⁺ de las aisladas semanalmente en el medio retirado del cultivo a largo plazo, se sembraron en 1ml de medio semi-sólido de metilcelulosa dividido en dos pocillos de placas de 24 pocillos (Costar, Corning). Después de 14 días de incubación a 37°C, 90% de humedad y 5% de CO₂, se realizó el recuento de colonias en un microscopio de luz invertida Olympus BX41 (Olympus)¹⁰⁸. El número de colonias se extrapólo al número de células totales presentes en el cultivo. Para llevar a cabo este estudio, se analizaron 8 muestras.

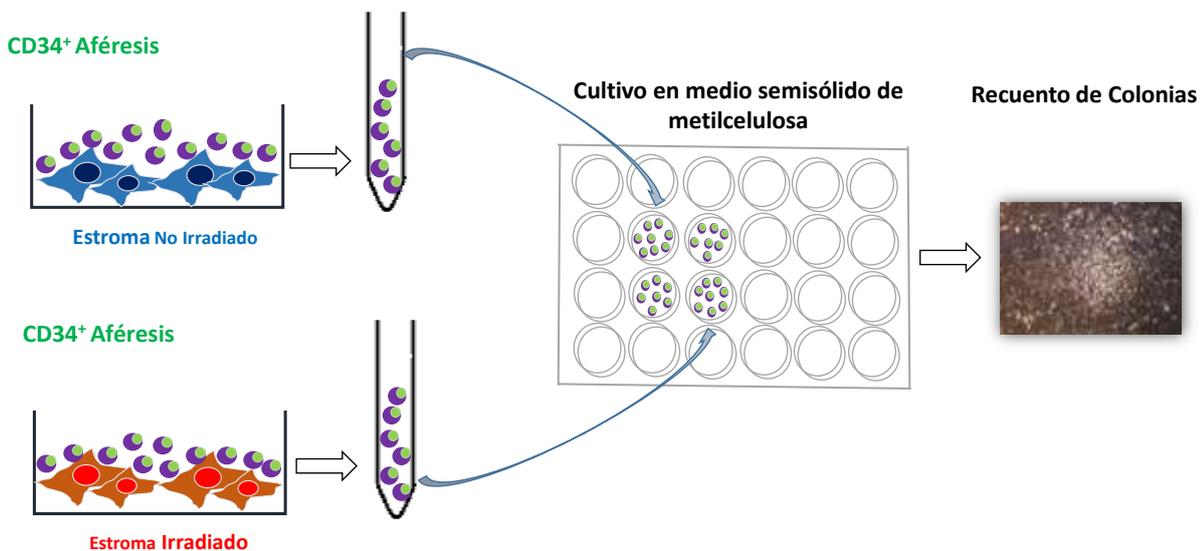
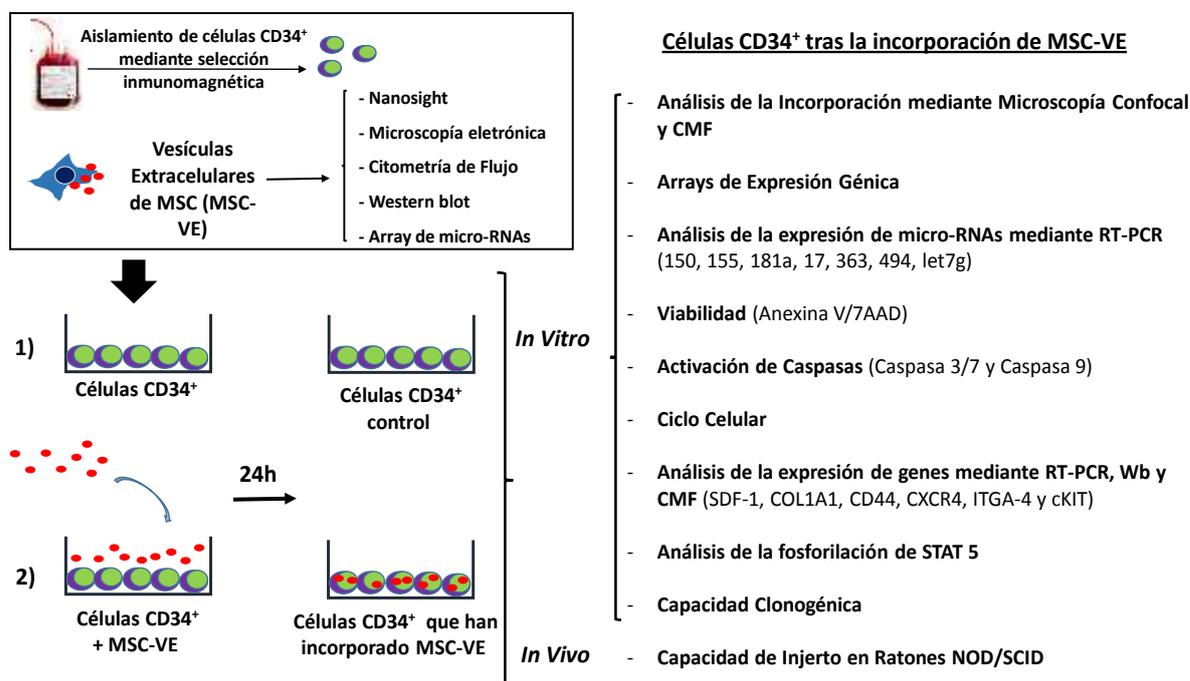


Figura 10. Esquema de cultivos a largo plazo. Diseño para estudiar la capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis por parte de MSC control y MSC irradiadas mediante ensayos clonogénicos.

Además, se analizó el grado de diferenciación de los estromas. Para ello, se contaron los adipocitos formados en cada uno de los estromas semanalmente (n= 5), se realizaron estudios de RT- PCR de genes implicados en adipogénesis (*CEBPA* y *PPARG*), en osteogénesis (*RUNX2* y *ALP*) y mineralización (*SPP1*) para lo cual los estromas se recogieron en Trizol en la semana 5 del cultivo y se prosigió con los protocolos detallados en los **Anexos 2 y 3** (n= 3). Además, se estudió el grado de mineralización (n= 6) de estos estromas en las semanas 3 y 5 según el procedimiento detallado en el apartado 2.1.8.1.

Diseño Experimental 2: Estudio del efecto de la incorporación de vesículas extracelulares aisladas a partir de BM-MSc en células CD34⁺



2.2. Aislamiento y Caracterización de células CD34⁺

2.2.1. Aislamiento y Caracterización de células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada

Reactivos Necesarios:

- ✓ Suero Fisiológico (Solución Salina Fisiológica Grifols 0.9%)
- ✓ Cloruro de amonio (*Ammonium Chloride* VWR Prolabo)
- ✓ *Running Buffer* (*AutoMACS Running Buffer*, Miltenyi Biotec)
- ✓ *Washing Solution* (*AutoMACS Washing Solution*, Miltenyi Biotec)
- ✓ Kit Microbolas CD34 (*CD34 MicroBead Kit human*, Miltenyi Biotec): *CD34 MicroBeads + FcR Blocking Reagent human*
- ✓ Azul Tripán (*Tripan Blue Solution*, Fluka, Sigma-Aldrich)

Método:

Los progenitores hematopoyéticos se aislaron a partir de muestras de SP movilizada. La movilización de HSC a SP se llevó a cabo mediante la administración de factores estimuladores de colonias granulocíticas (G-CSF) durante al menos 4 días a dosis de 5µg/kg/12h. El día 5 comenzó el proceso de leucaféresis y se realizó en el equipo Cobe Spectra™ (Lakewood, Colorado, versión 7.7). Las muestras se recogieron en tubos estériles (Vacuette Tube; Greiner bio-one) con 200µl de heparina sódica Hospira 5%.

Las muestras con el concentrado celular se diluyeron 1:10 en suero fisiológico, se lavaron y se pasaron por filtros de 40 µM (*Cell Strainer* 40 µM Nylon, Falcon A Corning Brand) para eliminar restos o coágulos. A continuación, se lisaron con cloruro de amonio 1x durante 20min en frío para eliminar hematíes. Una vez lisada la muestra, se procedió al conteo celular en cámara de Neubauer diluyendo las células en azul tripán y a su preparación para la selección inmunomagnética de células CD34⁺ en el equipo AutoMACS (Miltenyi Biotec) (**Figura 11**). Para ello, las células se incubaron con el kit de microbolas CD34, se lavaron y se procesaron en el AutoMACS con el programa *posseld* que pasa las células por dos columnas magnéticas obteniendo como producto final la fracción de células CD34⁺ eluida en 500µl de *Running Buffer*.

Una vez aisladas las células CD34⁺, se determinó su pureza mediante citometría de flujo. Para ello, las células se incubaron con anticuerpo monoclonal CD34 FITC/7AAD según se detalla en el **Anexo 1** y se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur equipado con el *software CellQuest*. El análisis se llevó a cabo en el programa Infinicyt.

Estas células se emplearon para los cultivos a largo plazo en el estudio del efecto de dosis bajas de irradiación sobre las BM-MSC y para los experimentos *in vitro* realizados en el estudio del efecto de la incorporación de vesículas extracelulares aisladas a partir de BM-MSC y de BM-MSC irradiadas en células CD34⁺.

2.2.2. Aislamiento y Caracterización de células CD34⁺ aisladas a partir de cordón Umbilical

Reactivos Necesarios:

- ✓ Suero Fisiológico (Solución Salina Fisiológica Grifols 0.9%)
- ✓ Ficoll (*Ficoll-Paque density 1.077g/ml*, GE Healthcare BioSciences)
- ✓ *Running Buffer* (*AutoMACS Running Buffer*, Miltenyi Biotec)
- ✓ *Washing Solution* (*AutoMACS Washing Solution*, Miltenyi Biotec)
- ✓ Kit Microbolas CD34 (*CD34 MicroBead Kit human*, Miltenyi Biotec): CD34 *MicroBeads* + *FcR Blocking Reagent human*
- ✓ Turk*

* Turk: se elaboró siempre de 100 en 100 ml, añadiendo 1 ml de Ácido acético (Merck) y dos gotas de Azul de metileno (Merck) a agua estéril.

Método:

Los progenitores hematopoyéticos se aislaron a partir de muestras de cordón umbilical humano provenientes del Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona, del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León y del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Salamanca. Las muestras se diluyeron 1:2 en suero fisiológico y se procedió al aislamiento de las MNC mediante una separación por gradiente de densidad con ficoll, centrifugando durante 25 minutos a 1.600 rpm. Las MNC obtenidas, se lavaron con suero fisiológico, se contaron en una cámara de Neubauer, diluidas en Turk y se marcaron con microbolas inmunomagnéticas CD34⁺ para su separación en un equipo AutoMACS con el programa *posseld2* que pasa las células por dos columnas magnéticas obteniendo como producto final la fracción de células CD34⁺ (**Figura 11**).

Una vez aisladas las células CD34⁺, se determinó su pureza y viabilidad mediante citometría de flujo incubando las células con los anticuerpos CD34FITC/7AAD.

Estas células se emplearon para los experimentos *in vivo* realizados en el estudio del efecto de la incorporación de vesículas extracelulares aisladas a partir de BM-MSC y de BM-MSC irradiadas en células CD34⁺ y para todos los experimentos realizados en el estudio del

efecto de la dosis de vesículas extracelulares procedentes de BM-MSc incorporadas en las células CD34⁺.

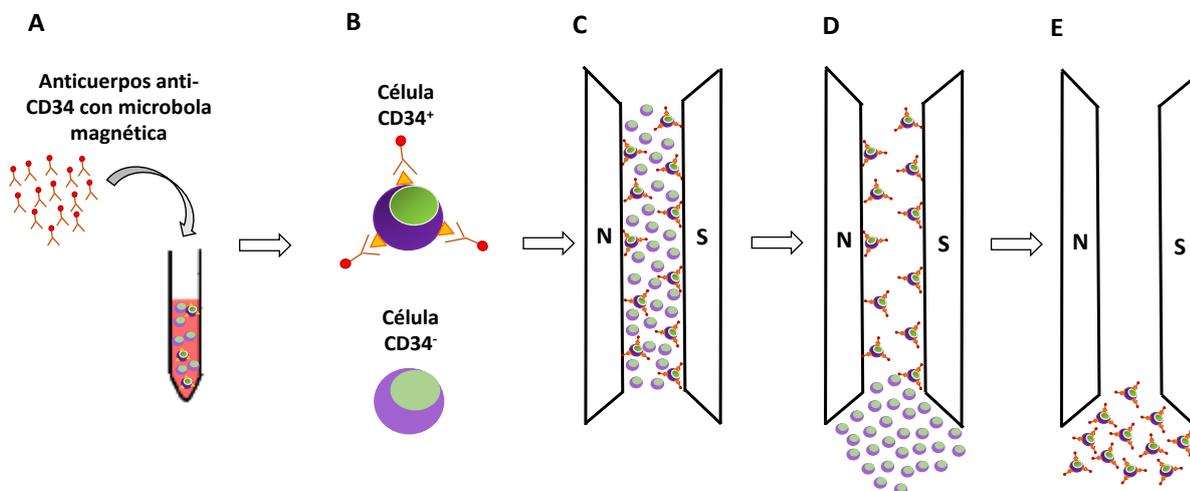


Figura 11. Aislamiento de células CD34⁺ mediante AutoMACS. A: Adición a la muestra de anticuerpos anti-CD34 unidos a microbolas magnéticas. B: Unión de los anticuerpos a células CD34⁺. C: Adhesión de las células CD34⁺ a las columnas magnéticas. D: Elución de las células CD34⁻. E: Elución de las células CD34⁺.

2.3. Vesículas Extracelulares (VE)

2.3.1. Aislamiento de VE de BM-MSc

Reactivos Necesarios:

- ✓ RPMI (RPMI medium, Gibco)
- ✓ Tampón fosfato salino (PBS) (Gibco)
- ✓ DMSO (*Dimethyl sulfoxide*, Sigma)
- ✓ *Exoquick* (*Exoquick-TC™ Exosome Precipitation Solution*, System Biosciences, Palo Alto, CA)
- ✓ Suero Fisiológico (Solución Salina Fisiológica Grifols 0.9%)

Método:

Para el aislamiento de VE (**Figura 12**), las MSC se expandieron en frascos de cultivo hasta tener un número suficiente de células (empleando MSC desde pase 3 hasta pase 6). Cuando presentaron una confluencia de 50-60%, las células se irradiaron y dos días después de la irradiación, tanto las alícuotas de MSC irradiadas como las no irradiadas fueron privadas de suero bovino fetal con el fin de estimular una mayor liberación de vesículas

extracelulares al sobrenadante. Para ello, se retiró el medio de expansión (suplementado con SBF) de las células, se lavaron con PBS, y se mantuvieron durante la noche en RPMI +1% antibiótico. A la mañana siguiente, se recogió el sobrenadante de las MSC, y se centrifugó 20 minutos a 3.000g para eliminar posibles restos celulares. Las VE fueron aisladas mediante ultracentrifugación, basándonos en el protocolo establecido por They et al¹⁷¹. Para ello, los sobrenadantes se centrifugaron 70 minutos a 100.000g a 4°C en tubos de policarbonato (Centrifuge bottles polycarbonate, Beckman Coulter) en una ultracentrifuga (Beckman Coulter Optimal-90K, Fullerton, CA, USA) empleando un rotor de ángulo de 70ti. En la mayoría de los casos el botón (“*pellet*”), que contenía las VE, se resuspendió en 150µl de RPMI suplementado con 1% Dimetil Sulfoxido (DMSO) y se congeló a -80°C hasta su posterior utilización en los diversos experimentos. Sin embargo, en algunos casos el *pellet* se resuspendió en otros medios, los cuales se indicarán en el apartado correspondiente.

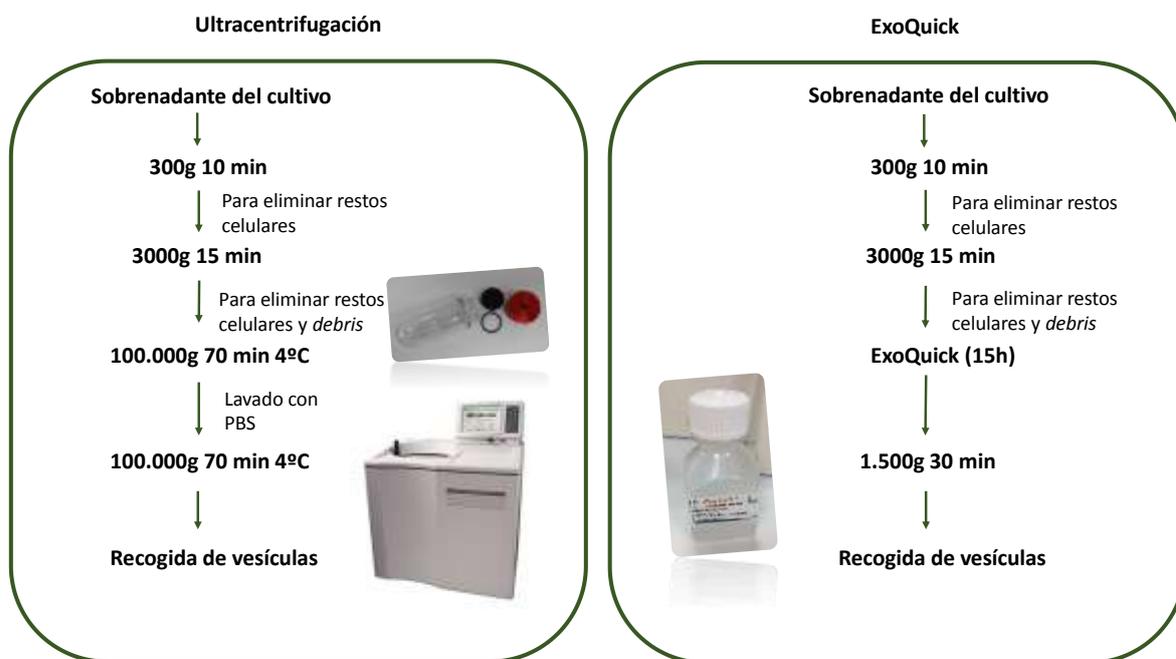


Figura 12. Esquema de aislamiento de VE de MSC. Aislamiento mediante ultracentrifugación y mediante el kit comercial *ExoQuick*.

Para los estudios de expresión génica, el sobrenadante centrifugado se precipitó empleando un kit comercial, *Exoquick*, con el fin de obtener más VE a partir del mismo volumen de sobrenadante. Las VE del sobrenadante de las MSC fueron aisladas según las instrucciones del fabricante y se recogieron en Trizol para la posterior extracción de RNA detallada en el **Anexo 2**.

2.3.2. Caracterización de VE

2.3.2.1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

El análisis de la cantidad de partículas/ml y de la distribución de tamaños de estas partículas se realizó mediante NTA empleando un equipo Nanosight (*Nanosight LM10 instrument*, Nanosight Ltd., UK) equipado con una cámara sCMOS y con el *software* de análisis NTA 3.1. Para ello, tras ultracentrifugar las muestras, el pellet de VE se resuspendió en 1ml de suero fisiológico doblemente filtrado. Las muestras fueron diluidas 1:100 antes de su adquisición debido a la alta concentración de partículas. Las condiciones de adquisición fueron de 23,4 – 23,6°C y una viscosidad de 0,918 – 0,923 cP. Se recogieron 25 imágenes por segundo (FPS) por triplicado durante 60 segundos en cada muestra y el umbral (*threshold*) se estableció en 5. Los resultados se expresaron como la media de los 3 triplicados y su desviación estándar. Las mediciones y análisis de Nanosight se llevaron a cabo por el Servicio Científico-Técnico “*Soft Materials*” del Instituto de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC).

2.3.2.2. Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)

Para el análisis de las VE mediante microscopía electrónica, una vez ultracentrifugadas las muestras y tras haber sido lavadas con PBS doblemente filtrado, el pellet con las VE se resuspendió en 50µl de PBS. A continuación, se fijaron en paraformaldehído al 2%, se extendieron en rejillas recubiertas de carbono (Formvar/carbon coated EM grids) y se volvieron a fijar en 1% de glutaraldehído. Las muestras fueron contrastadas con una solución de uraniloalato y fotografiadas en un microscopio electrónico (FEITecnai G2, Spirit Biotwin) equipado con una cámara digital (Morada, Soft Imaging System, Olympus). Este trabajo se realizó en el Servicio de Microscopía de la Universidad Autónoma de Madrid.

2.3.2.3. Citometría de Flujo (CMF)

Reactivos Necesarios:

- ✓ *SPHERO™ Rainbow Calibration (Rainbow Calibration, eight peaks-Spherotech, Inc. Lake Forest, USA)*
- ✓ *BD™ CompBeads (BD Biosciences, San José, CA, USA).*
- ✓ Agua purificada (Grifols)
- ✓ PBS de citómetro (*BD FACSTFlow™*)
- ✓ Mix de bolas fluorescentes de 1 µm: *Mix of fluorescent beads based on 1 µm monodisperse polystyrene (Sigma-Aldrich)*
- ✓ Microesferas de 6-6.4 µm: *PerfectCount Microspheres (Cytognos, Salamanca, Spain)*

Método:

La caracterización inmunofenotípica de las VE se realizó mediante CMF. Para ello, tras ultracentrifugar las muestras, el pellet que contenía las VE se lavó con PBS doblemente filtrado (a través de filtros de 0.2µm, Millipore) y se sometió a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. El pellet obtenido se resuspendió en PBS doblemente filtrado y se dividió en 2 tubos que se incubaron con anticuerpos monoclonales característicos de MSC (CD90, CD44, CD73), de células hematopoyéticas (CD34, CD45) y anticuerpos monoclonales específicos de VE (CD81, CD63) siguiendo el siguiente panel de anticuerpos (especificados en **Anexo 1**):

	FITC	PE	PerCPCy5.5	APC	APCH7	CIAN V500
Tubo 1	CD90	CD63	CD34	CD44	CD81	CD45
Tubo 2	CD90	CD73	CD34	CD44	CD81	CD45

Se incluyó un tubo control, sin marcaje con anticuerpos monoclonales, para corregir la auto-fluorescencia de las VE.

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences San Jose, CA) equipado con el software FACSDiva 6.1 software (BD Biosciences). Previo a la

adquisición de las VE, el citómetro se calibró mediante *SPHERO™ Rainbow Calibration* y se compensó con *BD™ CompBeads*. Además, el citómetro se lavó meticulosamente durante varios minutos con agua purificada con el fin de eliminar el ruido de fondo y no se procedió a la adquisición de las muestras hasta que el número de eventos adquiridos con PBS doblemente filtrado y con un umbral (*threshold*) de 300-350 fue menor a 50 eventos/segundo. En primer lugar, se adquirió PBS doblemente filtrado con la mezcla de bolas fluorescentes de 1 μm y microesferas *PerfectCount*. Las bolas fluorescentes se añadieron a todas las muestras y se emplearon en todo momento como marcador de tamaño. En todos los casos se adquirió un mínimo de 10^5 eventos. Los datos se analizaron con el *software* Infinicyt y la expresión de cada marcador se expresó como media de fluorescencia¹⁷².

2.3.2.4. Western blot (Wb)

Reactivos Necesarios:

- ✓ Solución de lisis*
- ✓ Tapón de carga*
- ✓ Acrilamida: 30% *Acrylamide/Bis Solution* (Bio-Rad Laboratories, China)
- ✓ *Running buffer*: 10x Tris/Glicine/ Dodecil Sulfato Sódico (SDS) *Buffer for SDS.PAGE applications* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- ✓ Marcador de peso molecular: *Precision Plus Protein Kaleidoscope* (Bio-Rad, USA)
- ✓ Leche: *Blotting-Grade Blocker* (Bio-Rad, USA)
- ✓ Kit de transferencia: *iBlot Gel Transfer Stacks PVDF, Regular* (Novex Life Technologies, Israel)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD63 humano (System Biosciences)
- ✓ Anticuerpo secundario de cabra anti-conejo HRP (System Biosciences)
- ✓ Solución de revelado (*Clarity™ Western ECL Substrate*, Bio-Rad Laboratories, USA)

* Solución de lisis: Se preparó con los componentes del kit RIPA *Lysis Buffer system* (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) al que se añadió un 1% PMSF, un 2% de inhibidor de proteasas (*Protease inhibitor cocktail*) y ortovanadato (*sodium orthovanadate*).

*Tampón de carga: Se preparó mezclando 8% SDS, 0.05% azul de bromofenol, 40% glicerol y 2% β -mercaptoetanol en Tris H-Cl 200mM de pH 6.8.

Método:

Extracción de proteínas: Para su caracterización mediante Western blot, las VE obtenidas mediante ultracentrifugación, se lavaron con PBS y el pellet obtenido se resuspendió directamente en solución de lisis que se incubó en hielo durante 30 minutos. Seguidamente, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C en una microcentrífuga refrigerada para eliminar los elementos no solubles.

Electroforesis y transferencia: A los extractos de proteínas resuspendidos en solución de lisis se les añadió un volumen igual de tampón de carga y se sometieron a una temperatura de 100°C durante 5 minutos para su desnaturalización. Una vez desnaturalizadas, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% preparados según describió Laemmli¹⁷³ y se realizó la electroforesis de las muestras aplicando un voltaje de 100-120V. Para llevar a cabo la electroforesis se emplearon cubetas verticales de tipo *Strudier* (Bio-Rad, Hercules, CA). A continuación, se realizó la transferencia de proteínas del gel a una membrana de PVDF. Para ello, se realizó una transferencia seca utilizando el kit de transferencia que incluye la membrana de PVDF y el aparato *iBlot® Dry Blotting System* (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) durante 7 minutos a 20-25V.

Bloqueo de la membrana e incubación con anticuerpos: Las membranas se incubaron durante 1 hora con leche al 5% a temperatura ambiente con el fin de bloquear la unión inespecífica de anticuerpos y, a continuación, se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD63 humano a una dilución 1:1000 a 4°C durante la noche. Tras varios lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP a una dilución 1:20000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de sucesivos lavados se procedió a la visualización de las bandas sobre películas Fujifilm empleando las soluciones de revelado según recomendación del fabricante.

Reactivos Necesarios:

- ✓ *Megaplex™ RT Primers*, 10x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- ✓ *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*
- ✓ *TaqMan PreAmp Master Mix*, 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- ✓ *Megaplex™ PreAmp Primers*, 10x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).
- ✓ *TaqMan Universal PCR Master Mix*, No AmpErase UNG, 2x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

* *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* contiene: dNTPs with dTTP 100mM, *MultiScribe Reverse Transcriptase* 50U/μl, *10x RT Buffer*, MgCl₂ 25mM, *RNase Inhibitor* 20U/μl.

Método:

Con el fin de estudiar el contenido en micro-RNAs de las VE procedentes de MSC control y de MSC irradiadas, las VE obtenidas mediante el kit comercial *Exoquick* se resuspendieron en Trizol y se extrajo el RNA como se detalla en el **Anexo 2**. Para el estudio, se emplearon 10 parejas de VE. En primer lugar, se hizo la transcripción reversa de 350ng de RNA total empleando el kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* y los *primers Megaplex™ RT Primers* 10x y, a continuación, se amplificó el cDNA obtenido utilizando *TaqMan PreAmp Master Mix*, 2x y *Megaplex™ PreAmp Primers* 10x, ambos procesos se llevaron a cabo en el equipo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems). Finalmente, el producto de esta reacción se mezcló con *TaqMan Universal PCR Master Mix* y se cargó en tarjetas *Microfluidic cards* (*TaqMan® MicroRNA Array A*, Applied Biosystems). Estas tarjetas contienen 384 pocillos que permiten la cuantificación precisa de 378 micro-RNAs humanos y tres controles endógenos (RNU44, RNU48 y 4 réplicas de RNU6B) empleados para la normalización de los datos. Las PCR se llevaron a cabo en un *7900 HT Fast Real-time PCR sequence detection system* (Applied Biosystems). Las reacciones se incubaron a 94,5°C durante 10 minutos, seguidos de 50 ciclos de 30 segundos a 97°C y 1 minuto a 59,7°C.

Los valores de Ct para cada micro-RNA fueron extraídos utilizando el programa *DataAssist v3.01*. El proceso de normalización de los Ct se llevó a cabo mediante la sustracción de la media geométrica de los controles RNU48 y el snRNA U6 a cada valor de Ct de cada micro-RNA en cada muestra. El nuevo valor de expresión obtenido tras este proceso de

normalización es conocido como ΔC_t (ΔC_t), y será el valor que se utilice para los siguientes pasos del proceso de análisis.

Se procedió al análisis no supervisado mediante dendrogramas jerárquicos y técnicas de escalado multidimensional utilizando como medida de la distancia la distancia Euclídea y como técnica de agrupamiento el promedio de grupos en el paquete estadístico SIMFIT (v.7.4.3). Los micro-RNAs diferencialmente expresados en VE procedentes de células irradiadas respecto a no irradiadas fueron identificados mediante el algoritmo SAM en su versión pareada, utilizando el paquete SAMR (v.2.0) en R (v.3.4.1). Se consideraron como estadísticamente significativos aquellos micro-RNAs cuyo q -valor fuese inferior a 0,01. Finalmente, se procedió a la representación de los valores de expresión de los micro-RNAs que fueron considerados como estadísticamente significativos mediante mapas de calor utilizando el paquete *g-plots* (v.3.0.3) en R.

Además, se calcularon los *Fold Change* de las diferentes muestras. Para ello, se calcularon los ΔC_t de cada muestra normalizándolas con el gen control, a continuación se calculó la media de ΔC_t de las muestras irradiadas y la media de los ΔC_t de las muestras no irradiadas y mediante la resta de ambas se obtuvo el $\Delta \Delta C_t$:

$$\Delta C_t \text{ irradiadas} - \Delta C_t \text{ no irradiadas} = \Delta \Delta C_t$$

El *Fold change* para cada muestra se expresó como $2^{-\Delta \Delta C_t}$.

2.4. Incorporación de VE a células CD34⁺

Reactivos Necesarios:

- ✓ RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*, Gibco)
- ✓ Suero Bovino Fetal (SBF) (*Fetal Bovine Serum*, GIBCO, Life Technologies)
- ✓ Antibiótico (*Penicillin* (105U/ml) *Streptomycin* (105µg/ml), GIBCO, Life Technologies)

- ✓ *Fluorescent Dye Vybrant Dil Cell Labelling Solution* (Molecular Probes, life Technology, NY, USA)
- ✓ Tampón fosfato salino (PBS) (GIBCO)
- ✓ Suero de bloqueo*
- ✓ Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD45 humano (Biolegend, San Diego, CA)
- ✓ Anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Fluor-488 (Invitrogen, Paisley, UK)
- ✓ DAPI
- ✓ Medio de montaje: *Vectashield H-1000 medium* (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)

*Suero de bloqueo: Se preparó disolviendo en PBS un 5% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, Germany), un 5% de suero normal de cabra y un 0.2% de Tritón X-100.

Método:

Con el objetivo de comprobar esta incorporación, las VE se tiñeron con la solución fluorescente *Dye Vybrant Dil*. Para ello, la solución se añadió al pellet de VE aislado mediante ultracentrifugación y se procedió a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones. Por último, las VE se lavaron con una tercera ultracentrifugación con el fin de eliminar el exceso de colorante¹⁵⁵. Como control negativo de incorporación, se añadió además un tubo de ultracentrífuga que contenía únicamente PBS con el colorante y que se procesó en las mismas condiciones que los tubos que contenían VE y se cultivó en las mismas condiciones con las células CD34⁺.

En los experimentos referentes al estudio del efecto de la irradiación previa de las MSC en la capacidad de sus VE en la mejora de la función hematopoyética, las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺, se co-cultivaron estableciendo los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1: Células CD34⁺ solas

Grupo 2: Células CD34⁺ con VE liberadas por MSC control

Grupo 3: Células CD34⁺ con VE liberadas por MSC irradiadas

En la mayoría de los estudios se co-cultivaron $1-1,5 \times 10^5$ células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada con las VE procedentes de 3×10^6 MSC (6 flask de 75cm² al 60% de confluencia). Sin embargo, en los experimentos de trasplante en ratones o los estudios de Western Blot (WES Simple) fueron necesarias cantidades mayores de células y de VE (detallado en los apartados correspondientes). Además, mientras que para los experimentos *in vitro* las células CD34⁺ se aislaron a partir de SP movilizada con G-CSF, para los experimentos *in vivo* las células CD34⁺ se aislaron a partir de sangre de cordón umbilical. Los co-cultivos se mantuvieron durante 24 horas en 500µl de medio RPMI suplementado con 10% SBF y 1% de antibiótico en placas de 24 pocillos (Costar, Corning Incorporated) (**Figura 13**).

En los experimentos referentes al estudio del efecto de la dosis de MSC-VE incorporadas a las células hematopoyéticas en su capacidad de mejora de la función hematopoyética, se realizó el mismo tipo de procedimiento que el anteriormente descrito pero estableciéndose, en este caso, los siguientes 3 grupos experimentales (**Figura 13**):

Grupo 1: Células CD34⁺ solas

Grupo 2: Células CD34⁺ con VE liberadas por 3×10^6 MSC

Grupo 3: Células CD34⁺ con VE liberadas por 9×10^6 MSC

En este caso, todos los experimentos se realizaron con células CD34⁺ aisladas a partir de sangre de cordón umbilical.

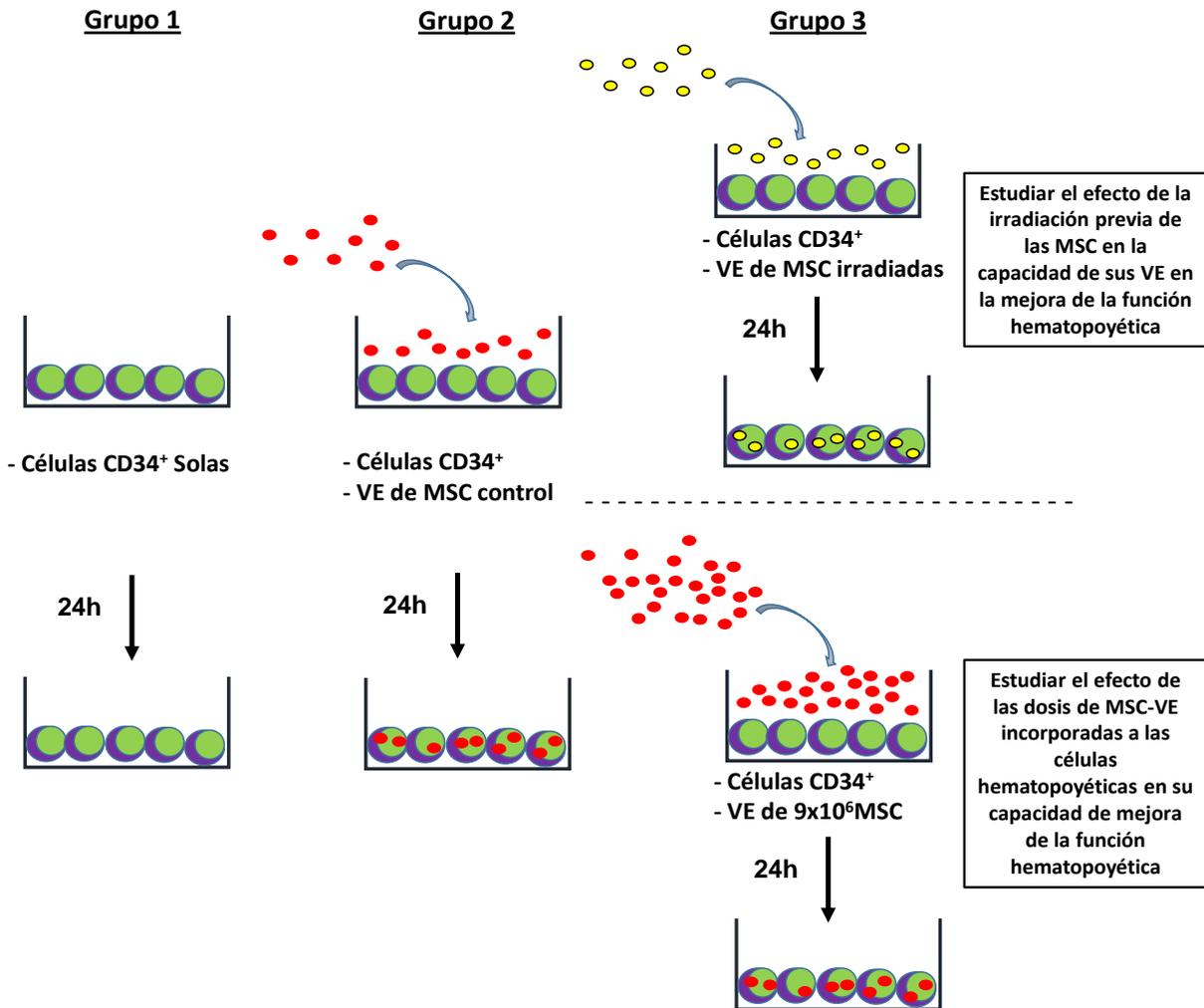


Figura 13. Esquema de co-cultivo de células CD34⁺ con MSC-VE. Esquema representativo de los diferentes grupos establecidos para el co-cultivo de células CD34⁺ con diferentes tipos de VE.

La incorporación de las VE liberadas por las MSC en las células CD34⁺ fue analizada tanto por CMF como por microscopía confocal.

Evaluación mediante Citometría de Flujo de la Incorporación de VE

Tras 24 horas de co-cultivo en las diferentes condiciones, las células CD34⁺ se recogieron, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo monoclonal CD34-FITC (según se detalla en **Anexo 1**). Posteriormente, las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur equipado con el software CellQuest. El análisis se llevó a cabo en el programa Flow JO (Oregon, USA). La solución fluorescente *Dye Vybrant Dil* con la que se habían marcado

las VE, emite señal en el fluorocromo PE. En todos los casos se adquirió un mínimo de 5×10^4 eventos. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas para la solución *Dye Vybrant Dil*. Este análisis se realizó en 13 muestras.

Evaluación mediante microscopía confocal de la incorporación de VE

Una vez cultivadas las células CD34⁺ en las diferentes condiciones durante 24 horas, se recogieron, se lavaron con PBS y se fijaron en Carnoy. Posteriormente, las muestras se extendieron en portas y se incubaron con suero de bloqueo durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Tras varios lavados, se añadió el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD45 humano a una dilución 1:20 durante la noche a 4°C. A la mañana siguiente se lavaron los portas y se incubaron con el anticuerpo secundario a una dilución 1:5000 durante 90 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los núcleos celulares se contrastaron con DAPI durante 4 minutos y se montaron los portas con medio de montaje acuoso Vectashield que preserva las muestras y favorece la visión de la fluorescencia. Finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio confocal TCS SP5 *Confocal Laser Scanning Microscope* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) equipado con el programa *LAS AF acquisition program* (version 2.6.0.7266).

El resto de los estudios se realizaron con VE no teñidas con la solución fluorescente dye Vybrant dil:

2.4.1. Análisis del Perfil de Expresión Génica de células CD34⁺ mediante Chip Human Gene ST Arrays

Reactivos Necesarios:

- ✓ *Super Script RNase H reverse transcriptase* (Invitrogen, CA, USA)
- ✓ *WT Plus reagent kit* (Affymetrix)

Método:

El RNA extraído y purificado (como se detalla en el **Anexo 2**) de células CD34⁺ co-cultivadas en las tres condiciones (solas, con VE liberadas por MSC control, con VE liberadas por MSC irradiadas) (n=5), se empleó para analizar el patrón de expresión génica de estas células. Para ello, se realizó el mismo tipo de procedimiento que el anteriormente descrito en los arrays de expresión génica de BM-MSC (apartado 2.1.5)

De igual manera, los cambios en la expresión génica se determinaron mediante la técnica estadística SAM (v2.0)¹⁶⁹, considerando como cambio significativo un q-valor menor de 0,05. El análisis funcional de estos genes se llevó a cabo con la aplicación Webgestalt¹⁷⁴.

2.4.2. Análisis de expresión de micro-RNAs en células CD34⁺ mediante RT-PCR

Reactivos Necesarios:

- ✓ *Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*
- ✓ *FAST Universal PCR Master Mix*
- ✓ *Primers* específicos: *TaqMan miRNAs Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA), detallados en el **Anexo 3**.

* *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* contiene: dNTPs with dTTP 100mM, *MultiScribe Reverse Transcriptase* 50U/μl, *10x RT Buffer*, *RNase Inhibitor* 20U/μl.

Método:

Para el estudio de expresión de micro-RNAs mediante RT-PCR se utilizó RNA extraído de células CD34⁺ co-cultivadas previamente con o sin VE. En primer lugar, se prepararon 3,3 ng de RNA en 100 μl de agua. Se hizo la transcripción reversa empleando el kit *Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit*. La reacción se incubó en un termociclador en las siguientes condiciones: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C.

Para analizar la expresión de los micro-RNAs de interés, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR en placas *MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems). Para ello, se añadieron 2µl del cDNA obtenido en el paso anterior a un volumen de 8µl de Master Mix compuesta por 5µl de FAST Universal PCR Master Mix, 2,5µl de agua destilada y 0,5µl del *primer* TM llegando a un volumen final de 10µl que se incubó en el termociclador *Step One Plus Real-Time PCR System* en las siguientes condiciones: 15 segundos a 95°C y 50 ciclos de 1 segundo a 95°C - 20 segundos a 60°C.

Tabla 2. *Primers* empleados para el estudio de micro-RNAs mediante RT-PCR.

Micro-RNAs	ID
hsa-miR-150	TM 000473
	RT000473
hsa-miR-155	TM 002623
	RT 002623
hsa-miR-181a	TM 000480
	RT 000480
Hsa-miR-17	TM 002308
	RT 002308
Hsa-miR-363	TM 001271
	RT 001271
Hsa-miR-494	TM 002365
	RT 002365
Hsa-miR-Let7g	TM 002282
	RT 002282
U6 snRNA	TM001973
	RT001973

El U6 snRNA se empleó como micro-RNA control para analizar la calidad del RNA y normalizar la expresión de los micro-RNA en estudio. El ciclo en el cual la reacción superaba el umbral determinado (C_t) ayudó a cuantificar la expresión del micro-RNA de estudio con respecto al micro-RNA control. La cuantificación relativa se calculó como $2^{-\Delta C_t}$ siguiendo la siguiente fórmula:

$$\Delta C_t = C_{t\text{micro-RNA}} - C_{t\text{Control}}$$

2.4.3. Estudio de la Apoptosis en células CD34⁺

Reactivos Necesarios:

- ✓ PBS de citómetro (BD FACSTFlow™)
- ✓ *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, San Jose, CA)
- ✓ Anticuerpo monoclonal CD34 conjugado en FITC (Ver tabla de anticuerpos del **Anexo 1**)
- ✓ Anticuerpo monoclonal CD90 conjugado en FITC (Ver tabla de anticuerpos del **Anexo 1**)

Método:

Para el análisis de apoptosis celular, después de 24 y 48 horas de cultivo en las diferentes condiciones, las células se recogieron en tubos de poliestireno, se lavaron y se marcaron con un anticuerpo monoclonal con el fin de identificar la población celular de interés. El marcaje de las muestras se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el detallado en el apartado 2.1.4 para las BM-MSK.

Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Calibur y se analizaron con el programa Infinicyt. En todos los casos se adquirieron al menos 50.000 eventos. Los datos se expresaron como porcentajes (n=10). Las células se consideraron como vivas (Anexina V⁻/7-AAD⁻), en estado de apoptosis temprana (Anexina V⁺/7-AAD⁻), estado de apoptosis tardía (Anexina V⁺/7-AAD⁺) o muertas (Anexina V⁻/7-AAD⁺).

2.4.4. Estudio de la activación de Caspasas en células CD34⁺

Reactivos Necesarios:

- ✓ *Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems kit* (Promega)
- ✓ *Caspase-Glo® 9 Assay Systems kit* (Promega)

Método:

Para analizar la actividad de las Caspasas 3/7 y 9 en las células CD34⁺, después de 24 horas en co-cultivo con o sin VE, se recogieron las células y se procedió a su cuantificación según las recomendaciones del fabricante en un equipo *Synergy 4* (Biotec) (n=10).

2.4.5. Estudio de la fosforilación de STAT5 en células CD34⁺ mediante Western blot

Reactivos Necesarios:

- ✓ *WES Separation 12-230KDa 8x25 Capillary Cartridges* (Protein Simple)
- ✓ *Standard Pack 1* (Protein Simple)*
- ✓ *10x Sample Buffer 2* (Protein Simple)
- ✓ *Anti-Rabbit Detection Module* (Protein Simple)*
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti-Calnexina humano (Enzo, Life Sciences)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti-STAT5 humano (abcam)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti-STAT5 (phospho Y694) humano (abcam)
- ✓ *Wash Buffer* (Protein Simple)

* *Standard Pack 1* contiene: *Biotinylated Ladder* (MW 12-230KDa), *Fluorescent 5x Master Mix* (29KDa system control) y dithiothreitol (DTT).

* *Anti-Rabbit Detection Module* contiene: *Antibody Diluent II*, *Streptavidin-HRP*, *Luminol-S*, *Anti-Rabbit Secondary Antibody*, *Peroxide*.

Método:

Para analizar la fosforilación de STAT5 en células CD34⁺, se empleó la técnica del *WES Simple* o *Capillary Electrophoresis Immunoassay*, siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado anterior. En este caso, los anticuerpos primarios se utilizaron a una concentración de 1:200 para STAT5, 1:50 para pSTAT y 1:250 para calnexina. La normalización de la expresión de cada proteína se hizo con respecto al área del pico de expresión de la calnexina. El estudio se realizó en 6 muestras.

2.4.6. Análisis de ciclo celular en células CD34⁺

Reactivos Necesarios:

- ✓ PBS de citómetro (BD FACSTlow™)
- ✓ *Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit* (Beckton Dickinson Biosciences, San Jose, CA)

Método:

Con el fin de analizar en qué fase del ciclo celular se encontraban las células CD34⁺, éstas se recogieron después de 24 horas en co-cultivo con o sin VE, se lavaron con PBS y se procedió a su marcaje con yoduro de propidio empleando el kit comercial *Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (n=10).

Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Calibur, según se describe en el apartado de citometría y se analizaron con el programa ModFit LT V5.0.9 (Verity Software, USA). En todos los casos se adquirieron al menos 50.000 eventos. Los datos se expresaron como porcentajes.

2.4.7. Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ mediante RT-PCR

Para el estudio de la expresión de algunos genes implicados en el mantenimiento de la hematopoyesis mediante RT-PCR, se aisló RNA de células CD34⁺ co-cultivadas en las diferentes condiciones durante 24 horas (n=10) según el procedimiento detallado en el **Anexo 2**. Se analizaron los siguientes genes *SDF-1*, *COL1A1*, *CD44*, *CXCR4*, *ITGA-4* y *cKIT*, empleando *GAPDH* como gen control (*primers* y procedimiento detallados en el **Anexo 3**).

2.4.8. Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ mediante CMF

Para el estudio de la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la hematopoyesis mediante CMF, las células CD34⁺ previamente cultivadas en las diferentes

condiciones se marcaron empleando el siguiente panel de anticuerpos monoclonales, según la metodología y las cantidades especificadas en el **Anexo 1**.

	FITC	PE	PerCPCy5.5	APC	APCH7	CIAN V500
Tubo 1	CD44	CD34	7AAD	CD184	CD117	CD49d

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences San José, CA) equipado con el software FACSDiva 6.1 software (BD Biosciences). El análisis se llevó a cabo en el programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca). La expresión de cada marcador se expresó como media de fluorescencia.

2.4.9. Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ mediante Western blot

Reactivos Necesarios:

- ✓ *WES Separation 12-230KDa 8x25 Capillary Cartridges* (Protein Simple)
- ✓ *Standard Pack 1* (Protein Simple)*
- ✓ *10x Sample Buffer 2* (Protein Simple)
- ✓ *Anti-Rabbit Detection Module* (Protein Simple)*
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti-Calnexina humano (Enzo, Life Sciences)
- ✓ Anticuerpo policlonal de conejo anti-CXCR4 humano (Novus Biologicals)
- ✓ Anticuerpo monoclonal de conejo anti-cKIT humano (Cell Signaling)
- ✓ *Wash Buffer* (Protein Simple)

* *Standard Pack 1* contiene: *Biotinylated Ladder* (MW 12-230KDa), *Fluorescent 5x Master Mix* (29KDa system control) y dithiothreitol (DTT).

* *Anti-Rabbit Detection Module* contiene: *Antibody Diluent II*, *Streptavidin-HRP*, *Luminol-S*, *Anti-Rabbit Secondary Antibody*, *Peroxide*.

Método:

Para analizar la expresión de proteínas presentes en células CD34⁺, se empleó la técnica del *WES Simple* o *Capillary Electrophoresis Immunoassay*, como sustitución al Western blot convencional, debido a que, con esta metodología, se requiere una menor cantidad de

proteína. Para el cocultivo, se añadieron 3×10^5 células CD34⁺ y las VE procedentes de 7×10^6 MSC (14 flask de 75cm² al 60% de confluencia). En primer lugar, se realizó la extracción de proteínas de las células. Para ello, tras recoger las células del cultivo, se lavaron y se resuspendieron en solución de lisis (ver apartado de Western blot) y se incubaron en hielo durante 30 minutos tras los cuales se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C para eliminar los elementos no solubles. Una vez obtenidas las proteínas, se procedió a realizar los experimentos empleando el equipo *WES™ machine* (ProteinSimple Santa Clara, CA), según recomendaciones del fabricante^{155, 175, 176}. Las muestras de proteína se mezclaron una *Master Mix* llegando a una concentración final de 1x *Sample buffer*, 1x *Fluorescent Master Mix* y 40mM DTT que se incubó 5 minutos a 95°C. A continuación, las muestras se cargaron en los pocillos correspondientes de la microplaca provista por el *kit ES Separation 12-230KDa 8x25 Capillary Cartridges*, así como el resto de los reactivos: *Biotinylated Ladder*, *Antibody Diluent II*, anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios, *Streptavidin-HRP*, *Luminol-S* y *Peroxide*. Los anticuerpos primarios se utilizaron a una concentración de 1:25 para CXCR4, 1:50 para cKIT y 1:250 para calnexina.

Una vez completa la microplaca, la electroforesis, la transferencia, el bloqueo de la membrana, la incubación con anticuerpos y el revelado se realizaron de forma automática en el equipo *Protein Simple WES* (ProteinSimple) a temperatura ambiente y con los ajustes que el equipo presenta por defecto.

Los datos se analizaron empleando el *software Compass* (ProteinSimple). La normalización de la expresión de cada proteína se hizo con respecto al área del pico de expresión de la calnexina. El estudio se realizó en 6 muestras.

2.4.10. Ensayos de Formación de Colonias en células CD34⁺

Reactivos Necesarios:

- ✓ RPMI (RPMI medium, Gibco)
- ✓ Suero Bovino Fetal (SBF) (Fetal Bovine Serum, GIBCO, Life Technologies)
- ✓ Antibiótico (Penicillin (105U/ml) Streptomycin (105µg/ml, GIBCO, Life Technologies)

- ✓ *Methylcellulose MACS Media Stem MACS HSC-CFU complete w/o Epo human* (Miltenyi Biotec, Germany)
- ✓ Azul Tripán (Tripán Blue Solution, Fluka, Sigma-Aldrich)

Método:

Con el fin de analizar si la incorporación de VE procedentes de MSC modificaba de alguna forma la capacidad de formación de colonias de las células CD34⁺, se realizaron ensayos clonogénicos con 10 muestras de estudio. Para ello, se co-cultivaron las muestras de células CD34⁺ en las 3 condiciones experimentales en RPMI suplementado con 10% SBF y 1% de antibiótico durante 24 horas. A continuación, 1.500 células de cada condición se sembraron en 1 ml de medio *Methylcellulose MACS Media Stem MACS HSC-CFU complete w/o Epo human*, que contiene *Stem Cell Factor*, GM-CSF, G-CSF, IL-3 e IL-6, facilitando así el crecimiento de unidades formadoras de colonias granulocito/macrófago (CFU-GM). El mililitro de medio con las 1.500 células se dividió en dos pocillos de una placa de 24 pocillos (Costar, Corning Incorporated). Después de 14 días de incubación a 37°C, 90% de humedad y 5% de CO₂, las colonias formadas en cada pocillo se contaron en un microscopio de luz invertida Olympus BX41 (Olympus)¹⁰⁸. Los resultados se expresaron como número absoluto de CFU-GM presentes en cada cultivo.

2.4.11. Modelo Murino de Xenotrasplante hematopoyético

Con el fin de analizar la capacidad de injerto de las células CD34⁺, se estableció un modelo de xenotrasplante hematopoyético en ratones hembra NOD/SCID de 6-7 semanas procedentes de los laboratorios Charles River Laboratories (Barcelona, Spain). Los animales se mantuvieron en la zona limpia del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, en jaulas con racks ventilados en condiciones de esterilidad y condiciones estándar de humedad, temperatura, alimentación, etc.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo al Real Decreto Español y de la unión Europea (RD 1201/05 and 86/609/CEE, respectivamente) y aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (reg. nº. 201100007924).

Seis horas antes del trasplante, los ratones se irradiaron con una dosis única de irradiación corporal total, no letal, de 3,5Gy mediante una fuente de Cesio 137 (Gammacell-200, Nordion International, Ottawa, ON, Canada). Previo al trasplante, los animales se anestesiaron con una mezcla de Ketamina, 90 mg/kg (Imalgene 500, Merial, Lyon, France) y Xylacina, 10 mg/kg (Rompun 2%, KVP Pharma, Bayer Healthcare, Kiel, Germany) administrada por vía intramuscular.

En los experimentos llevados a cabo con el objetivo de estudiar el efecto de la irradiación previa de las MSC en la capacidad de sus vesículas extracelulares en la mejora de la función hematopoyética, se emplearon un total de 30 ratones, 10 ratones por condición, estableciendo 3 grupos (**Figura 14**):

- Células CD34⁺ previamente cultivadas durante 24h solas
- Células CD34⁺ previamente co-cultivadas con MSC-VE durante 24h
- Células CD34⁺ previamente co-cultivadas con IRR-MSC-VE durante 24h

En todos los casos se añadieron al cultivo 2×10^5 células CD34⁺ y las VE procedentes de 6×10^6 MSC (12 flask de 75cm² al 60% de confluencia). Los co-cultivos se mantuvieron durante 24 horas en 500µl de medio RPMI suplementado con 10% SBF y 1% de antibiótico en placas de 24 pocillos.

En los experimentos llevados a cabo con el objetivo de estudiar el efecto de la dosis de MSC-VE incorporadas a las células hematopoyéticas en su capacidad de mejora de la función hematopoyética, se emplearon un total de 18 ratones, 6 ratones por condición y se realizó el mismo tipo de procedimiento que el anteriormente descrito pero estableciéndose en este caso los siguientes 3 grupos (**Figura 14**):

- Células CD34⁺ previamente cultivadas durante 24h solas
- Células CD34⁺ previamente co-cultivadas con MSC-VE aisladas a partir de 6×10^6 MSC
- Células CD34⁺ previamente co-cultivadas con MSC-VE aisladas a partir de 18×10^6 MSC

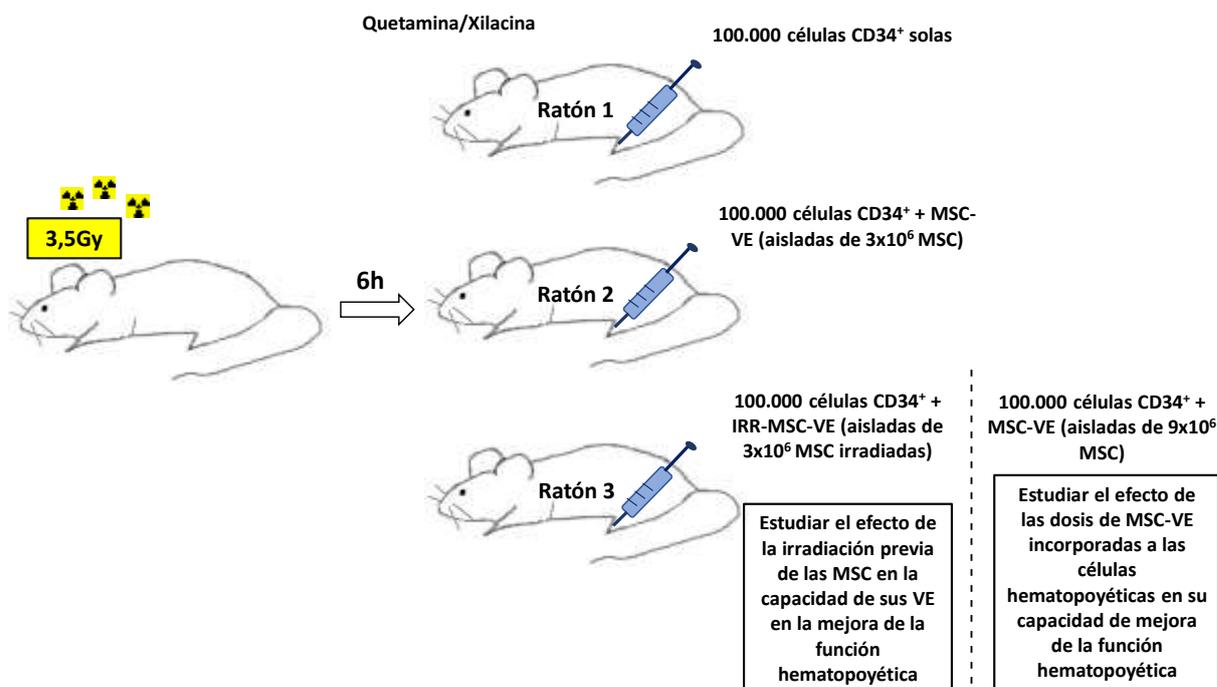


Figura 14. Esquema del estudio de xenotrasplante hematopoyético en modelo murino. Grupos de estudio empleados.

A continuación, las células se recogieron, se lavaron y se contaron. De cada condición 1×10^5 células se resuspendieron en $20 \mu\text{l}$ de suero fisiológico para proceder a su inyección en el ratón.

Las células se administraron por vía intraósea, en todos los casos en el fémur derecho. Para ello, una vez comprobado que los animales estaban correctamente anestesiados, se lavó la zona de la rodilla con alcohol y se procedió a la inyección de las células a través de la cabeza del fémur, empleando agujas de 25G (BD Microlance™ 3, Becton Dickinson, Ireland) como se muestra en la **Figura 15**. Finalmente, la zona se desinfectó con povidona iodada (Betadine).



Figura 15. Inyección de células via intraósea. Punción intraósea de células CD34⁺ en fémur derecho de ratón anestesiado con quetamina-xilacina

Cuatro semanas después del trasplante, se analizó el injerto hematopoyético humano en el fémur inyectado (fémur derecho), en el fémur contralateral (fémur izquierdo) y en el bazo mediante CMF. Para ello, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical tras anestesia con isofluorano (IsoFlo, Esteve, UK). Seguidamente se extrajo el bazo y los dos fémures. Para la obtención de las células, los bazos se disgregaron de forma mecánica con la ayuda de dos portas, las células se resuspendieron en PBS y se pasaron por un filtro de 40µm. Las células de la MO se recolectaron lavando con PBS la cavidad del fémur con una aguja de 25G, se disgregaron y se pasaron por filtros de 40 µm. Una vez obtenidas, las muestras se lisaron con cloruro de amonio con el fin de eliminar los hematíes. Para el análisis mediante CMF se empleó el siguiente panel de anticuerpos monoclonales (especificados en **Anexo 1**):

	FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
Tubo 1	CD45 humano	-	CD45 ratón	-
Tubo 2	CD45 humano	CD14	7AAD	CD34
Tubo 3	CD45 humano	CD13	7AAD	CD19

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences San Jose, CA) equipado con el software FACSDiva 6.1 software (BD Biosciences). El análisis se llevó a cabo en el programa Infinicyt (Cytognos, Salamanca).

Se analizó el injerto hematopoyético humano calculando en el porcentaje de células CD45 positivas humanas. Se excluyeron las células muertas positivas para 7AAD. Se empleó el anticuerpo monoclonal CD45 anti-ratón para verificar la especificidad del anticuerpo monoclonal CD45 anti-humano por las células humanas. Las subpoblaciones hematopoyéticas se detectaron mediante el CD13 (mieloides), CD14 (monocitos), CD34 (células progenitoras) y CD19 (células B) dentro de las células CD45 positivas.

2.5. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism version 5.00 for Windows* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). En todos los casos, se calcularon los valores de mediana y rango. El test de Friedman se empleó para analizar las diferencias entre los 3 grupos de estudio. El test de Rangos de Wilcoxon se empleó para analizar diferencias entre grupos pareados. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de $p < 0,05$.

5. Resultados

Capítulo 1

1. Célula Estromales Mesenquimales de Médula Ósea (BM-MSC)

1.1. Aislamiento y expansión de MSC control e irradiadas

En todos los casos, se consiguió el aislamiento de MSC a partir de las CMN y su expansión hasta pase 6. Desde el punto de vista morfológico, tanto las MSC control como las MSC irradiadas presentaban la morfología habitual de aspecto fibroblástico y se adherieron al plástico de forma similar (**Figura 16**). Tanto las MSC control como las MSC irradiadas proliferaban a un ritmo similar hasta alcanzar confluencias de 85-90%.

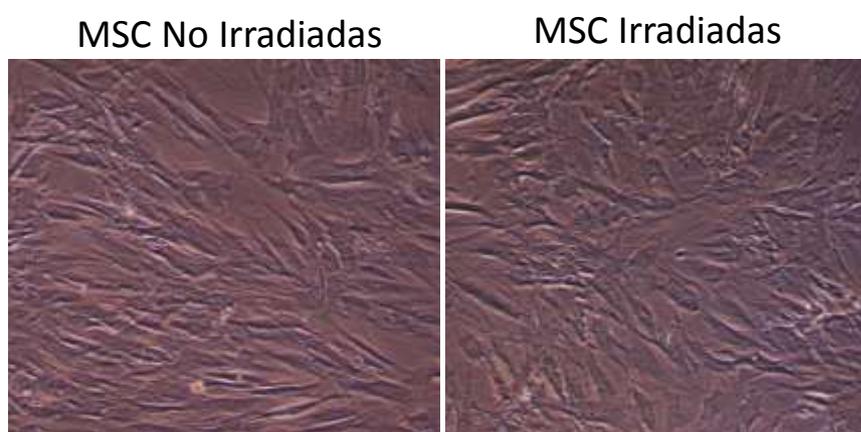


Figura 16. Imágenes de la expansión de MSC control y MSC irradiadas. MSC expandidas en Pase 3 control (izquierda) e irradiadas (derecha) tomadas tres días después de la irradiación. En ambas se observan células de aspecto fibroblástico, capaces de adherirse al plástico sin diferencias morfológicas entre ellas. Imágenes tomadas con objetivo 20X.

1.2. Caracterización inmunofenotípica de MSC control e irradiadas

Mediante citometría de flujo se observó que tanto las MSC control como las MSC irradiadas presentaban un inmunofenotipo característico de MSC de acuerdo con los criterios de la ISCT, sin diferencias entre ellas. En todos los casos, las células fueron positivas para CD73, CD90, CD105, CD44 y CD166 y negativas para marcadores hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14, CD19 y también para HLA-DR (**Figura 17**).

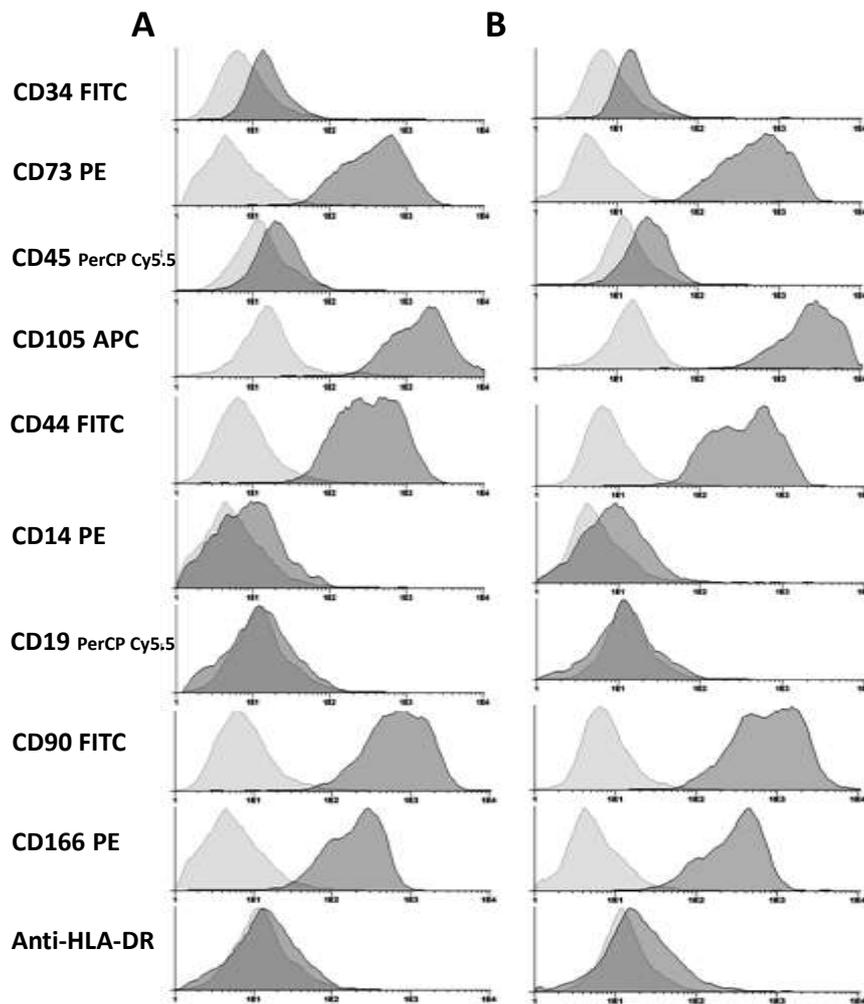


Figura 17. Caracterización inmunofenotípica de las MSC control e irradiadas. MSC control (A) e irradiadas (B). En gris oscuro se representa la expresión de las MSC para los diferentes marcadores y en gris claro se representa el control negativo, la señal de las MSC basales (sin marcar con anticuerpos) o auto-fluorescencia de las células.

1.3. Viabilidad en MSC irradiadas vs MSC control

Con el fin de analizar si la administración de una dosis de 2,5 Gy inducía apoptosis en las MSC, se analizó mediante citometría de flujo la viabilidad de las MSC 1 hora y 72 horas después de recibir la dosis de irradiación en 5 muestras. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células vivas (Anexina V⁻/7-AAD⁻), en estado de apoptosis temprana (Anexina V⁺/7-AAD⁻), estado de apoptosis tardía (Anexina V⁺/7-AAD⁺) o muertas (Anexina V⁻/7-AAD⁺) entre los dos grupos ni a 1 hora ni a 72 horas tras la irradiación (Figura 18).

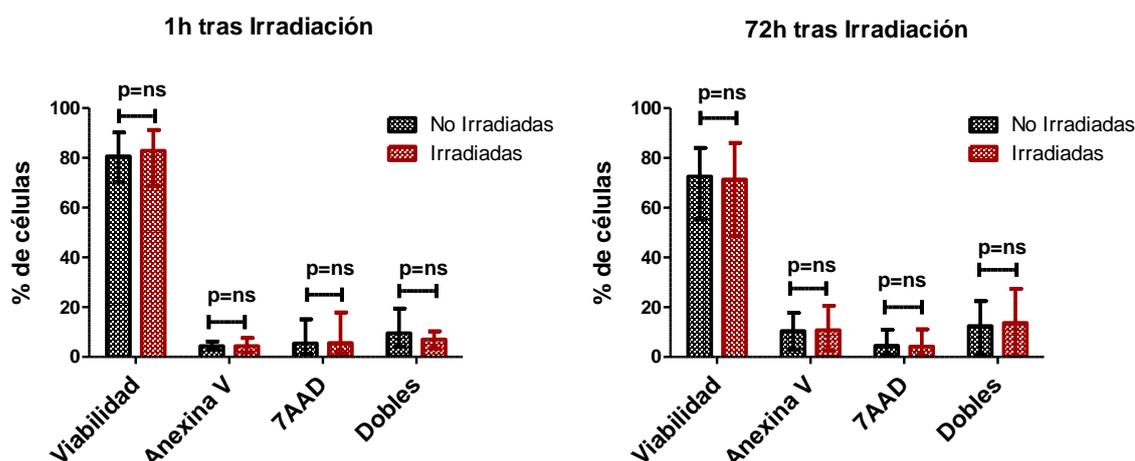


Figura 18. Estudio de viabilidad en MSC control e irradiadas. Ensayo de viabilidad en MSC control e irradiadas a 1 hora y a 3 días tras la irradiación. Las células se incubaron con Anexina V, 7AAD y CD90 y la expresión de los diferentes marcadores se analizó mediante citometría de flujo. Las células se consideraron como células viables (Anexina V⁻/7AAD⁻), en estado de apoptosis temprana (Anexina V⁺/7AAD⁻), en estado de apoptosis tardía (Anexina V⁺/7AAD⁺) o muertas (Anexina V⁻/7AAD⁺). Para este estudio se emplearon 5 muestras. Resultados expresados como media del porcentaje de células.

1.4. Perfil de expresión génica de MSC irradiadas vs MSC control

Se analizó el perfil de expresión génica de MSC que habían sido irradiadas con una dosis de 2,5 Gy en comparación con el perfil de expresión génica de MSC control en 5 muestras 72h después de la irradiación. Para ello, las muestras se hibridaron sobre un *GeneChip* de *Affimetrix*, se escanearon y los datos crudos obtenidos se normalizaron y se analizaron mediante la técnica estadística SAM. Se observó que en 50 de los 6.661 genes analizados se encontraban diferencias de expresión estadísticamente significativas en las MSC irradiadas con respecto a las MSC control, considerando como cambios significativos los q-valores menores de 5%. De los 50 genes alterados, 5 se encontraban sobre-expresados y 45 se encontraban infra-expresados en las MSC irradiadas (**Tabla 3 y Figura 19**). El gen más infra-expresado fue el de la *Piruvato Deshidrogenasa Kinasa-1 (PDK-1)* que, además de en el metabolismo del Piruvato, *PDK-1* está implicado en más vías metabólicas como la de NF- κ B, AKT o la vía de señalización de la leptina dependiente de PI3K. La infra-expresión de *PDK-1*, llevaría a la reducción de la expresión de la Glucógeno Sintasa Kinasa 3 (*GSK3*) y, por tanto, a la infra-expresión de *CEBPA*, implicado en la regulación de la adipogénesis¹⁷⁷. La infra-expresión de *CEBPA* se confirmó mediante RT-PCR en las MSC irradiadas (descrito en el apartado 1.7.2)

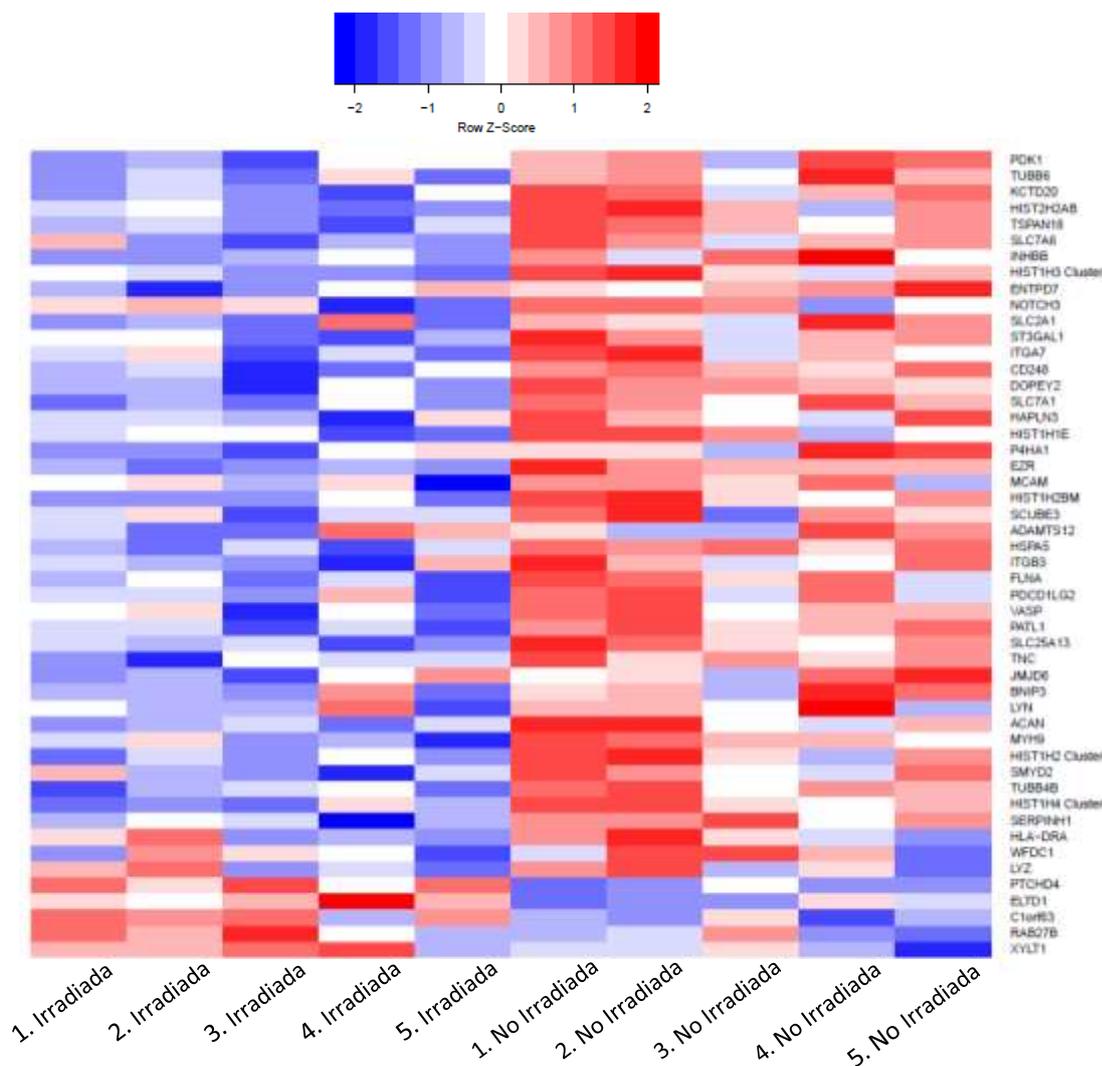


Figura 19. Heatmap de los 50 genes alterados más significativos en MSC irradiadas. Representación de los 50 genes alterados más significativos en MSC irradiadas con una dosis de 2,5 Gy con respecto a MSC control. El RNA, aislado de 5 pares de muestras de MSC, se hibridó en arrays de expresión de genes de Affymetrix y los genes alterados se identificaron mediante un análisis SAM (*Significance Analysis of Microarrays*). Los genes infra-expresados se representan en azul y los genes sobre-expresados se representan en rojo.

Tabla 3. Nombre, Fold Change y q-valor de los 50 genes alterados más significativos en MSC irradiadas con una dosis de 2,5 Gy con respecto a MSC control en el estudio de arrays de expresión. Los genes infra-expresados se representan en azul y los genes sobre-expresados se representan en rojo.

Gen	Nombre del Gen	Fold Change	q-valor
<i>PDK1</i>	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1	0,610989969	0
<i>TUBB6</i>	Tubulin Beta 6 Class V	0,657192536	0
<i>KCTD20</i>	Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 20	0,521737053	0
<i>HIST2H2AB</i>	Histone Cluster 2 H2A Family Member B	0,524360094	0
<i>TSPAN18</i>	Tetraspanin 18	0,687295015	0
<i>SLC7A6</i>	Solute Carrier Family 7 Member6	0,682877924	0
<i>INHBB</i>	Inhibin Beta B Subunit	0,498260116	0
<i>HIST1H3</i>	Histone Cluster 1 H3 Family Member A	0,506990774	0

ENTPD7	Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 7	0,707782796	0
NOTCH3	Notch 3	0,704795784	1,59832286
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1	0,552146802	1,59832286
ST3GAL1	ST3 Beta-Galactosidase Alpha-2,3- Sialyltransferase 1	0,639716145	1,59832286
ITGA7	Integrin Subunit Alpha 7	0,713822361	1,59832286
CD248	CD248 Molecule	0,704425969	1,59832286
DOPEY2	Dopey Family Member 2	0,626059725	1,59832286
SLC7A1	Solute Carrier Family 7 Member 1	0,661561141	1,59832286
HAPLN3	Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 3	0,597549528	1,59832286
HIST1H1E	Histone Cluster 1 H1 Family Member E	0,711778174	1,59832286
P4HA1	Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1	0,713032529	1,59832286
EZR	Ezrin	0,706383819	1,59832286
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule	0,624317062	1,59832286
HIST1H2BM	Histone Cluster 1 H2B Family Member M	0,255445672	1,59832286
SCUBE3	Signal Peptide, CUB Domain And EGF Like Domain Containing 3	0,615848673	1,59832286
ADAMTS12	ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 12	0,716079663	2,79706501
HSPA5	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5	0,776492556	2,79706501
ITGB3	Integrin Subunit Beta 3	0,584198517	2,79706501
FLNA	Filamin A	0,764318576	2,79706501
PDCD1LG2	Programmed Cell Death 1 Ligand 2	0,541444136	2,79706501
VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein	0,717895023	2,79706501
PATL1	PAT1 Homolog 1, Processing Body mRNA Decay Factor	0,726457448	4,47530401
SLC25A13	Solute Carrier Family 25 Member 13	0,70772167	4,47530401
TNC	Tenascin C	0,628609334	4,47530401
JMJD6	Arginine Demethylase And Lysine Hydroxylase	0,803888769	4,47530401
BNIP3	BCL2 Interacting Protein 3	0,615728904	4,47530401
LYN	LYN Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase	0,728420485	4,47530401
ACAN	Aggrecan	0,384666847	4,47530401
MYH9	Myosin Heavy Chain 9	0,758624568	4,47530401
HIST1H2A	Histone Cluster 1 H2A Family Member B	0,317955551	4,86446088
SMYD2	SET And MYND Domain Containing 2	0,77340779	4,86446088
TUBB4B	Tubulin Beta 4B Class IVb	0,603927302	4,86446088
HIST1H4	Histone Cluster 4 H4	0,437380256	4,86446088
SERPINH1	Serpin Family H Member 1	0,757860384	4,86446088
HLA-DRA	Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Alpha	0,57847367	4,86446088
WFDC1	WAP Four-Disulfide Core Domain 1	0,679554611	4,86446088
LYZ	Lysozyme	0,614474736	4,86446088
PTCHD4	Patched Domain Containing 4	2,357078489	0
ELTD1	Adhesion G Protein-Coupled Receptor L4 (ADGRL4)	1,849321172	0
C1orf63	Arginine And Serine Rich Protein 1	1,641293218	1,59832286
RAB27B	RAB27B, Member RAS Oncogene Family	2,186727728	1,59832286
XYLT1	Xylosyltransferase 1	1,695526344	4,47530401

1.5. Análisis de expresión de genes implicados en hematopoyesis en MSC irradiadas vs MSC control

La expresión de varios genes clave en el *homing* o en el mantenimiento de la hematopoyesis se analizó mediante técnicas de RT-PCR (n=10) tres días tras la irradiación. Observamos que *NGF*, *THPO*, *CD44*, *CXCR4* y *ITGA-4* se expresaban tanto en MSC irradiadas como en MSC control sin diferencias significativas entre los dos grupos. En cuanto a *COL1A1*, su expresión era significativamente menor en MSC irradiadas con respecto a las MSC control ($p=0,0313$) mientras que la expresión de *SDF-1* y *ANGPT*, dos moléculas clave en el mantenimiento de las HSC en el nicho hematopoyético, era significativamente mayor en las MSC irradiadas en comparación con las MSC control ($p=0,0156$ y $p=0,0078$, respectivamente) (Figura 20).

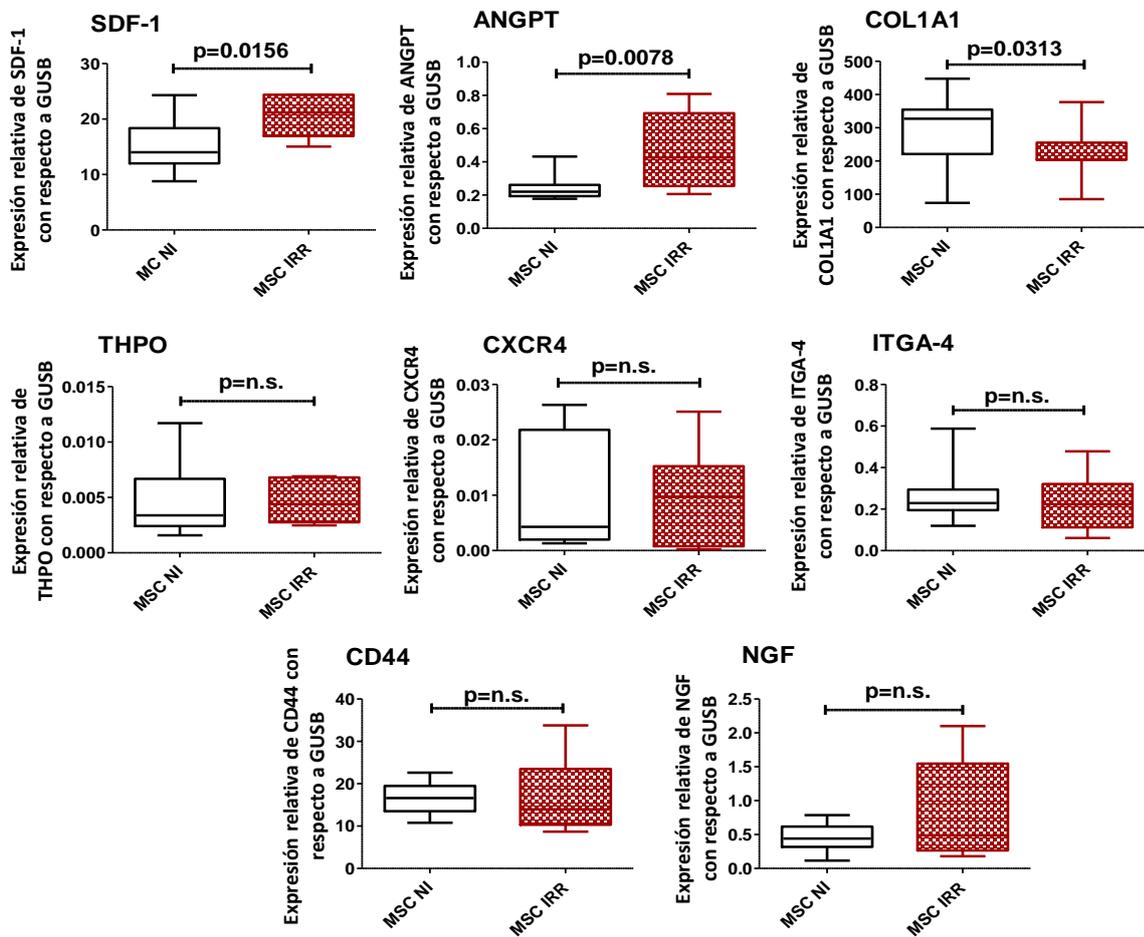


Figura 20. Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en MSC control vs MSC irradiadas. Análisis de la expresión de *SDF-1*, *ANGPT*, *COL1A1*, *THPO*, *CXCR4*, *ITGA4*, *CD44* y *NGF* mediante RT-PCR 3 días después de la irradiación en MSC control y MSC irradiadas. La β -glucuronidasa se empleó como gen control. Para este estudio se emplearon 10 muestras.

Comprobamos mediante un ensayo de ELISA la cantidad de proteína de SDF-1 presente en el sobrenadante de MSC control y MSC irradiadas a 4, 12, 24 y 72 horas tras la irradiación (n=3). Observamos que existía una importante variabilidad dependiendo de los tiempos de estudio. Tanto a las 24 horas como a las 72 horas tras la irradiación la liberación de SDF-1 al sobrenadante fue mayor por parte de las MSC irradiadas con respecto a las MSC control (**Figura 21**), confirmando de este modo lo observado mediante RT-PCR.

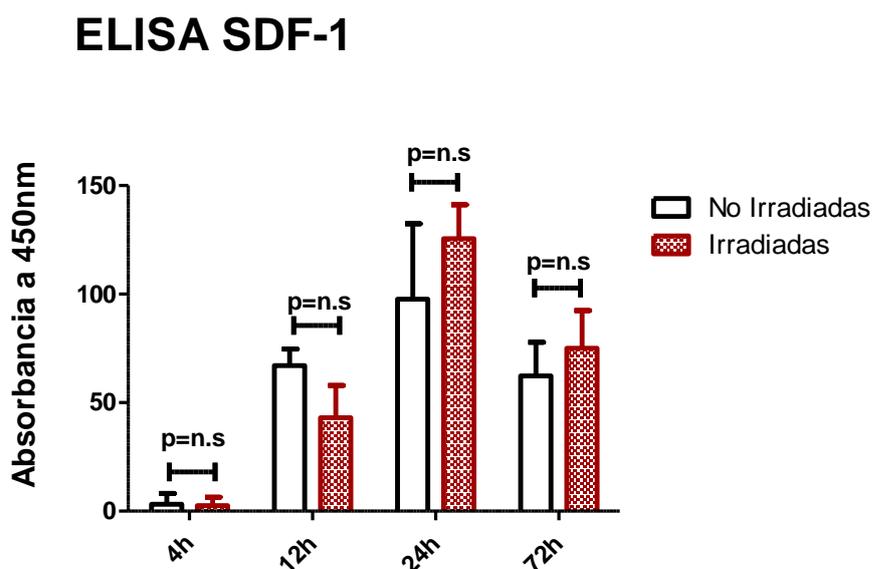


Figura 21. Cuantificación de la liberación de SDF-1 al sobrenadante por parte de MSC control vs MSC irradiadas. Cuantificación de la cantidad de proteína SDF-1 liberada al sobrenadante de MSC control y MSC irradiadas con 2,5Gy a 4, 12, 24 y 72 horas tras la irradiación.

1.6. Capacidad de diferenciación de las MSC irradiadas vs MSC control

Por otro lado, siguiendo otro de los criterios establecidos por la ISCT, se analizó la capacidad de diferenciación multilineal de las MSC. Para ello, después de la irradiación, se indujo la diferenciación a osteoblastos y a adipocitos tanto de las MSC control como de las MSC irradiadas con medios de cultivo específicos. Tras 21 días de cultivo en medio específico de diferenciación a linaje adipocítico, se observó que tanto a las MSC control como las MSC irradiadas eran capaces de diferenciarse a adipocitos observándose en ambas muestras vacuolas lipídicas cuando eran teñidas con Oil-Red. Por otro lado, tras 10 días de cultivo en

medio específico de diferenciación a linaje osteoblástico, se observó que tanto las MSC control como las MSC irradiadas eran positivas a la tinción con fosfatasa alcalina (**Figura 22**).

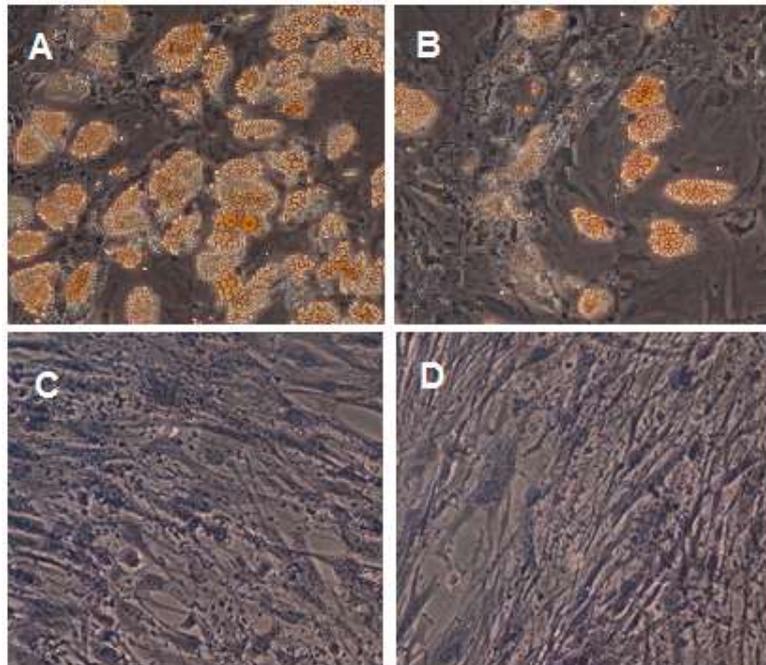


Figura 22. Diferenciación multilineal de las MSC. Imágenes de MSC control (A, C) y MSC irradiadas (B, D) en Fase 3 diferenciadas a adipocitos (A, B) y osteoblastos (C, D). Imágenes tomadas con objetivo de 20X.

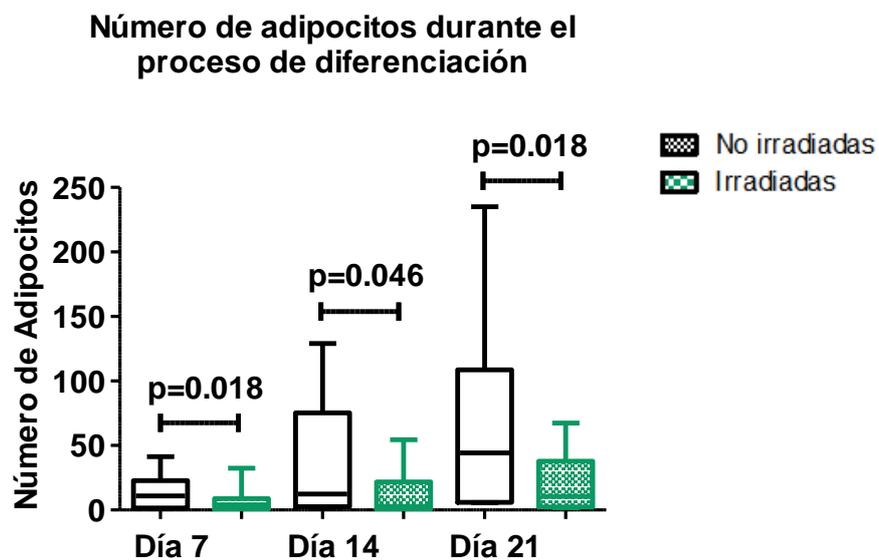


Figura 23. Cuantificación de adipocitos a lo largo del proceso de diferenciación en MSC control vs MSC irradiadas. Contaje del número de adipocitos por placa crecidos en medio de diferenciación adipogénica en MSC control y MSC irradiadas los días 7, 14 y 21 del proceso de diferenciación. El recuento se realizó en 7 muestras.

Con el fin de cuantificar la capacidad de diferenciación adipocítica, se contó el número de adipocitos por campo formados en los días 7, 14 y 21 del proceso de diferenciación (n=7). Para ello, se cuantificaron los adipocitos en 7 campos por placa y se hizo una media de las 7 observaciones. Se observó que, en todos los casos y en todos los tiempos analizados, el número de adipocitos estaba reducido significativamente en las muestras de MSC irradiadas en comparación con las MSC control ($p=0,018$, $p=0,046$ y $p=0,018$, respectivamente) (**Figura 23**).

Quisimos ver a continuación si estas diferencias se mantenían a nivel génico. Para ello, la expresión de algunos genes implicados en diferenciación adipocítica y osteocítica se estudió mediante RT-PCR en MSC basales y en MSC inducidas a la diferenciación (mediante su cultivo en medios de diferenciación específicos durante 21 días). En MSC basales, se observó una infra-expresión de *CEBPA* y *PPARG*, implicados en adipogénesis en las MSC que habían sido irradiadas con respecto a las MSC control ($p=0,003$ y $p=0,019$, respectivamente). Además *RUNX2*, implicado en osteogénesis temprana también se encontraba infra-expresado en MSC irradiadas ($p=0,003$). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de *ALP*. Sin embargo, con respecto a *SPP1*, observamos un aumento significativo de su expresión en MSC irradiadas en comparación con las MSC control ($p=0,039$), y en cuanto a *SPARC* no encontramos diferencias de expresión estadísticamente significativas, ambos implicados en mineralización. En MSC inducidas a la diferenciación los cambios observados fueron similares a los observados en MSC basales excepto que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de genes implicados en adipogénesis (*CEBPA* y *PPARG*) entre MSC control y MSC irradiadas (**Figura 24**).

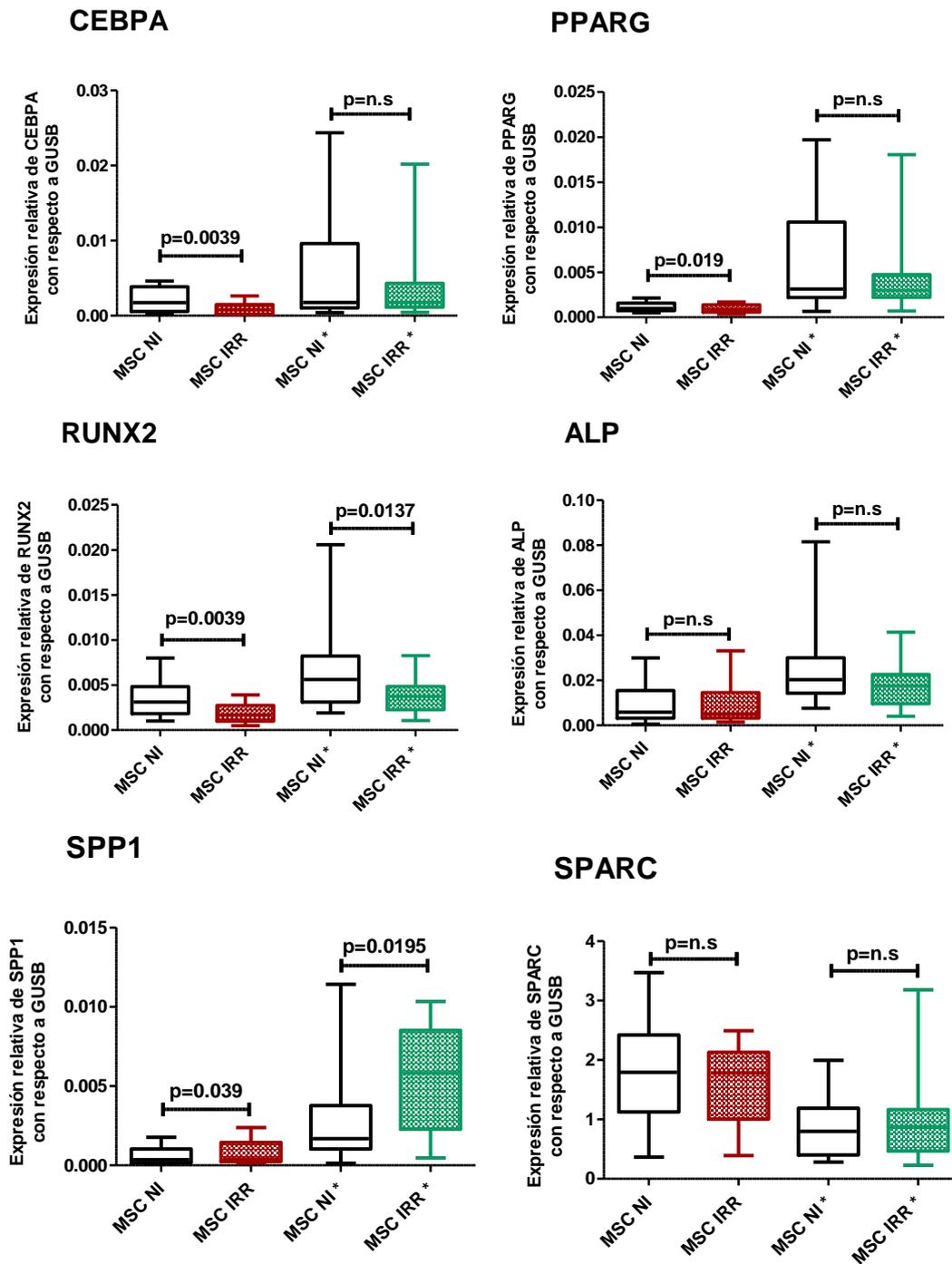


Figura 24. Análisis de la expresión de genes implicados en diferenciación en MSC control vs MSC irradiadas. Análisis de la expresión de *CEBPA* y *PPARG* (implicados en diferenciación adipogénica), *RUNX2* y *ALP* (implicados en osteogénesis temprana) y *SPP1* (implicado en mineralización) mediante RT-PCR en MSC control y MSC irradiadas tres días tras la irradiación. Estos estudios están realizados en MSC basales y MSC a las cuales se les indujo la diferenciación durante 21 días con medio de diferenciación específicos (*). La β -glucuronidasa se empleó como gen control. Para este estudio se emplearon 10 muestras.

A la vista de estos resultados, se cuantificó la capacidad de mineralización de las MSC basales y de las MSC inducidas a la diferenciación (mediante su cultivo en medios de diferenciación específicos durante 21 días) mediante tinción con Rojo de Alizarina (n=10). De esta forma se detectó una cantidad ligeramente superior de depósitos de calcio en las MSC irradiadas con respecto a las control, tanto en las MSC basales como en las MSC inducidas a diferenciación, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (**Figura 25**).

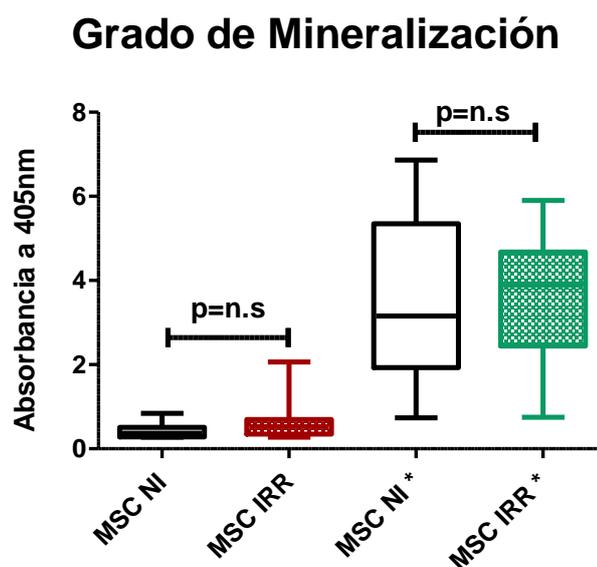


Figura 25. Análisis del grado de mineralización de MSC control vs MSC irradiadas. Cuantificación de los depósitos de calcio mediante tinción con Rojo de Alizarina en MSC control y MSC irradiadas tres días tras la irradiación. En esta tinción, la absorbancia es proporcional a los depósitos de calcio en la muestra y al nivel de mineralización de las células. Estos estudios están realizados en MSC basales y MSC a las cuales se les indujo la diferenciación durante 21 días con medio de diferenciación específicos (*). Para este estudio se emplearon 10 muestras.

1.7. Capacidad de soporte de la hematopoyesis de MSC irradiadas vs MSC control

Para la realización de estos experimentos fue necesario el aislamiento y caracterización de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica movilizada. En todos los casos, las células CD34⁺ se aislaron mediante selección inmunomagnética mediante AutoMACS. De todas las muestras se obtuvo un número suficiente de células para realizar los experimentos y la pureza de las muestras fue superior al 90% (**Figura 26**).

Sangre Periférica movilizada

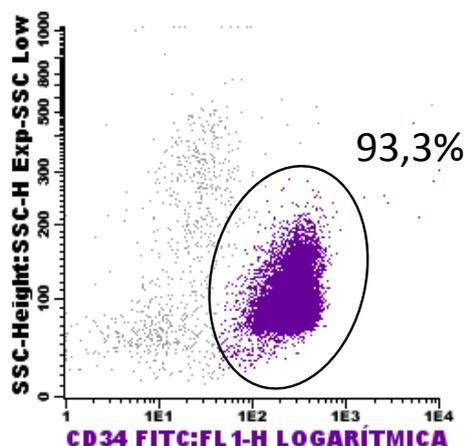


Figura 26. Análisis de la pureza de las células CD34⁺. Caso representativo de la pureza de células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada mediante selección inmunomagnética

Con el fin de analizar si el desbalance en la capacidad de diferenciación de las MSC irradiadas con respecto a las no irradiadas afectaba a su capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis, se realizaron cultivos a largo plazo (n= 8). Para ello, tras crear un estroma formado por MSC irradiadas y un estroma formado por MSC control, se añadieron 300.000 células CD34⁺ aisladas de sangre periférica movilizada a cada uno de los estromas. Los cultivos se mantuvieron durante 5 semanas y cada semana se evaluó la capacidad clonogénica de las CD34⁺ aislando la mitad de las células presentes en el cultivo y sembrando 2.500 en medio semi-sólido de metilcelulosa. Las células CD34⁺ cultivadas sobre los dos estromas formaron un número similar de colonias la primera semana del cultivo. A partir de la segunda semana, el número de colonias contabilizadas a partir de las células CD34⁺ aisladas de los estromas formados por MSC irradiadas fue mayor, llegando a ser estas diferencias significativas en las semanas 4 y 5 del cultivo ($p=0,046$ y $p=0,0078$, respectivamente) (**Figura 27**).

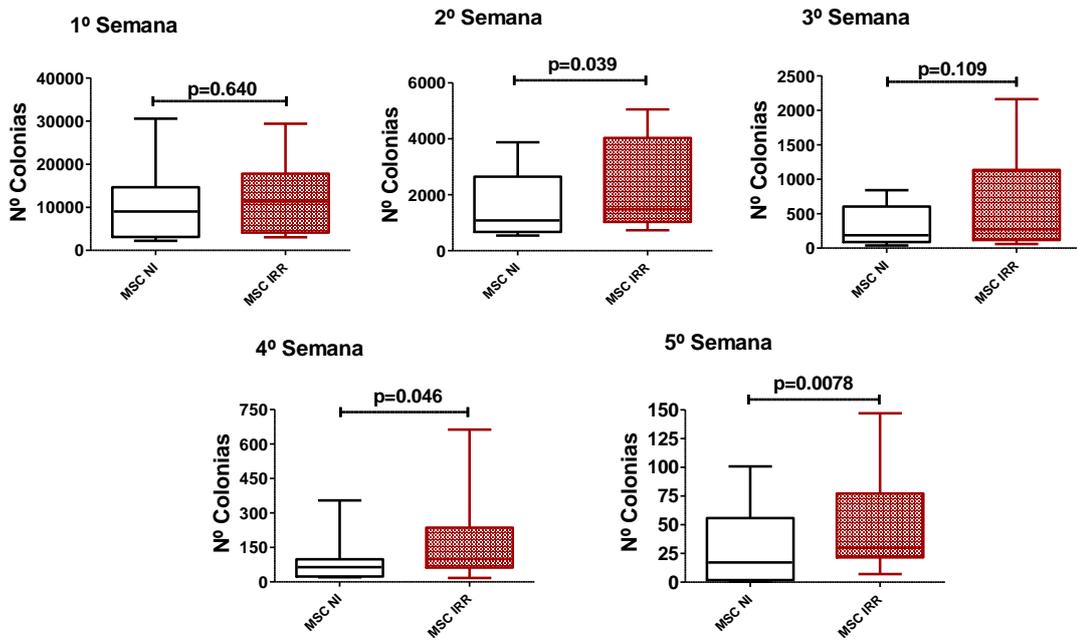
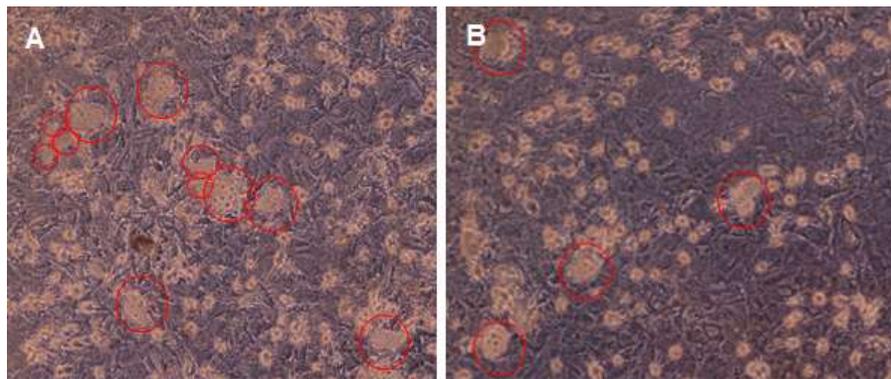


Figura 27. Capacidad de MSC control vs MSC irradiadas para mantener la hematopoyesis en cultivos a largo plazo Representado el número de CFU-GM formadas semanalmente de cultivos a largo plazo.



Número de Adipocitos en estroma de CLP

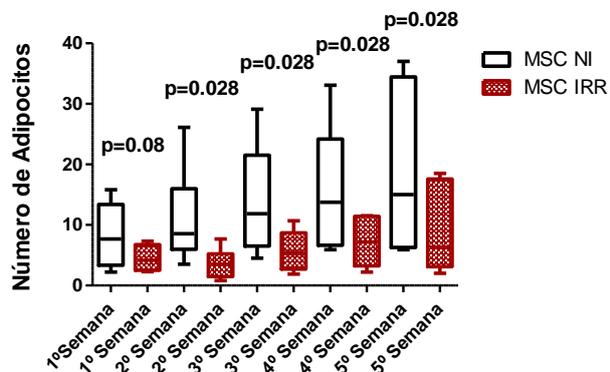


Figura 28. Cuantificación de adipocitos durante 5 semanas en el estroma formado en cultivos a largo plazo. Contaje del número de adipocitos por placa presentes en estromas formados a partir de MSC control y MSC irradiadas semanalmente. Imágenes tomadas con objetivo 10X. El recuento se realizó en 5 muestras.

Además, durante las 5 semanas del cultivo a largo plazo, se analizó el estado de diferenciación tanto del estroma formado por MSC irradiadas como del estroma formado por MSC control (n=5). Durante este tiempo y en todos los casos, el número de adipocitos fue significativamente inferior en los estromas formados a partir de MSC irradiadas con respecto a los estromas formados por MSC control (**Figura 28**).

Por otro lado, se analizó también el estado de diferenciación de estos estromas en la semana 5 del cultivo mediante RT-PCR (n=3). Se detectó una disminución en la expresión de los genes implicados en adipogénesis (*CEBPA* y *PPARG*) y en osteogénesis temprana (*RUNX2* y *ALP*) y un aumento en la expresión de *SPP1*, implicado en osteogénesis tardía y mineralización en las MSC irradiadas en comparación con las MSC control (**Figura 29**), lo que confirma los resultados obtenidos anteriormente.

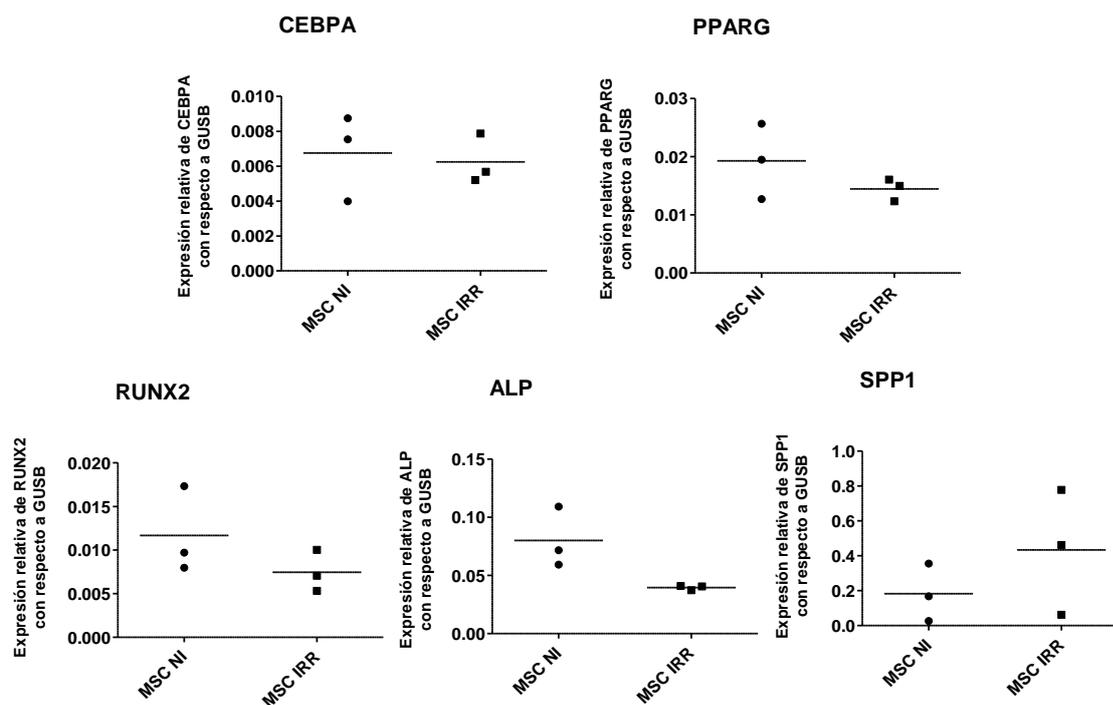


Figura 29. Expresión de genes implicados en diferenciación en estromas de cultivos a largo. Análisis de la expresión de *CEBPA* y *PPARG* (implicados en diferenciación adipogénica), *RUNX2* y *ALP* (implicados en osteogénesis temprana) y *SPP1* (implicado en mineralización) mediante RT-PCR en estromas de cultivos largo plazo formados a partir de MSC control o MSC irradiadas. La β -glucuronidasa se empleó como gen control. Para este estudio se emplearon 3 muestras.

También se analizó el grado de mineralización de estos estromas en las semanas 3 y 5 del cultivo a largo plazo mediante tinción con rojo de Alizarina (n=6). Se detectó que en los dos tiempo de estudio, el grado de mineralización del estroma era mayor en los estromas formados por MSC irradiadas que en los formados por MSC control, encontrando diferencias significativas en la semana 3 ($p=0,046$) (Figura 30).

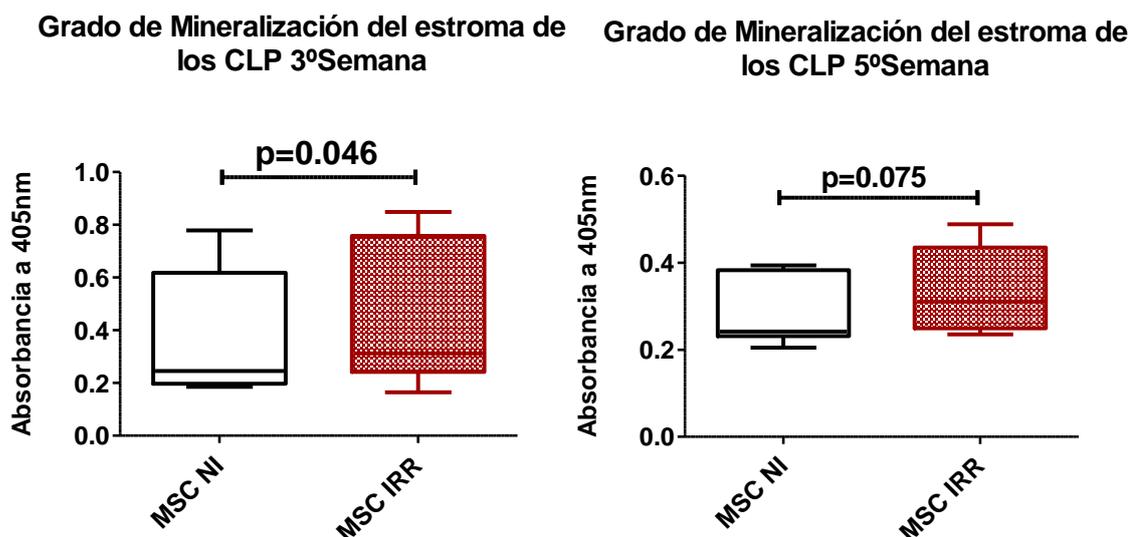


Figura 30. Grado de mineralización de estromas de cultivos a largo plazo. Cuantificación de los depósitos de calcio mediante tinción con Rojo de Alizarina en estromas de cultivos a largo plazo formados por MSC control y MSC irradiadas en la 3ª y 5ª semana de los cultivos. Para este estudio se emplearon 6 muestras.

Capítulo 2

1. Aislamiento y caracterización de VE procedentes de MSC control y MSC irradiadas

Una vez estudiadas las MSC, se aislaron VE tanto de MSC control como de MSC irradiadas con una dosis de 2,5Gy con el fin de caracterizarlas, analizar su contenido y el efecto que tenían al incorporarse a células progenitoras (CD34⁺).

1.1. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

En primer lugar, se analizó la distribución de tamaños y la concentración de partículas obtenidas mediante NTA en 3 muestras. Para ello, se aislaron las VE mediante ultracentrifugación a partir del sobrenadante de 3×10^6 MSC y se resuspendieron en 1 ml de suero fisiológico. Se observó que el tamaño de las partículas era homogéneo entre las muestras con una media de 131,93 nm (124,4 nm-143,6 nm) en las vesículas extracelulares procedentes de MSC control (MSC-VE) y una media de 130,5 nm (122,8 nm-134,7 nm) en las vesículas extracelulares procedentes de MSC irradiadas (IRR-MSC-VE). Además, la concentración de partículas era similar en todas las muestras con una media de $9,09 \times 10^{10}$ partículas/ml en las muestras de MSC-VE y una media de $7,56 \times 10^{10}$ partículas/ml en las muestras de IRR-MSC-VE (**Figura 31**).

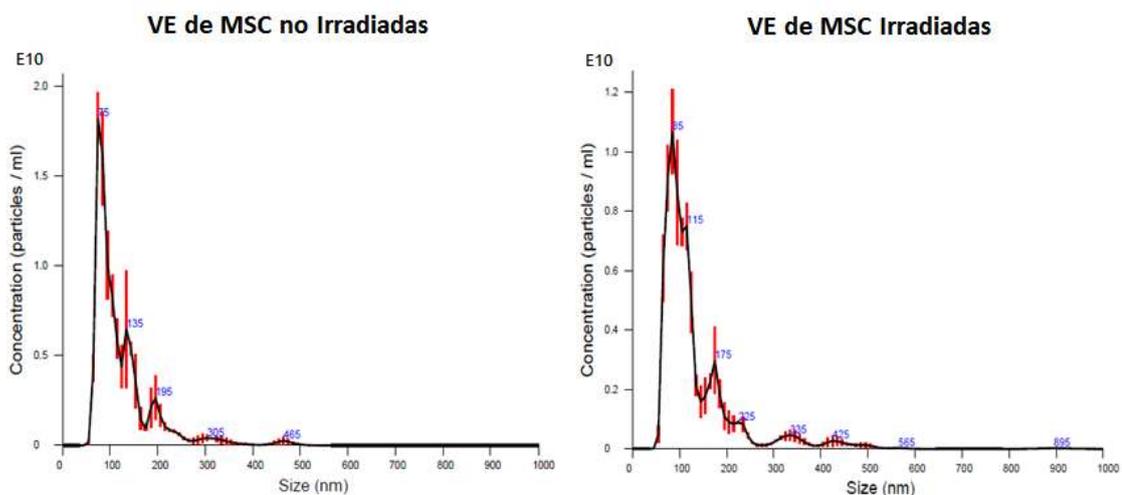


Figura 31. Cuantificación de partículas mediante NTA. Análisis de la distribución de tamaños (nm) y la concentración de partículas (partículas/ml) cuantificadas mediante NTA. Ejemplo representativo de una muestra obtenida de 3×10^6 MSC no irradiadas y una muestra obtenida de 3×10^6 MSC irradiadas.

1.2. Microscopio Electrónico de transmisión (MET)

Además, mediante microscopía electrónica, observamos que tanto las MSC-VE como las IRR-MSC-VE presentaban una morfología redondeada, con centro hipodenso y una membrana doble, característicos de VE (Figura 32).

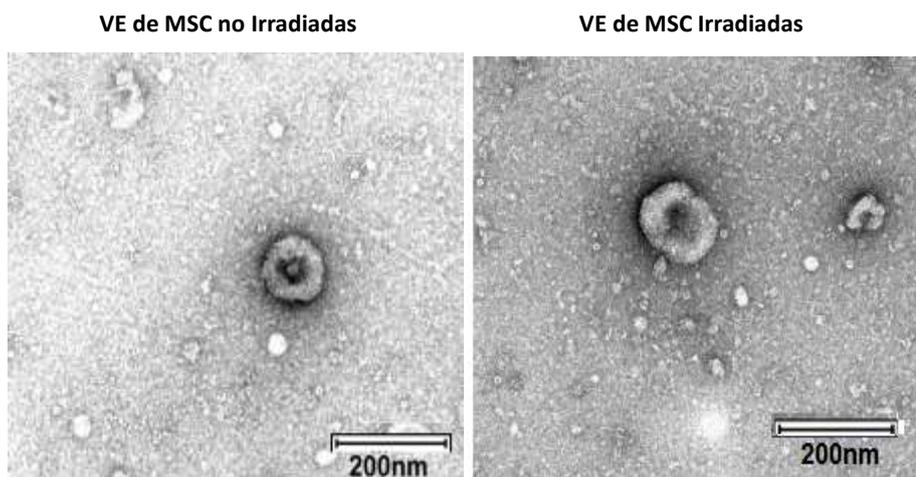
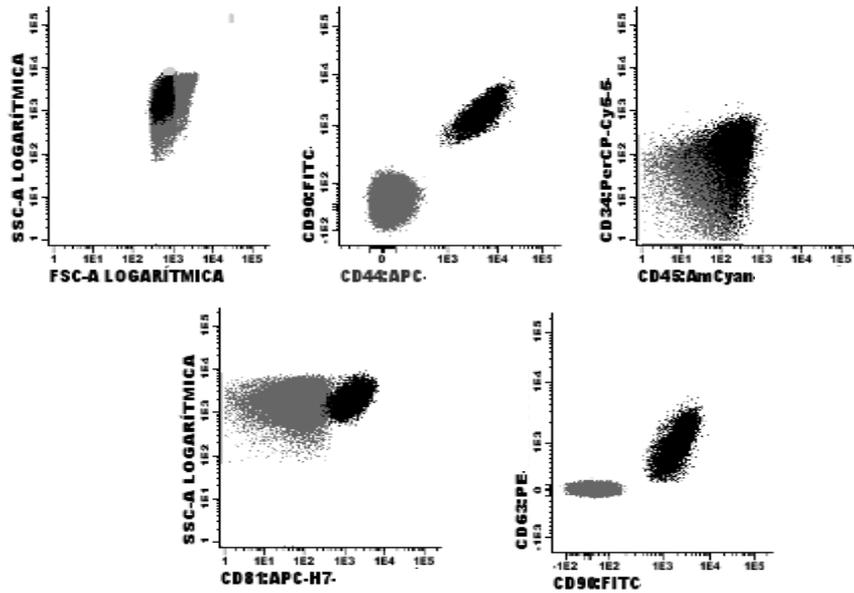


Figura 32. Imágenes representativas de VE tomadas por microscopía electrónica de transmisión. Las muestras que contenían las VE se contrastaron con una solución de uranyl-oxalato y fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión. Escala 200nm, aumento 8.000.

1.3. Citometría de Flujo (CMF)

A continuación, se caracterizaron estas VE mediante citometría de flujo. Para ello, se aislaron mediante ultracentrifugación, se lavaron con PBS en una segunda ultracentrífuga y se marcaron con anticuerpos fluorescentes siguiendo el panel de anticuerpos anteriormente descrito (sección material y métodos). Observamos que tanto las MSC-VE como las IRR-MSC-VE seguían un patrón similar. Presentaban un tamaño menor a 1 μm , eran negativas para marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45, positivas para marcadores característicos de MSC como CD90 y CD44 y para marcadores de exosomas como CD81 y CD63. Se emplearon además VE sin marcar con anticuerpos fluorescentes como control negativo (Figura 33).

VE de MSC no Irradiadas



VE de MSC Irradiadas

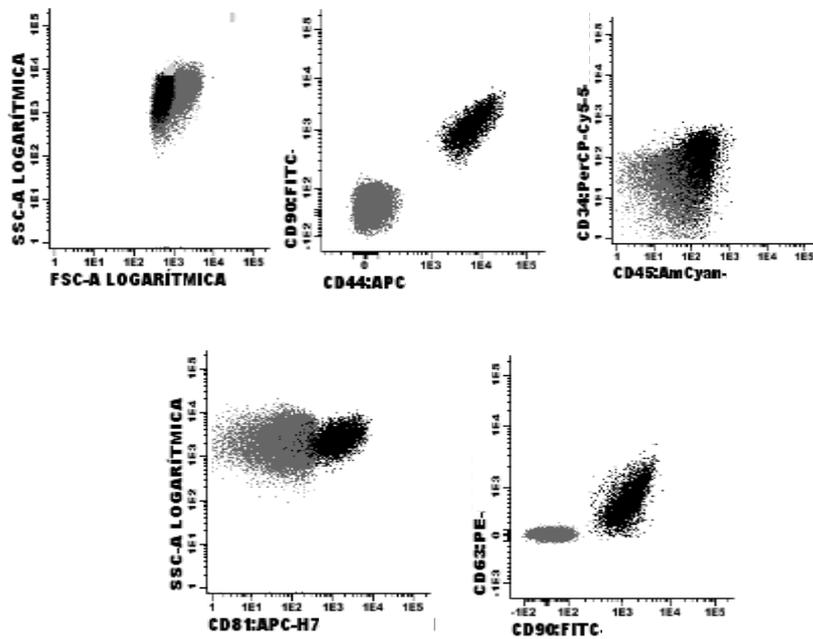


Figura 33. Imágenes representativas de la caracterización mediante citometría de flujo de VE obtenidas de MSC no irradiadas y MSC irradiadas. Se emplearon micro-bolas de $1\mu\text{m}$ de diámetro que facilitaron la localización de las VE (menores de $1\mu\text{m}$) en el dot-plot de *forward* y *side*. En el resto de los gráficos, se observan los marcajes de las VE para marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45), marcadores característicos MSC (CD90 y CD44) y de exosomas (CD81 y CD63) en negro. En gris se muestran los controles negativos, VE sin marcar con anticuerpos.

1.4. Western blot (Wb)

Por ultimo, mediante Western blot se confirmó la expresión de CD63 tanto en las MSC-VE como en las IRR-MSC-VE (**Figura 34**). Todos estos resultados cumplen los criterios establecidos para la caracterización de las VE por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV)¹⁷⁸.

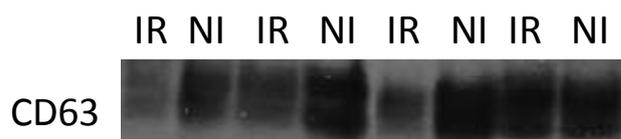


Figura 34. Expresión de CD63 en VE de MSC. Análisis mediante Western blot de la expresión de CD63 en 4 muestras de VE aisladas de MSC control (NI) y 4 muestras de VE aisladas de MSC irradiadas (IRR).

1.5. Análisis de expresión de micro-RNAs en IRR-MSC-VE vs MSC-VE

Con el fin de comparar el contenido en micro-RNAs de las VE procedentes de MSC control y de las VE procedentes de MSC irradiadas, se realizó un análisis del contenido en micro-RNAs de 10 muestras de MSC-VE y 10 muestras de IRR-MSC-VE mediante una plataforma de micro-arrays de baja densidad para el estudio de 384 micro-RNAs.

Como se puede observar en la **Figura 35**, tras un análisis SAM, se encontraron 19 micro-RNAs significativamente infra-expresados en las IRR-MSC-VE con respecto a las MSC-VE. Algunos de ellos como los micro-RNAs 150, 181a, 15, 155, están implicados en hematopoyesis.

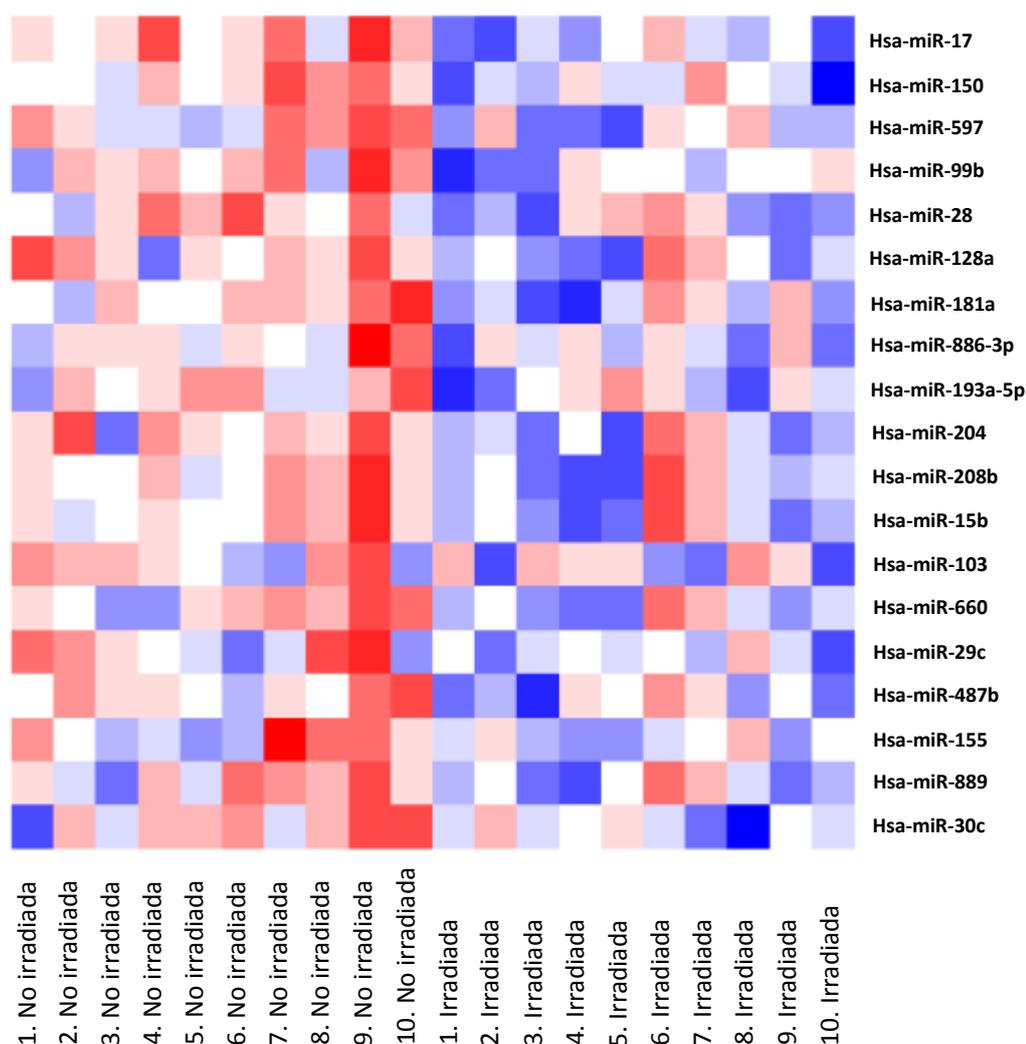


Figura 35. Heatmap de los 19 micro-RNAs que presentan cambios de expresión estadísticamente significativos entre MSC-VE e IRR-MSC-VE. Representación de los 19 micro-RNAs alterados significativamente entre VE aisladas de MSC control con respecto a VE aisladas de MSC irradiadas. Los micro-RNAs infra-expresados se representan en azul y los micro-RNAs sobre-expresados se representan en rojo.

También realizamos el análisis calculando el *Fold Change*. Tras el mismo, se encontraron 3 micro-RNAs con un *Fold Change* mayor de 1,5, lo que se traduce en que presentaban una expresión significativamente mayor en las IRR-MSC-VE con respecto a las MSC-VE (**Tabla 4**).

Tabla 4. Listado de micro-RNAs cuyo Fold Change es >1,5

Micro-RNA	$\Delta\Delta Ct$	Fold Change
Hsa-miR-363	-0,94745	1,92846
Hsa-let-7g	-0,82862	1,77598
Hsa-miR-494	-0,82426	1,77062

Con fin de obtener la máxima información posible de estos microarrays, quisimos conocer que microRNAs eran más abundantes en las MSC-VE. Para ello, elegimos los microRNAs con un valor medio de Ct menor o igual a 30 y cuyos Ct individuales fuesen menores de 35 en al menos 8 de las 10 muestras analizadas. De este modo, obtuvimos una lista de los 19 micro-RNAs más expresados en las MSC-VE (**Tabla 5**).

Tabla 5. Listado de micro-RNAs más expresados en MSC-VE

Micro-RNA	Media Ct	Nº Muestras con Ct<35
hsa-miR-618	17,41696	10
hsa-miR-328	19,80668	10
hsa-miR-523	20,43861	10
hsa-miR-103	22,87642	8
hsa-miR-222	24,4808	10
hsa-miR-518f	25,71819	10
hsa-miR-24	25,97636	10
hsa-miR-628-5p	27,1493	10
hsa-miR-191	27,50362	10
hsa-miR-484	27,67285	10
hsa-miR-155	28,19892	10
hsa-miR-223	28,23622	10

hsa-miR-193b	28,51977	10
hsa-miR-136	28,80625	10
hsa-miR-320	28,82322	9
hsa-miR-574-3p	28,90438	9
hsa-miR-483-5p	29,76862	10
hsa-miR-150	30,07191	10
hsa-miR-454	30,12135	10

De todos estos microRNAs diferencialmente expresados, los micro-RNAs 222, 24, 191, 155, 223 y 150 están directamente implicados en hematopoyesis¹⁷⁹.

2. Aislamiento y caracterización de progenitores hematopoyéticos de SP movilizada y cordón umbilical

En todos los casos, las células CD34⁺ se aislaron de muestras humanas sanas de SP movilizada o cordón umbilical mediante selección inmunomagnética por AutoMACS. En todos los casos la pureza de las muestras fue superior al 90%, tanto en las muestras de SP movilizada como en las de cordón umbilical (**Figura 36**). En este estudio, las muestras de SP movilizada se emplearon para hacer los experimentos *in vitro* mientras que para los experimentos en modelo murino se emplearon muestras de cordón debido a su mejor capacidad de injerto en ratones.

Cordón Umbilical

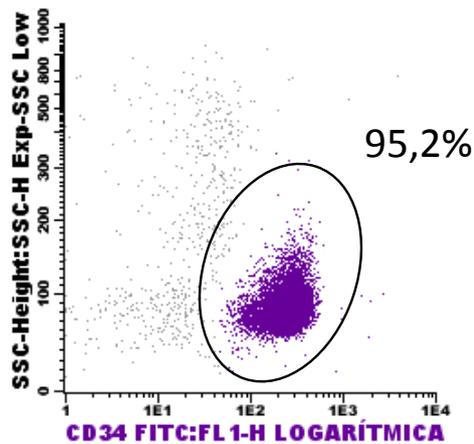


Figura 36. Análisis de la pureza de las células CD34⁺. Caso representativo de la pureza de células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical mediante selección inmunomagnética en AutoMACS analizada mediante citometría de flujo.

3. Incorporación de MSC-VE e IRR-MSC-VE a células CD34⁺

Con el fin de estudiar si las VE secretadas por las MSC control y MSC irradiadas eran capaces de incorporarse a células CD34⁺, las VE de ambas fuentes celulares fueron marcadas con la solución fluorescente *Dye Vybrant dil* (rojo) y, a continuación, fueron co-cultivadas durante 24 horas con las células CD34⁺ aisladas a partir de SP movilizada. La incorporación de las VE liberadas por las MSC en las células CD34⁺ fue analizada tanto por CMF como por microscopía confocal.

3.1. Análisis mediante Citometría de Flujo

En primer lugar, mediante citometría de flujo, se observó que tanto las MSC-VE como las IRR-MSC-VE se habían incorporado a las células CD34⁺. La media del porcentaje de células CD34⁺ que incorporaban VE fue del 40,34% en el caso de las MSC-VE y del 33,56% en el caso de las IRR-MSC-VE. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al

porcentaje de células que habían incorporado VE entre los dos grupos analizados. Como control, las células se cultivaron en las mismas condiciones con medio de cultivo sin VE previamente marcado con la solución *Dye Vybrant dil* y no hubo incorporación, demostrando que la incorporación se detectaba solamente en presencia de VE (**Figura 37**).

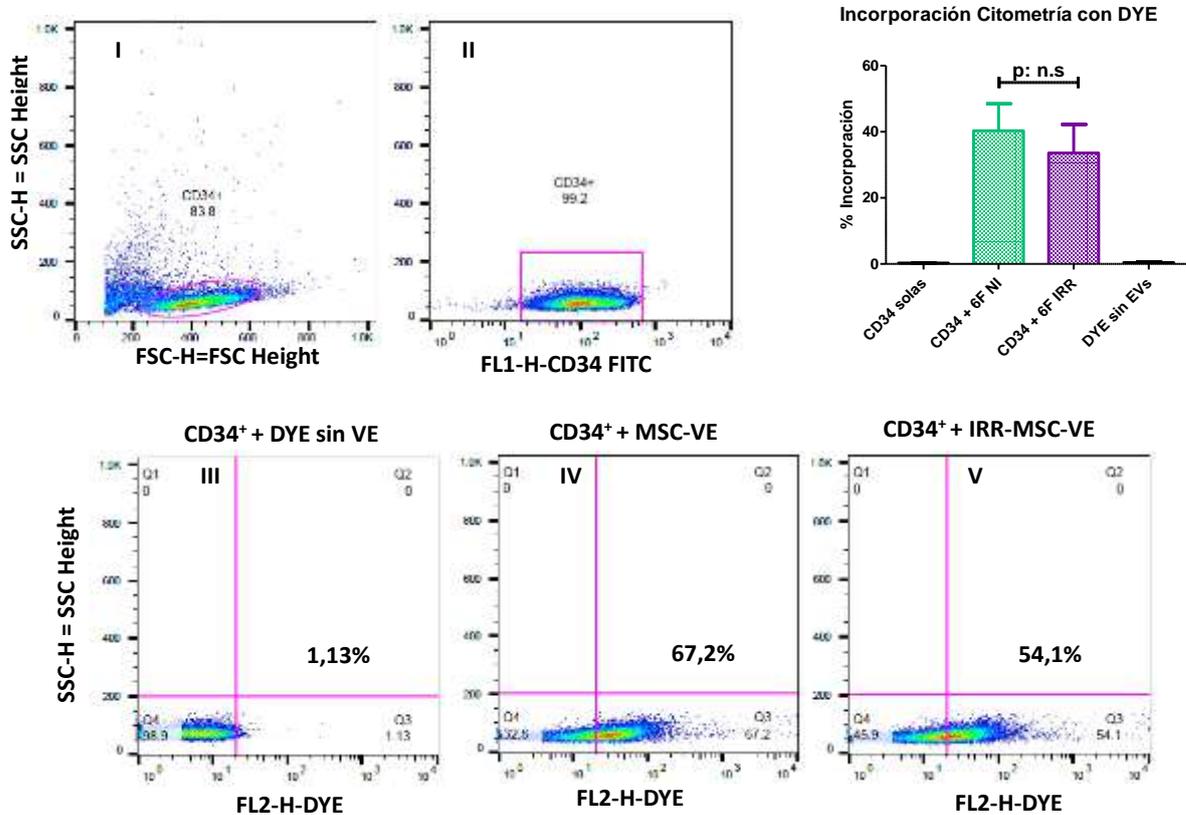


Figura 37. Análisis de la incorporación de VE por células CD34⁺ mediante citometría de flujo. VE previamente teñidas con la solución Dye Vybrant dil se cultivaron con células CD34⁺ durante 24 horas. Imágenes representativas de la incorporación mediante citometría de flujo en 1 muestra. Los dos primeros *dot plots* muestran los ejes *forward* y *side* (I) y la selección de las células que son positivas para el anticuerpo CD34 (II). El resto de los *dot plots* representan el porcentaje de células que han incorporado VE: células CD34⁺ cultivadas con medio de cultivo marcado con Dye Vybrant dil sin VE (III), células CD34⁺ cultivadas con MSC-VE (IV) y células CD34⁺ cultivadas con IRR-MSC-VE (V). Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Calibur.

3.2. Análisis mediante Inmunofluorescencia

Para confirmar los resultados anteriores, se analizó la capacidad de incorporación de las MSC-VE y las IRR-MSC-VE a las células CD34⁺ mediante microscopía confocal y de igual manera se observó que ambos tipos de VE, teñidas en rojo, eran capaces de incorporarse a

estas células, marcadas en verde. Cuando las células CD34⁺ se incubaron solas, en ausencia de VE, solamente se pudo detectar la fluorescencia de color verde (**Figura 38**).

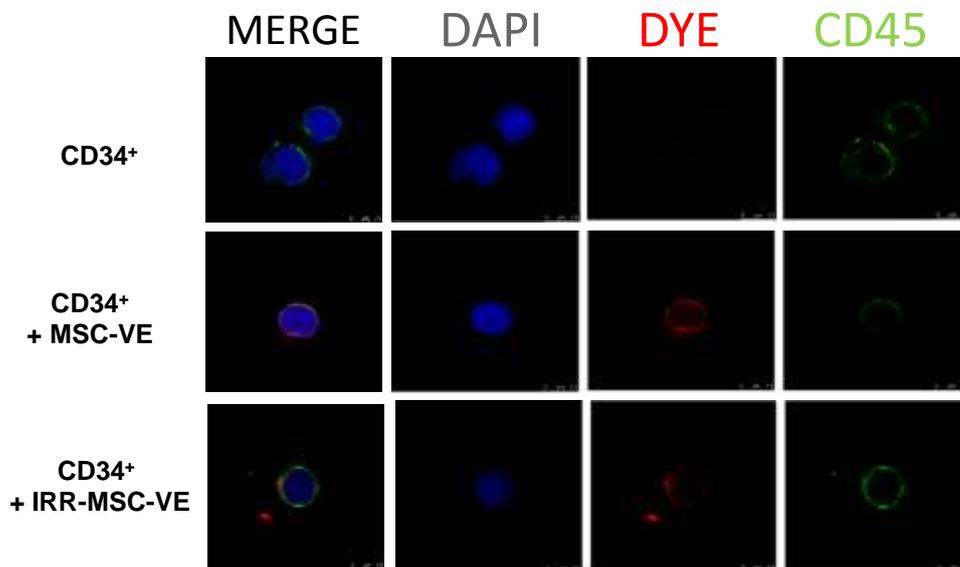


Figura 38. Análisis de la incorporación de VE por células CD34⁺ mediante microscopía confocal. Imágenes representativas de una muestra de la incorporación de VE en células CD34⁺ tras 24 horas de co-cultivo mediante microscopía confocal. Escala 7.5µm. Las células CD34⁺ se marcaron con anticuerpo anti-CD45 (en verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (en azul). Las imágenes de la primera fila representan células CD34⁺ sin VE, las imágenes de la fila central representan células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y las imágenes de la fila de abajo representan células CD34⁺ que han incorporado IRR-MSC-VE.

3.3. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de micro-RNAs

Tras haber observado una infra-expresión de 19 micro-RNAs en las IRR-MSC-VE con respecto a las MSC-VE, se analizó la expresión de algunos de estos micro-RNAs en las células CD34⁺ que habían incorporado dichas VE con el fin de estudiar si estas diferencias se mantenían cuando las células incorporaban las VE. En primer lugar se analizó la expresión de micro-RNAs implicados en hematopoyesis como el micro-RNA 150, el micro-RNA 155, el micro-RNA 181^a y el micro-RNA 17. No se encontraron diferencias de expresión para ninguno de los micro-RNAs estudiados entre las 3 condiciones experimentales de células CD34⁺ (**Figura 39**).

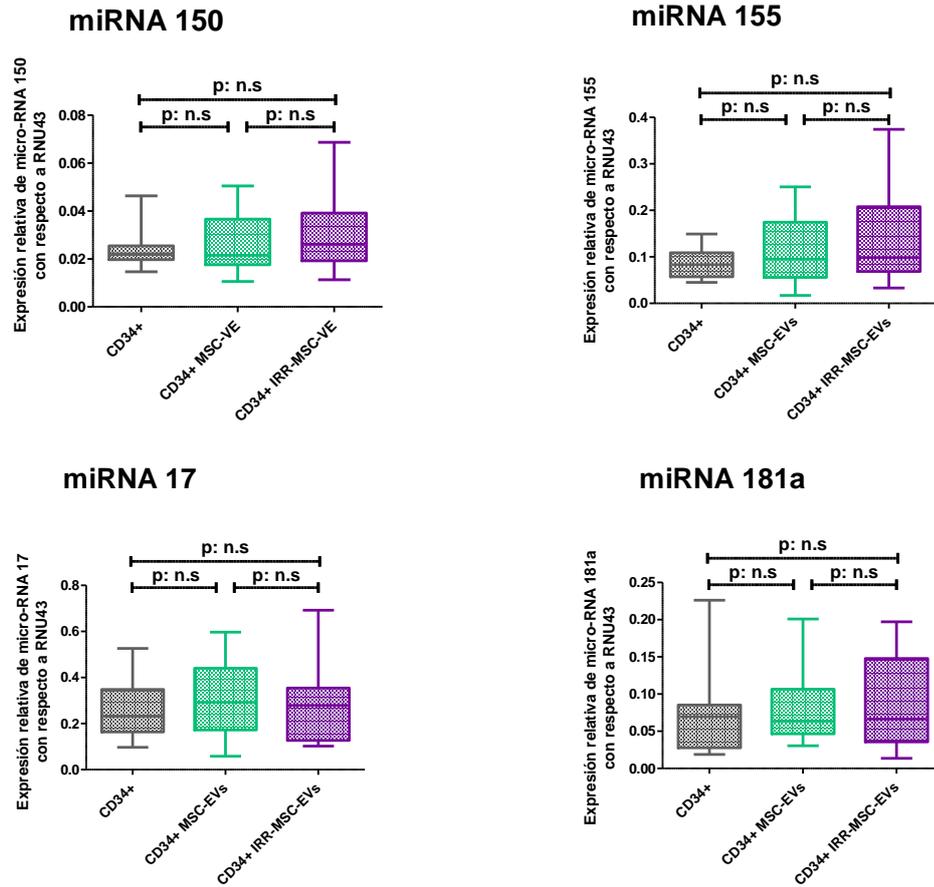


Figura 39. Análisis de expresión de micro-RNAs en células CD34⁺ que han incorporado VE mediante RT-PCR. Análisis de la expresión de micro-RNA 150, 155, 17 y 181a. El micro-RNA U6 se empleó como control. Para este estudio se emplearon 10 muestras

Además se analizó la expresión en las células CD34⁺ de tres micro-RNAs: el micro-RNA 363, el micro-RNA 494 y el micro-RNA Let7g, cuya expresión, era significativamente mayor en las IRR-MSC-VE con respecto a las MSC-VE. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la expresión de ningún micro-RNA entre ninguna de las 3 condiciones de estudio. Como consecuencia, los cambios de expresión de estos micro-RNAs observados entre IRR-MSC-VE y MSC-VE, no se tradujeron después en cambios de expresión en la célula CD34⁺ en las condiciones de estudio planteadas (**Figura 40**).

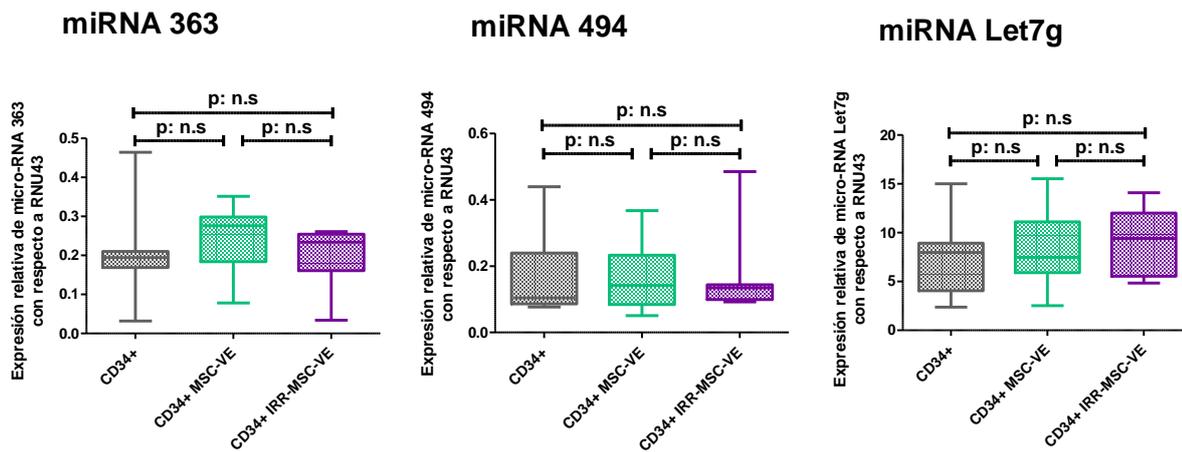
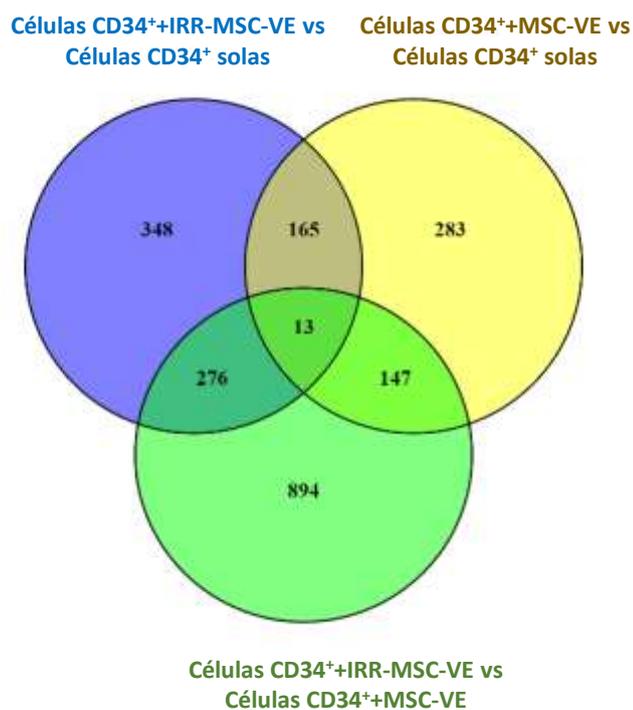


Figura 40. Análisis de expresión de micro-RNAs en células CD34⁺ que han incorporado VE mediante RT-PCR. Análisis de la expresión de micro-RNA 363, 494 y Let7g. El micro-RNA U6 se empleó como control. Para este estudio se emplearon 10 muestras

3.4. Perfil de expresión génica

Con el fin de obtener una visión global con respecto a los cambios inducidos en las células CD34⁺ tras la incorporación de MSC-VE o IRR-MSC-VE, se analizó el perfil de expresión génica de 5 muestras de células CD34⁺ aisladas de SP movilizada, en las 3 condiciones experimentales: solas, tras la incorporación de MSC-VE y tras la incorporación de IRR-MSC-VE. Las muestras se hibridaron sobre un GeneChip human 2.0 de Affimetrix, se escanearon y los datos crudos obtenidos se normalizaron. Mediante un análisis SAM, se encontraron diferencias de expresión estadísticamente significativas en 608 genes entre células CD34⁺ solas y células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE, en 802 genes entre células CD34⁺ solas y células CD34⁺ que habían incorporado IRR-MSC-VE y en 1330 genes entre células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que habían incorporado IRR-MSC-VE de los 7.460 genes analizados tras aplicar los criterios de filtrado establecidos (**Figura 41**).



	Nº Genes Sobreexpresados	Nº Genes Infraexpresados
Células CD34 ⁺ +MSC-VE vs células CD34 ⁺ solas	176	432
Células CD34 ⁺ +IRR-MS-C-VE vs células CD34 ⁺ solas	713	89
Células CD34 ⁺ +IRR-MS-C-VE vs células CD34 ⁺ +MSC-VE	1330	0

Figura 41. Perfil de expresión génica células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporado IRR-MS-C-VE. Diagrama de Venn y tabla representativa del número de genes sobreexpresados e infra-expresados en cada análisis comparativo.

3.4.1. Análisis Comparativo entre células CD34⁺ basales y células CD34⁺ + MSC-VE.

Tras la incorporación de MSC-VE, se encontró una sobreexpresión de 176 genes y una infra-expresión de 432 genes en las células CD34⁺ (**Anexo 4**).

En un análisis posterior de estos genes mediante la aplicación Webgestalt, observamos que estaban involucrados en diversas vías metabólicas. Una de estas vías fue la de la *apoptosis* con 12 genes alterados entre los cuales se encontraron algunos genes pro-apoptóticos infra-expresados como *CASP3* y *CASP6* y varios genes anti-apoptóticos sobre-expresados como *BIRC2*, *BIRC3* y *NFKB* tras la incorporación de MSC-VE en las células CD34⁺. Otra de las vías alteradas fue la *vía JAK-STAT* que, en general, se encontraba sobre-expresada lo que se podría traducir en una activación de la proliferación y el ciclo celular de las células CD34⁺ al incorporar MSC-VE. En la vía del *linaje de células hematopoyéticas* también se encontraron algunos genes sobre-expresados como *IL11*, *CD22* e *IL3RA*, involucrados en la formación de colonias hematopoyéticas. También la vía de receptores de citocinas se encontraba sobre-expresada lo que podría sugerir una activación general de las células CD34⁺ (Figura 42, Tabla 6).

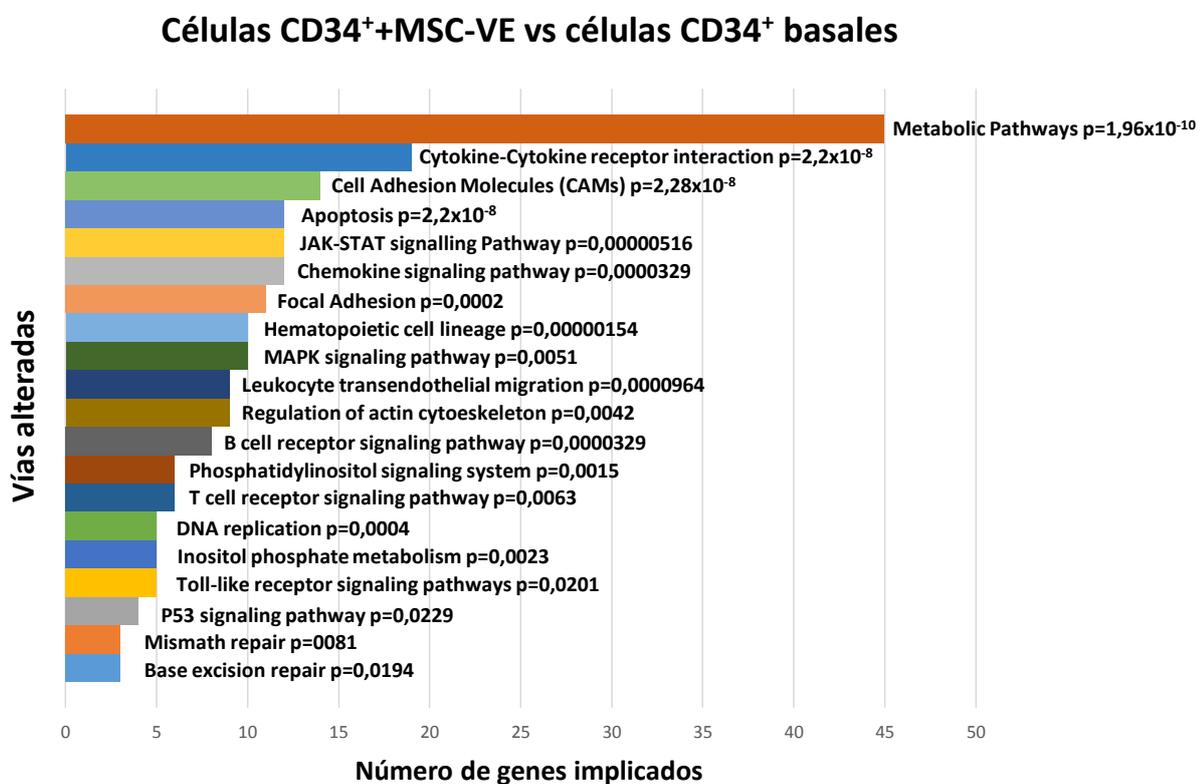


Figura 42. Vías alteradas en células CD34⁺+MSC-VE vs células CD34⁺ solas. Gráfico que representa el número de genes alterados en cada vía. Análisis empleando base de datos KEGG y Webgestalt.

Tabla 6. Listado de vías alteradas en células CD34⁺MSC-VE vs células CD34⁺ basales ordenadas según p-valor ajustado y listado de genes alterados en cada vía.

Vía alterada	Número de genes alterados	pvalor ajustado	Genes alterados
Apoptosis	12	2,2E-08	ENDOD1, CASP3, BIRC3, CASP6, PIK3R1, NFKBIA, IRAK2, NFKB1, PRKAR2B, PIK3CD, BIRC2, PRKACB
Cytokine-cytokine receptor interaction	19	2,2E-08	IL11, CXCL13, IFNGR2, CCR7, TNFRSF21, IL2RG, VEGFA, IL21R, FLT3, IL18R1, IL10RA, CCL4L1, CCL3L3, TNFRSF12A, IL2RA, TNFRSF4, CRLF2, KIT, IL9R
Hematopoietic cell lineage	10	0,00000154	CD37, IL11, ITGA4, CD22, ITGA6, IL2RA, CD44, FLT3, KIT, IL9R
JAK-STAT signalling pathway	12	0,00000516	IL11, IFNGR2, PIK3R1, IL2RG, PIK3CD, IL2RA, CRLF2, JAK3, IL21R, IL9R, IL10RA, SPRY1

3.4.2. Análisis Comparativo entre células CD34⁺ basales y células CD34⁺ + IRR-MSC-VE

Tras la incorporación de IRR-MSC-VE, se encontró una sobreexpresión de 713 genes y una infra-expresión de 89 genes en las células CD34⁺ (**Anexo 4**).

En un análisis posterior se vio que estos genes estaban involucrados en varias vías, la mayoría de ellas se encontraban sobre-expresadas tras la incorporación de las IRR-MSC-VE a las células CD34⁺. Entre estas vías se encontró la vía de la apoptosis con varios genes anti-apoptóticos sobre-expresados como *BIRC2*, *BIRC3*, *NFKB1* y *NFKB1A*. También se encontraron la vía de JAK-STAT, la vía del linaje hematopoyético, la vía de los receptores de citocinas y la vía del proteasoma, todas ellas sobre-expresadas. Además, a diferencia de las MSC-VE, se observó que las IRR-MSC-VE causaban la sobre-expresión de infinidad de moléculas HLA y con ello, la sobreexpresión de vías como las de procesamiento y presentación de antígenos, rechazo de injerto o enfermedad injerto contra huésped (**Figura 43, Tabla 7**).

Células CD34⁺+IRR-MSC-VE vs células CD34⁺ basales

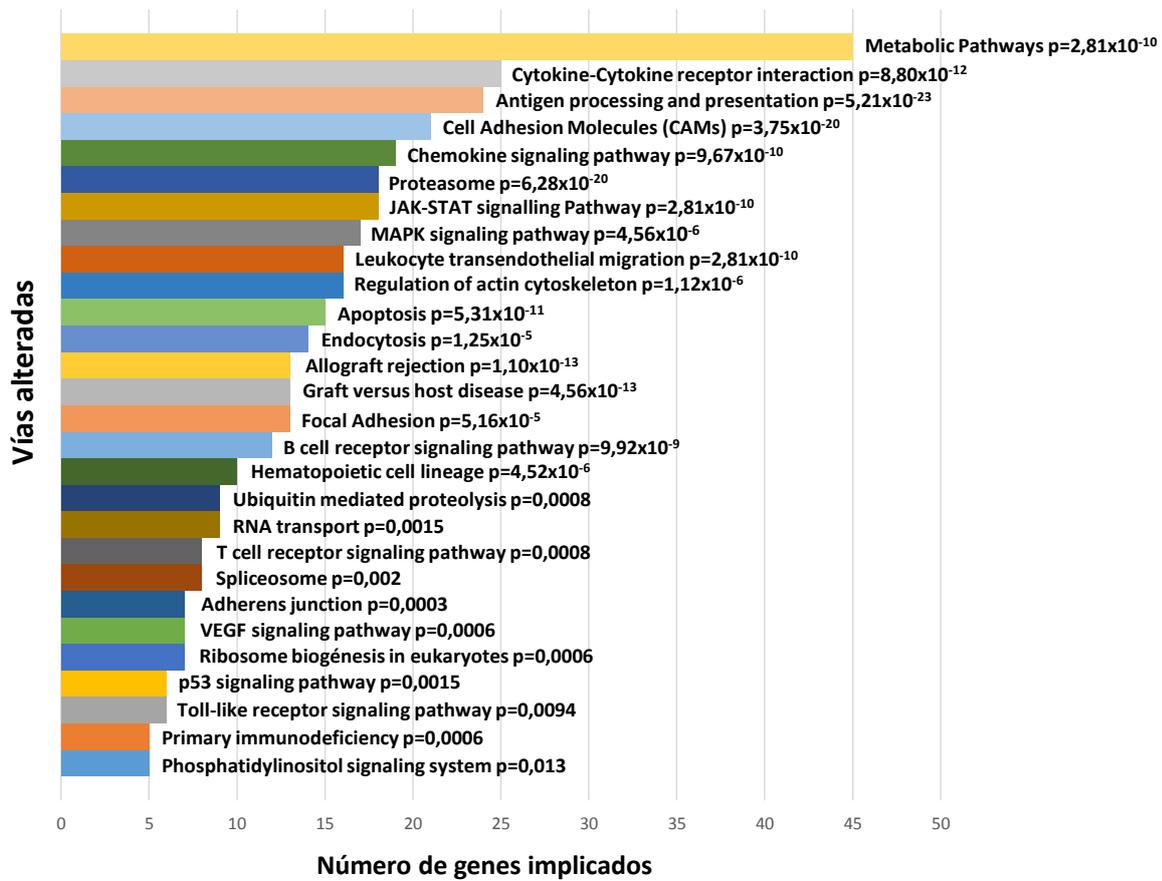


Figura 43. Vías alteradas en células CD34⁺+IRR-MSC-VE vs células CD34⁺ solas. Gráfico que representa el número de genes alterados en cada vía. Análisis empleando base de datos KEGG y Webgestalt.

Tabla 7. Listado de vías alteradas en células CD34⁺+IRR-MSC-VE vs células CD34⁺ basales ordenadas según p-valor ajustado y listado de genes alterados en cada vía.

Vía alterada	Número de genes alterados	Pvalor ajustado	Genes alterados
Antigen processing and presentation	24	$5,21E-23$	HLA-DQA1, PSME2, HLA-F, HSPA5, HSPA8, HLA-DMB, TAP1, PSME1, HLA-A, HLA-DRB1, CALR, HLA-DMA, HLA-DPA1, HLA-B, TAPBP, HLA-DRB4, HLA-DQB1, IFI30, TAP2, HLA-DRB3, HLA-C, LGMN, HLA-DOA, PSME3
Proteasome	18	$6,28E-20$	PSMB1, PSMA3, PSME2, PSMC3, PSMD7, PSME1, POMP, PSMB3, PSMC4, PSMB10, PSMA6, PSMD1, PSMA7, PSMB2, PSMD11, PSME3, PSMA5, PSMB6
Allograft Rejection	13	$1,10E-13$	HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-B, HLA-DRB4, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-F,

			HLA-DMB, HLA-DRB3, HLA-C, HLA-DOA, HLA-A
Graft-versus-host-disease	13	4,56E-13	HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-B, HLA-DRB4, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-F, HLA-DMB, HLA-DRB3, HLA-C, HLA-DOA, HLA-A
Cytokine-cytokine receptor interaction	25	8,80E-12	CXCL13, IFNGR2, CCR7, CCL2, IL2RG, TNFSF10, IFNAR1, VEGFA, IL21R, FLT3, IL18R1, IL3RA, IL10RA, PLEKHO2, CSF2RB, IL6ST, CCL4L1, CCL3L3, TNFRSF12A, IL2RA, CRLF2, TNFSF4, TNFRSF10D, TNFRSF4, CCL1
Apoptosis	15	5,31E-11	CSF2RB, BIRC3, IRAK2, NFKBIA, NFKB1, TP53, AIFM1, ATM, TNFSF10, CYCS, PIK3CD, TNFRSF10D, BIRC2, IL3RA, CFLAR
Jak-stat signalling pathway	18	2,81E-10	IFNGR2, PTPN6, IL2RG, IFNAR1, IL21R, TYK2, IL3RA, IL10RA, CSF2RB, IL6ST, STAT6, STAT1, PIK3CD, IL2RA, PIM1, CRLF2, JAK3, STAT3
Hematopoietic cell lineage	10	4,52E-06	HLA-DRB1, HLA-DRB4, ITGA4, CD22, ITGA5, HLA-DRB3, IL2RA, CD44, FLT3, IL3RA

3.4.3. *Análisis Comparativo entre células CD34⁺ + MSC-VE y células CD34⁺ + IRR-MS-VE.*

Al analizar los cambios en la expresión génica de las células CD34⁺ tras haber incorporado MSC-VE o IRR-MS-VE, se observó que había una sobre-expresión de 1330 genes en el caso de la incorporación de IRR-MS-VE con respecto a la incorporación de MSC-VE (**Anexo 4**).

Analizamos en que vías se veían implicados estos 1.330 genes, todos ellos sobre-expresados con la incorporación de IRR-MS-VE, observamos que estaban implicados en varias vías como la biogénesis de ribosomas, proteasoma, ciclo celular y varias vías relacionadas con la disparidad HLA (**Figura 44, Tabla 8**).

Células CD34⁺+IRR-MS-VE vs células CD34⁺+MS-VE

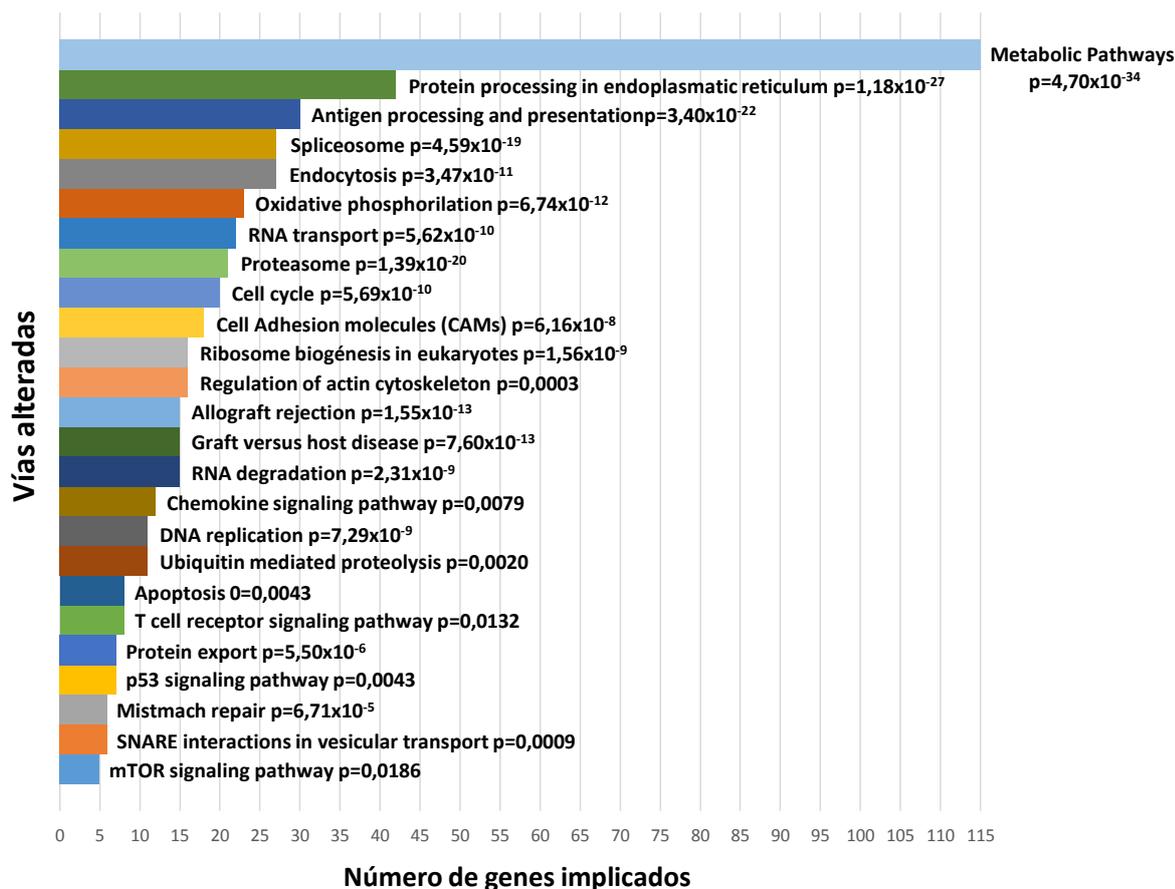


Figura 44. Vías alteradas en células CD34⁺+IRR-MS-VE vs células CD34⁺+MS-VE s. Gráfico que representa el número de genes alterados en cada vía. Análisis empleando base de datos KEGG y Webgestalt.

Tabla 8. Listado de vías alteradas en células CD34⁺+IRR-MS-VE vs células CD34⁺+MS-VE ordenadas según p-valor ajustado y listado de genes alterados en cada vía.

Vía alterada	Número de genes alterados	Pvalor ajustado	Genes alterados
Protein processing in endoplasmic reticulum	42	1,18E-27	SEC13, HSPH1, HSP90B1, DNAJC3, DNAJB1, SEC23B, BCAP31, HSPA1A, OS9, RAD23A, PDIA4, RPN1, EDEM1, SEC24C, DAD1, RAD23B, RPN2, LMAN2, LMAN1, PDIA6, TRAM1, DNAJB12, MBTPS2, SEC61B, HSPA8, HSPA5, SSR2, EIF2AK1, DNAJA1, EDEM2, VCP, HERPUD1, DERL1, STUB1, SEC61A1, DDOST, DERL2, XBP1, EIF2S1, SSR3, SKP1, DNAJA2

Antigen processing and presentation	27	3,40E-22	HLA-DRA, HLA-DQA1, PSME2, HLA-E, HSPA5, HSPA8, RFXANK, TAP1, HSPA1A, HLA-DPB1, HLA-A, HLA-DRB1, HLA-DMA, HLA-DPA1, HLA-B, CTSS, HLA-DRB4, HSPA4, NFYA, HLA-DQB1, HLA-G, IFI30, HLA-DRB3, HLA-C, RFX5, HLA-DOA, PSME3
Proteasome	21	1,39E-20	PSMB1, PSMB4, PSME2, PSMC3, PSMD7, POMP, PSMF1, PSMA4, PSMB3, PSMC4, PSMB10, PSMD2, PSMD1, PSMD13, PSMD3, PSMD8, PSMC2, PSMB2, PSME3, PSMC5, PSMB6
Allograft rejection	15	1,55E-13	HLA-DRB1, HLA-DRA, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-B, HLA-DRB4, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-E, HLA-G, HLA-DRB3, HLA-C, HLA-DOA, HLA-DPB1, HLA-A
Graft versus host disease	15	7,60E-13	HLA-DRB1, HLA-DRA, HLA-DPA1, HLA-DMA, HLA-B, HLA-DRB4, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-E, HLA-G, HLA-DRB3, HLA-C, HLA-DOA, HLA-DPB1, HLA-A
Cell Cycle	20	5,69E-10	MCM6, CDK4, SKP2, DBF4, TP53, CDK7, MCM2, CDC23, YWHAG, MCM4, CCNA2, PCNA, MCM5, E2F4, GADD45B, SKP1, HDAC1, YWHAZ, YWHAB, MCM3
Ribosome biogenesis in eukaryotes	16	1,56E-09	WDR36, NOB1, GNL3, GTPBP4, NAT10, WDR3, POP4, GNL2, NOP58, SBDS, RPP30, EIF6, XRN2, RIOK1, RAN, NOP10

3.5. Relación de micro-RNAs mas expresados en MSC-VE con genes infra-expresados en células CD34⁺ tras la incorporación de MSC-VE

Mediante la aplicación mirPath de Diana Tools se estudió la posible regulación de los 19 micro-RNAs mas expresados en las MSC-VE sobre los 432 genes en los que se detectó una infra-expresión significativa en las células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE con respecto a las células CD34⁺ solas en el array de expresión de genes de Affimetrix (**Tabla 9**).

Tabla 9. Listado de los micro-RNAs más expresados en VE y sus posibles genes diana de entre los genes que se encuentran infra-expresados en las células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE en el array, analizado mediante mirPath

Micro-RNAs mas expresados en MSC-VE	Genes infraexpresados en células CD34⁺ tras la incorporación de MSC-VE
hsa-miR-618	SOX4, NUCKS1, SORL1, CDC23, PSMF1, KIT
hsa-miR-328-3p	ERMP1, PGM5, ELOF1, ANKMY2, COG4
hsa-miR-523-5p	PELI2, MN1, PSMF1
hsa-miR-103a-3p	COPS7A, RMND1, GPN1, NUCKS1, C16orf58, SORL1, CRIM1, CCNA2, GUSB, STOM, ZNF521, WDR54, TIMMDC1, DCXR, TSPAN3, NUP210, TACC3, HERPUD1, GLE1, ERCC3, TUBB, RAVER2, THRA, OSBPL3, GADD45A, MAGED1, CNOT8, ALDH6A1, UNG, SLC25A38, JAKMIP2, FAM69B, TIMM22, ABCB1, CDCA7L, APLP2, TIMM13, RNF20, KLHDC3, SLC25A36, TNFRSF21, SLC35B2, DDOST, CITED2, HIBADH, SPRY1, ESYT2, KLHL9, CDIPT, TXN2, ATG9A, SLC29A3, AHNAK, PRKAR2B, VPS25, ITGA6, C15orf40, NAA38, RPA2, DPY19L3, ZMYND8, MBOAT1, C18orf8, FN3KRP, ANKMY2, SLA2, VCL, ENSA, PIK3R1, SNRPN, PQLC3
hsa-miR-222-3p	ERLIN1, NUCKS1, PELI2, ANXA1, RCSD1, CD164, VCL, PRPS1, MAGED1, SV2A, POLE, CASP3, APLP2, KIT, SLC25A36, PEBP1, COX15, TOM1, UBR7, SESN3, HIST1H4LPSIP1, SLC40A1, ANAPC16, SCD5, OSBPL3, ZNF704, SRD5A3
hsa-miR-518f-3p	ERCC3, PRDX6
hsa-miR-24-3p	ARHGAP1, COPS7A, SOX4, CHST12, BBS2, NUCKS1, MBOAT1, CCNA2, HLA-E, TSPAN3, NUP210, TACC3, GLE1, PREPL, TUBB, MCM5, ATP1B1, CD164, MAGED1, ACAA2, SV2A, SPIN4, UNG, ALDH5A1, GSR, ATP9A, URM1, MRPL16, TBC1D14, BLVRB, GLUL, KLHDC3, FKBP8, SLC25A36, PRIM1, SLC35B2, DDOST, MAP7, CITED2, MPI, SNRPN, SPRY1, SMARCAL1, RRP1B, COX15, KATNB1, ZNF704, PRDX6, BNIP3L, AHNAK, VPS25, TRIM25, CIRBP, ZMYND8, PPP1R3D, CCDC134, NKAIN2, BNIP3L, TRIMM66, PITPNC1, CCDC134, NKAIN2, CD99, ERGIC1, PCYOX1
hsa-miR-628-5p	TSPAN3, TACC3, PBX1, CNOT8, FBN1, SPRY1, ZNF704, BNIP3L, AHNAK, ZMYND8, ZKSCAN1, JAKMIP2, PPP11R3D, TRIM66, ST3GAL1, PRIM1, KIF11
hsa-miR-191-5p	NUCKS1, MRPL37, URM1, FN3KRP, AHNAK, CIRBP, ZKSCAN1, SOX4, C3orf80
hsa-miR-484	SAP18, COX8A, NUCKS1, HIST1H1C, CRIM1, SLC43A1, TSPAN3, TUBB, MCM5, C6orf48, PRPS1, ZNF768, MAGED1, NDFIP1, FAM69B, TYMS, HIST1H3I, IQGAP2, CCDC134, CDCA7L, CABLES1, GLUL, DDOST, RRP1B, SELPLG, RNF167, SLC2A1, RFC5, ATG9A, SESN3, CREG1, AHNAK, NCOA4, HIST1H4L, HIF0, HEXA, GCNT1, ZMYND8, CAMLG, HSH2D, FAM65B, ASH2L, NOB1, ABCA2, RCDS1, ERLIN2, FAM65B, TSR2, SPNS3, PIGP, ASH2L, IGBP1, ENY2, LAIR1
hsa-miR-155-5p	INPP5D, PYGL, NUCKS1, TSPAN3, EEFSEC, ERLIN2, CAT, ALDH5A1, ERMP1, FBN1, MRPL16, CD68, TMEM14C, TBC1D14, KANK2, PDK1, TIMM13, PIK3R1, PCCB, PEBP1, ANTXR2, ERGIC1, AHNAK, XPC, PSIP1, PCYOX1, QPCTL, METTL7A, NOB1, PPP1R3D, ZKSCAN1, ANAPC16,

	ASF1A, NDFIP1, SPIN4, GLUL, SLC25A36, CD99L2, EEPD1, KIAA0087, GPSM2, ZNF385D, GCNT1
hsa-miR-223-3p	NUCKS1, CRIM1, NUP210, DECR1, BLVRB, PPP1R3E, CAT
hsa-miR-193b-3p	NUCKS1, C16orf58, CCNA2, NT5C2, ENDOD1, TACC3, EEFSEC, PBX1, TUBB, MCM5, TPX2, UNG, POLE, ATP9A, TYMS, HIST1H3I, CDCA7L, KANK2, PIK3R1, PRIM1, TNFRSF21, ZNF823, KIF11, DCPS, ESYT2, UBR7, TXN2, RFC5, HIST1H1B, PSIP1, SLC40A1, GPATCH11, AP3M2, SPNS3
hsa-miR-136-5p	GLE1, ERCC3, TMEM38B, POLE, SGIP1, PIK3R1, ARHGEF9, FBN1
hsa-miR-320a	SOX4, NUCKS1, CCNA2, TSPAN3, HERPUD1, PBX1, TUBB, ATP1B1, MLLT3, CD164, OSBPL3, VCL, ENSA, ATP9A, RNF130, HIST1H3I, IQGAP2, PIGP, TBC1D14, GLUL, MPI, RRP1B, PJA2, CDIPT, SLC2A1, PRDX6, ENY2, HIST1H4L, PSMF1, METTL7A, RPA2, SVIL, ZMYND8, SUMF2, PRKACB, ANKRD13A, PELI2, PAIP2B, FAM69B, SGIP1, MN1, FAM8A1, PDK1, RNF20, SLC25A36, PCCB, MAP7, NKAIN2, ZNF704, SSBP2, SESN3, BNIP3L, ITGA4, TCTEX1D1, DPY19L3, BAALC
hsa-miR-574-3p	AHNAK, H1FO
hsa-miR-483-5p	TRIMM66, HSH2D
hsa-miR-150-5p	TRIMM66, FAM32A, GLE1, ERLIN2, SLC25A30, PIGP, PLAC8, PIK3R1, PRIM1, KIAA0087, ERGIC1, ALDH6A1, ATP9A, MN1, PBXIP1, DDOST, FLT3, SLC2A1, ATG9A, FUCA1, ZMYND8
hsa-miR-454-3p	ARHGAP1, SOX4, NUCKS1, BNIP3, TSPAN3, HERPUD1, MRPL37, UQCR10, CCDC134, MAP7, DCPS, UBR7, PRDX6, RPA2, SAP18, THRA, GADD45A, PCYOX1, RPA2, PRKACB

3.6. Viabilidad de células CD34⁺ que han incorporado VE vs células CD34⁺ basales

Como ya se había observado en los resultados de los arrays, tanto la incorporación de MSC-VE como la incorporación de IRR-MSC-VE parecían estar favoreciendo la viabilidad de las células CD34⁺. Con el fin de confirmar estos resultados, se analizó la viabilidad y el porcentaje de muerte de estas células empleando el kit de marcaje de Anexina V y 7AAD para citometría de flujo. Se analizó la viabilidad de las células CD34⁺ tras 24h (n=14) y 48h (n=11) de cocultivo solas, con MSC-VE o con IRR-MSC-VE. Se observó que tras 24h de co-cultivo, todas las condiciones de estudio presentaban una viabilidad alta, un 87% [80.19% - 93.02%] y, por tanto, la incorporación de VE apenas causaba efecto sobre la viabilidad de estas células. Sin embargo, a las 48h, la viabilidad de las células CD34⁺ solas era del 67.28% [63.66% - 72.62%] y la incorporación tanto de MSC-VE como de IRR-MSC-VE incrementaba su viabilidad a 72.19% [67.85% - 83.7%] y 71.64% [68.43% - 76.75%], respectivamente (**Figura 45**).

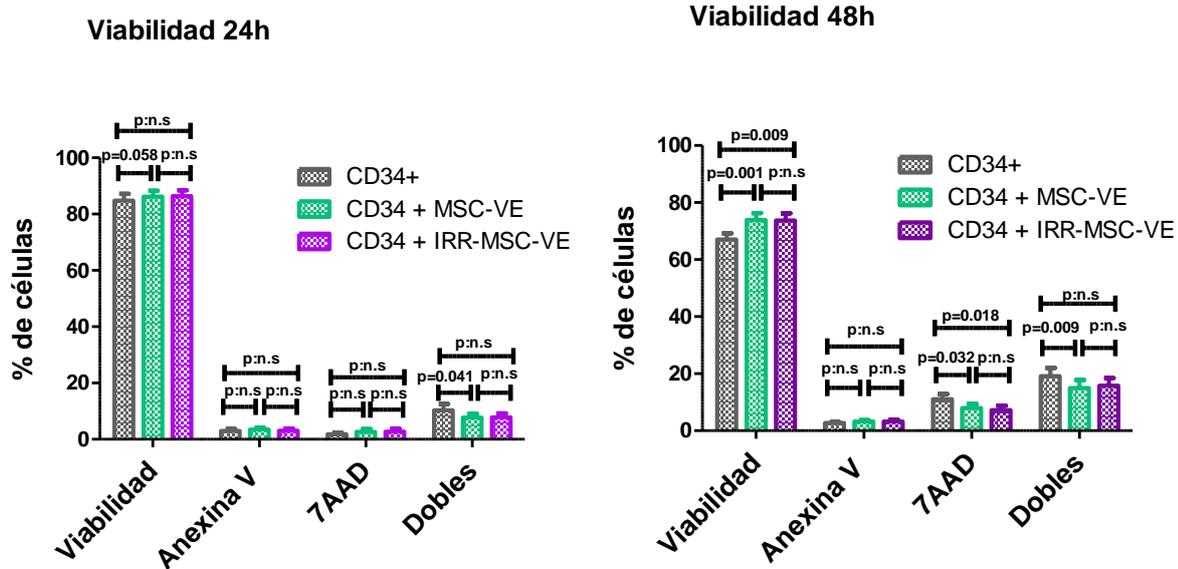


Figura 45. Estudio de viabilidad en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporado IRR-MSC-VE. Ensayo de viabilidad tras 24 horas (n=14) y 48 horas (n=11) de co-cultivo. Las células se incubaron con Anexina V, 7AAD y CD34 y la expresión de los diferentes marcadores se analizó mediante citometría de flujo.

3.7. Activación de Caspasas en células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE vs células CD34⁺ solas

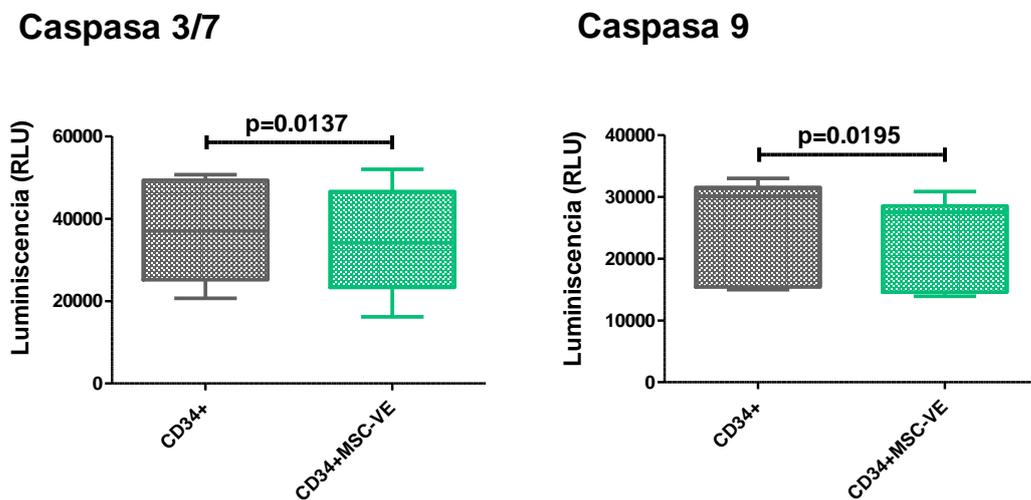


Figura 46. Estudio de activación de caspasas en células CD34⁺ solas y células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE. Análisis de la activación de Caspasas 3/7 y Caspasa 9 tras 24 horas de co-cultivo (n=10) Resultados expresados como RLU (relative light units).

Los estudios genómicos presentaron una disminución de la expresión de caspasas tras la incorporación de VE, para confirmar estos resultados estudiamos si las células que habían incorporado MSC-VE presentaban unos niveles de caspasas activas más bajos que las células CD34⁺ control (n=10). Observamos una disminución estadísticamente significativa tanto de las Caspasas 3/7 como de la Caspasa 9 activas tras la incorporación de MSC-VE (**Figura 46**).

3.8. Fosforilación de STAT 5 en células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE vs células CD34⁺ basales

Puesto que en el análisis de los arrays se había observado una sobre-expresión general de la vía JAK-STAT, quisimos analizar los niveles de STAT5 fosforilado mediante Wes Simple. Tras un análisis cuantitativo mediante el software Compass, detectamos que el ratio STAT5 fosforilado/STAT5 aumentaba en todos los casos en los que las células CD34⁺ habían incorporado MSC-VE con respecto a las CD34⁺ control, aunque el aumento era muy heterogéneo entre las diferentes muestras de MSC-VE (**Figura 47**).

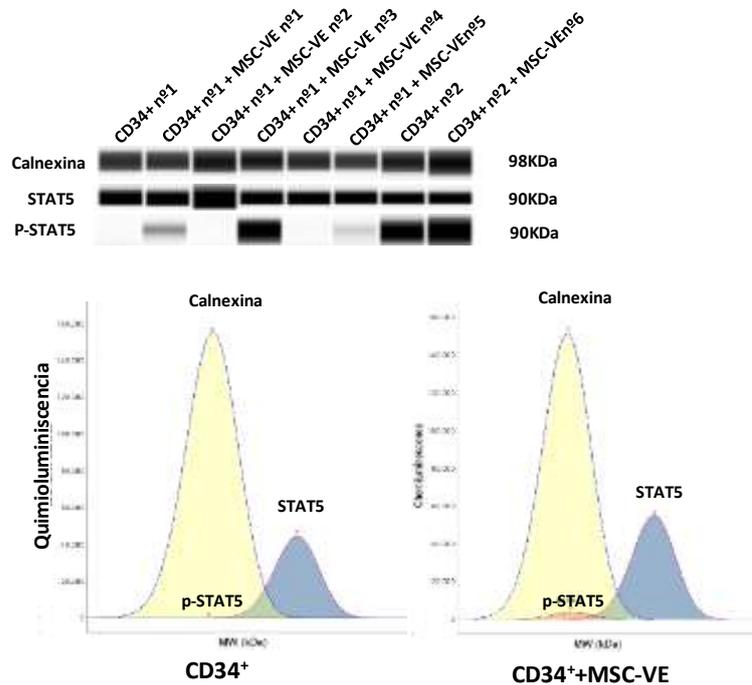


Figura 47. Análisis de la fosforilación de STAT 5 mediante Wes Simple en células CD34⁺ solas y células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE. Resultados de la cuantificación de calnexina, STAT 5 y STAT5 fosforilado en células CD34⁺ visualizado en blots virtuales tras 24 horas de co-cultivo con MSC-VE o solas (arriba). Picos de expresión de calnexina, STAT5 y STAT 5 fosforilada en una muestra representativa de células CD34⁺ solas y células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE (abajo). Ambas imágenes se obtuvieron mediante un análisis con la herramienta Compass Software.

3.9. Capacidad proliferativa de células CD34⁺ que han incorporado VE vs células CD34⁺ basales

Con el fin de profundizar más en el efecto de la incorporación de VE en las células CD34⁺, se estudió también como afectaba la incorporación de MSC-VE e IRR-MSC-VE al ciclo celular en 11 muestras de células CD34⁺. Tras 24h de co-cultivo con cualquier tipo de VE, se observó un incremento en el porcentaje de células en fase S con respecto a las células CD34⁺ basales siendo más evidente cuando las células CD34⁺ incorporaban IRR-MSC-VE ($p=0,048$). Además, en ambos casos se detectó una disminución significativa del porcentaje de células en fase G₀/G₁ ($p=0,032$ and $p=0,020$) con respecto a las que habían sido cultivadas en ausencia de VE. No se observaron diferencias significativas entre el cultivo con MSC-VE o con IRR-MSC-VE en ningún caso (**Figura 48**).

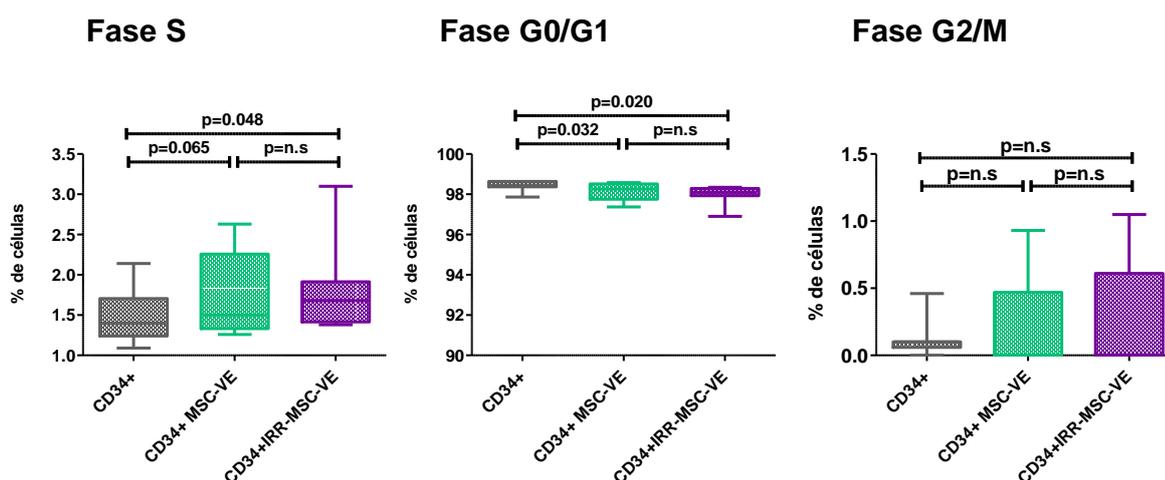


Figura 48. Análisis de proliferación de células CD34⁺ basales, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporado IRR-MSC-VE. Estudio del ciclo celular en células CD34⁺ tras 24 horas de co-cultivo con MSC-VE e IRR-MSC-VE mediante citometría de flujo. Datos representados como porcentaje de células en cada fase. Datos analizados en 11 muestras.

3.10. Análisis de expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ que han incorporado VE vs células CD34⁺ solas

RT-PCR

Estudiamos si la incorporación de VE variaba la expresión de genes implicados en hematopoyesis en las células CD34⁺ mediante RT-PCR (n=10). Observamos que tanto la expresión de *SDF1* como la de *COL1A1* aumentaba significativamente tras la incorporación de cualquiera de los dos tipos de VE, sin diferencias significativas entre ellas (**Figura 49**).

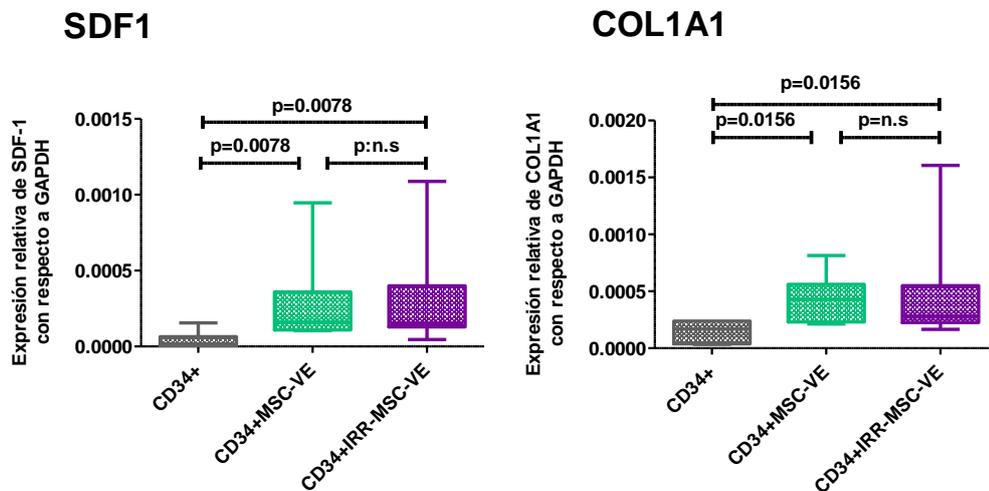


Figura 49. Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE mediante RT-PCR. Análisis de la expresión de *SDF-1* y *COL1A1* mediante RT-PCR tras 24 horas de co-cultivo. *GAPDH* se empleó como gen control. Para este estudio se emplearon 10 muestras.

Citometría de Flujo y Western blot

Se analizó también la expresión proteica de algunas moléculas en células CD34⁺. Se detectó tanto un aumento significativo de la expresión de CD44 como una disminución significativa de la expresión de cKIT con la incorporación tanto de MSC-VE como de IRR-MSC-VE, sin diferencias significativas entre ambos tipos de VE. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CXCR4 e ITGA4 entre ninguna de las tres condiciones experimentales analizadas (**Figura 50**).

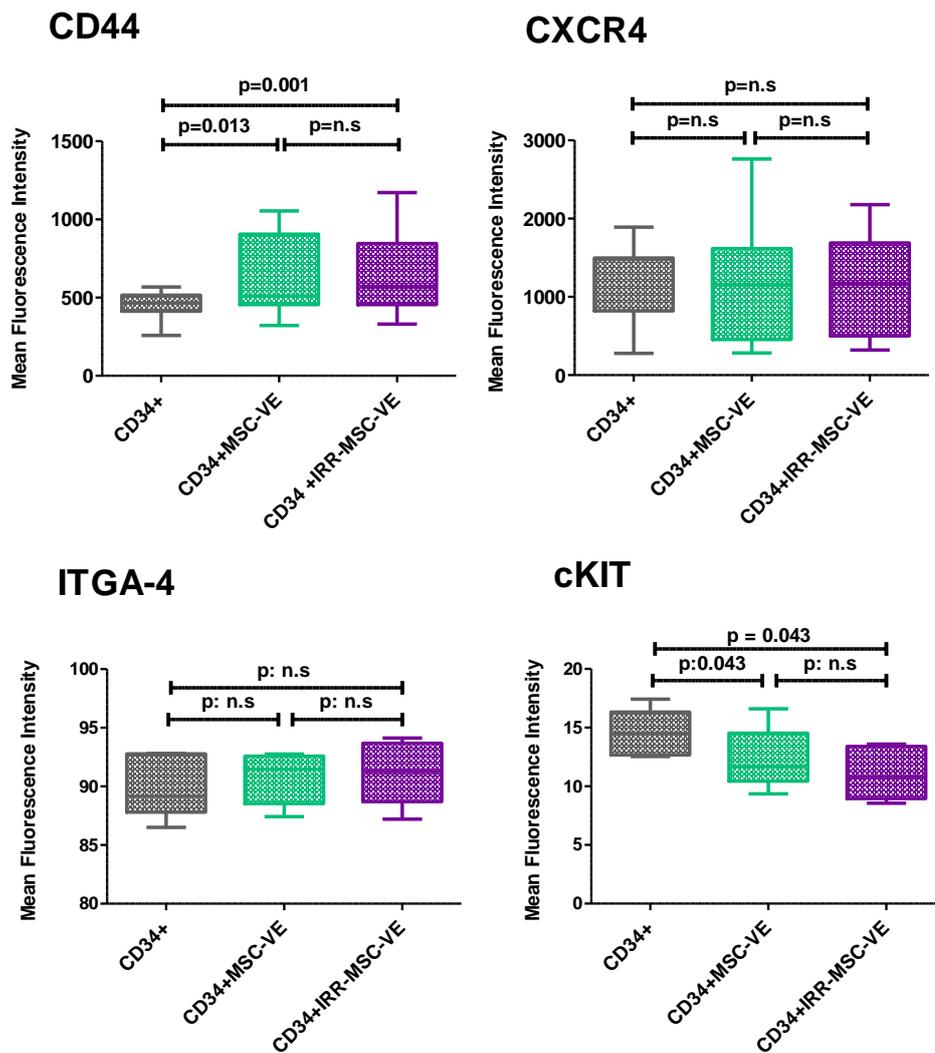


Figura 50. Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE mediante citometría de flujo. Análisis de la intensidad media de fluorescencia de proteínas implicadas en hematopoyesis como CD44, CXCR4, ITGA4 y cKIT mediante citometría de flujo tras 24 horas de co-cultivo. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Calibur Para este estudio se emplearon 10 muestras.

La expresión proteica de CXCR4 y cKIT se confirmó mediante WES Simple (n=6) (**Figura 51**).

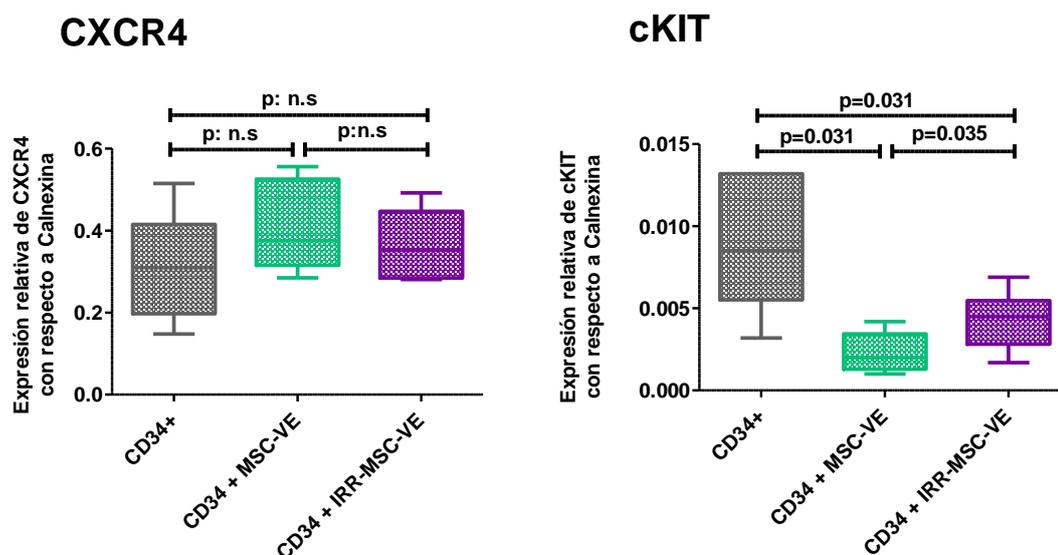


Figura 51. Análisis de la expresión de genes implicados en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE mediante WES simple. Análisis de la expresión relativa de CXCR4 y cKIT con respecto a calnexina en células CD34⁺ tras 24 horas de co-cultivo con VE. Para este estudio se emplearon 6 muestras.

3.11. Capacidad clonogénica de células CD34⁺ que han incorporado VE vs células CD34⁺ basales

Tras la confirmación de la variación tanto génica como proteica de moléculas implicadas en hematopoyesis quisimos estudiar el efecto de la incorporación de VE a las células CD34⁺ en cuanto a su capacidad clonogénica. Cultivamos las células en las 3 condiciones experimentales (solas, con MSC-VE o con IRR-MSC-VE) durante 24 horas, tras las cuales se analizó su capacidad de formar colonias (n=10). Observamos que la capacidad de las células CD34⁺ para formar colonias CFU-GM aumentaba significativamente con la incorporación de VE tanto MSC-VE como IRR-MSC-VE (p=0,032 y p=0,024, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de VE. Tampoco detectaron diferencias en el tamaño y forma de las colonias entre los diferentes grupos de estudio (**Figura 52**).

Nº Colonias

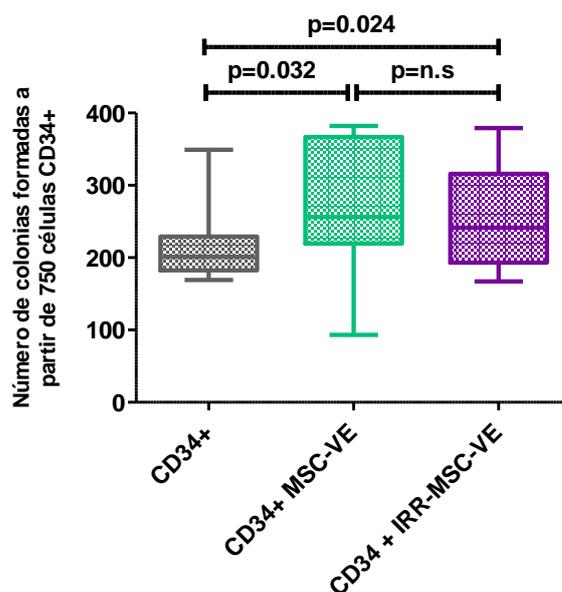


Figura 52. Análisis de la capacidad clonogénica de células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE y células CD34⁺ que han incorporados IRR-MSC-VE. Total de colonias CFU-GM formadas por las células CD34⁺ tras 14 días de cultivo en medio de metilcelulosa. El análisis se realizó en 10 muestras.

3.12. Modelo murino

Por último, con el fin de analizar si todas estas alteraciones causadas en las células CD34⁺ tras la incorporación de VE *in vitro*, tenían consecuencias funcionales *in vivo* en relación con su capacidad de injerto, se desarrolló un modelo murino de xenotrasplante hematopoyético. Para ello, inyectamos células CD34⁺ humanas co-cultivadas durante 24 horas en las 3 condiciones (solas, con MSC-VE o con IRR-MSC-VE) en el fémur derecho de ratones NOD-SCID. Cuatro semanas después analizamos el quimerismo humano en MO de fémur inyectado (derecho), fémur no inyectado (izquierdo) y en bazo mediante citometría de flujo (n=10). La capacidad de injerto de las células humanas se representó como el porcentaje de célula CD45⁺ humanas del total de células analizadas. En cuanto a los fémures derechos, se observó que el porcentaje de células CD45⁺ humanas era significativamente superior en los ratones que habían sido trasplantados con células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE (p=0,027) o IRR-MSC-VE (p=0,002) en comparación con las células CD34⁺ solas. No se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de VE. En cuanto al análisis de los

fémures izquierdos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de quimerismo humano entre las 3 condiciones analizadas. En bazo se detectó un aumento del porcentaje de células CD45⁺ humanas cuando las células CD34⁺ habían incorporado IRR-*MSC-VE* en comparación con las células solas ($p=0,0039$) o con *MSC-VE* ($p=0,0283$) (**Figura 53**).

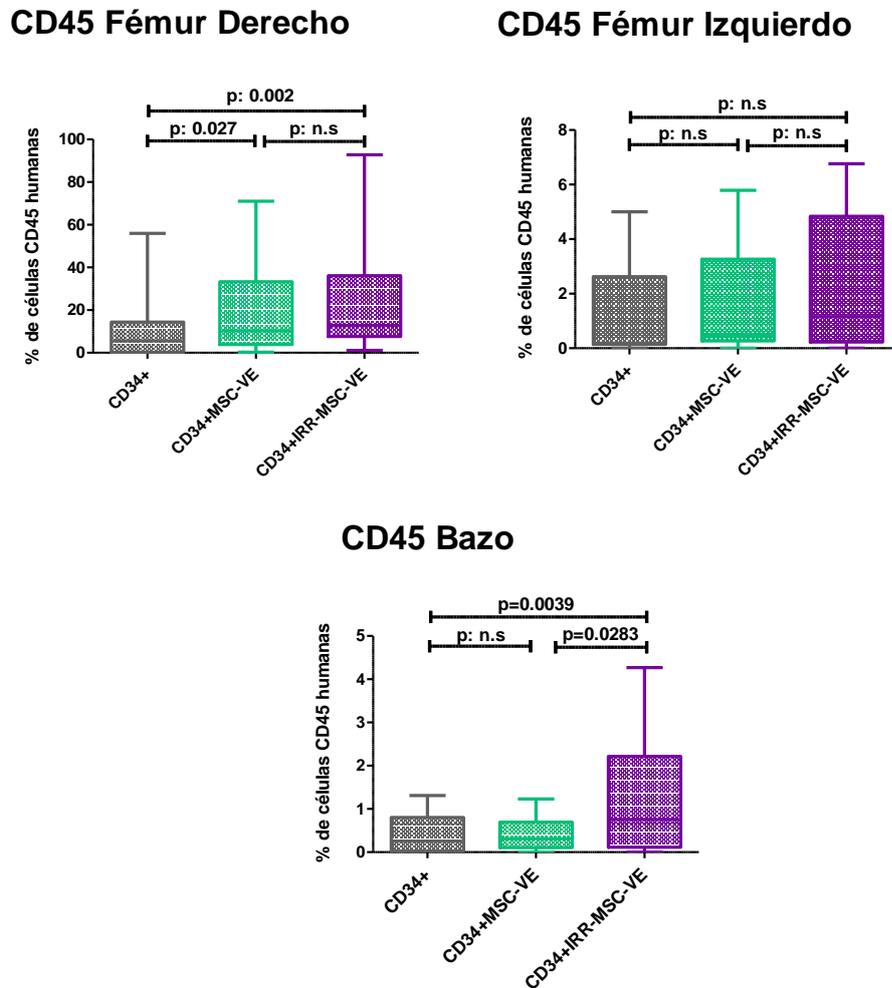
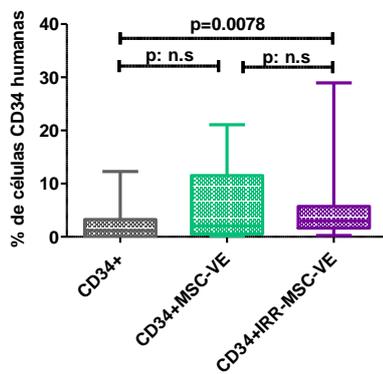


Figura 53. Análisis del injerto de células CD34⁺ humanas solas, células CD34⁺ que han incorporado *MSC-VE* y células CD34⁺ que han incorporado *IRR-MS-VE* en ratones *NOD/SCID*. Porcentaje de células CD45⁺ humanas en el total de células analizadas aisladas de MO de fémur derecho (inyectado), fémur izquierdo (contralateral) y bazo mediante citometría de flujo 4 semanas después del trasplante. Los datos representan la mediana de 10 experimentos.

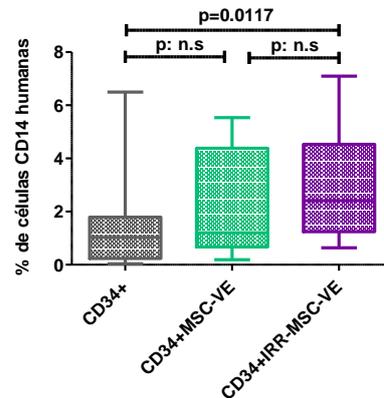
Además, se analizó el injerto humano de cada linaje hematopoyético por separado, determinando cada linaje por sus marcadores específicos. Este análisis se realizó únicamente en los fémures derechos, en los que se había realizado la inyección de las células debido a que

estos fémures presentaban un porcentaje de células humanas mayor. Se detectó un injerto significativamente mayor de células CD34⁺, CD14⁺ y CD19⁺ en los ratones trasplantados con células CD34⁺ que habían incorporado IRR-MSC-VE en comparación con los que habían sido trasplantados con células CD34⁺ solas (p=0,0078, p=0,0117 y p=0,0391). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el injerto de células mieloides, CD13⁺ (Figura 54).

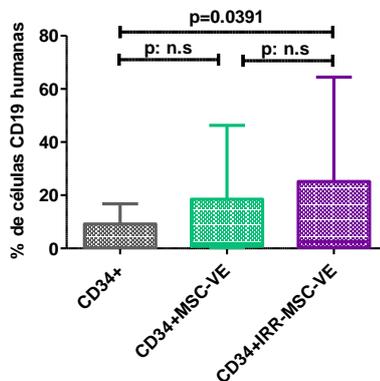
CD34 Fémur Derecho



CD14 Fémur Derecho



CD19 Fémur Derecho



CD13 Fémur Derecho

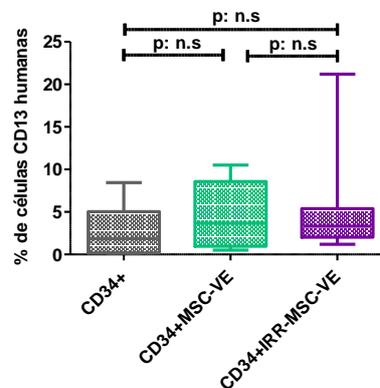


Figura 54. Análisis del injerto de distintas subpoblaciones de células hematopoyéticas humanas en ratones NOD/SCID. Porcentaje de distintas subpoblaciones de células hematopoyéticas humanas (CD34, CD14, CD13 y CD19) en MO de fémur derecho (inyectado) analizado mediante citometría de flujo 4 semanas después del trasplante. Los datos representan la mediana de 10 experimentos.

Capítulo 3

1. Caracterización de VE aisladas a partir de distintas dosis de MSC mediante NTA

En este estudio, se analizó el efecto que diferentes dosis de VE procedentes de diferente cantidad de MSC podrían tener al incorporarse a células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical, en concreto las MSC-VE aisladas a partir de 3×10^6 MSC (6 flask de 75cm² al 60% de confluencia) y de 9×10^6 MSC (18 flask de 75cm² al 60% de confluencia).

En primer lugar, se analizó la distribución de tamaños y la concentración de partículas obtenidas en las diferentes dosis mediante NTA en 3 muestras.

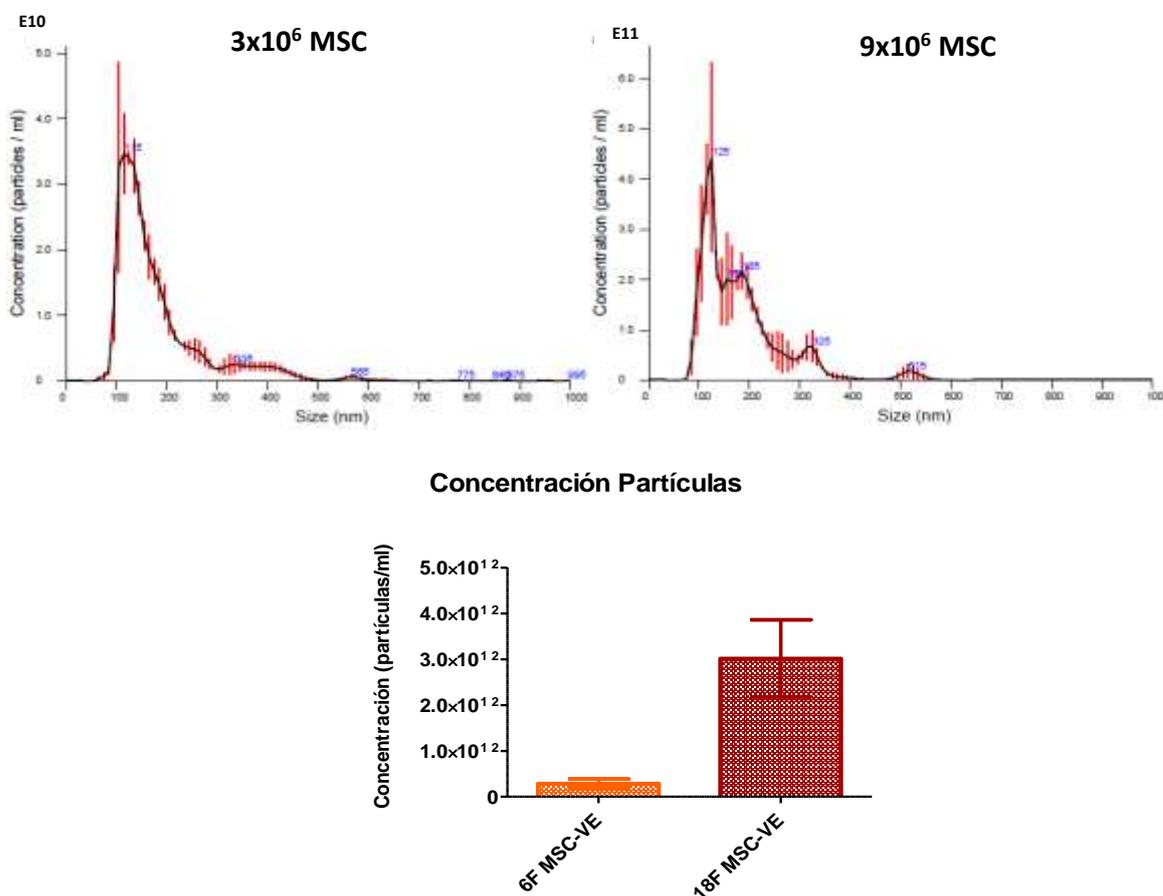


Figura 55. Cuantificación de partículas mediante Nanosight. Análisis de la distribución de tamaños (nm) y la concentración de partículas (partículas/ml) cuantificadas mediante NTA. Ejemplo representativo de una muestra de VE obtenida a partir de 3×10^6 MSC y una muestra VE obtenida a partir de 9×10^6 . Gráfico que representa la media de la concentración de partículas aisladas en cada condición (n=3).

Observamos que el tamaño de las partículas era homogéneo entre las muestras con una media de 200,60nm (181,6nm-223,5nm) en las VE procedentes de 3×10^6 MSC y una media de 185,67nm (147,2nm-227,5nm) en las VE procedentes de 9×10^6 MSC. Sin embargo, la concentración de partículas era significativamente superior en las muestras aisladas a partir de 9×10^6 MSC con una media de $3,02 \times 10^{12}$ partículas/ml en comparación con las muestras aisladas de 3×10^6 MSC con una media de $2,88 \times 10^{11}$ partículas/ml. La concentración de partículas liberadas por los 9×10^6 MSC era unas 10 veces superior a la concentración de partículas liberadas por los 3×10^6 MSC (**Figura 55**).

2. Aislamiento y caracterización de progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical

En todos los casos, las células CD34⁺ se aislaron de muestras humanas sanas de cordón umbilical mediante selección inmunomagnética por AutoMACS. En todos los casos la pureza de las muestras fue superior al 90%.

3. Incorporación de dosis variables de MSC-VE a células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical

3.1. Análisis de la incorporación mediante citometría de flujo

Con el fin de analizar si la dosis de MSC-VE añadidas al co-cultivo variaba el porcentaje de células que incorporan VE, teñimos las VE con un marcador de membrana *Dye Vybrant dil* y, a continuación, las cocultivamos con las células CD34⁺ durante 24 horas. La incorporación fue analizada mediante citometría de flujo. Observamos que la media del porcentaje de células CD34⁺ que habían incorporado VE fue del 14,32% en el caso de las MSC-VE procedentes de 3×10^6 MSC y del 44,80% en el caso de las MSC-VE procedentes de 9×10^6 , siendo la diferencia estadísticamente significativa. Como control, las células se cultivaron en las mismas condiciones con medio de cultivo sin VE previamente teñido con solución fluorescente dye Vybrant dil (**Figura 56**).

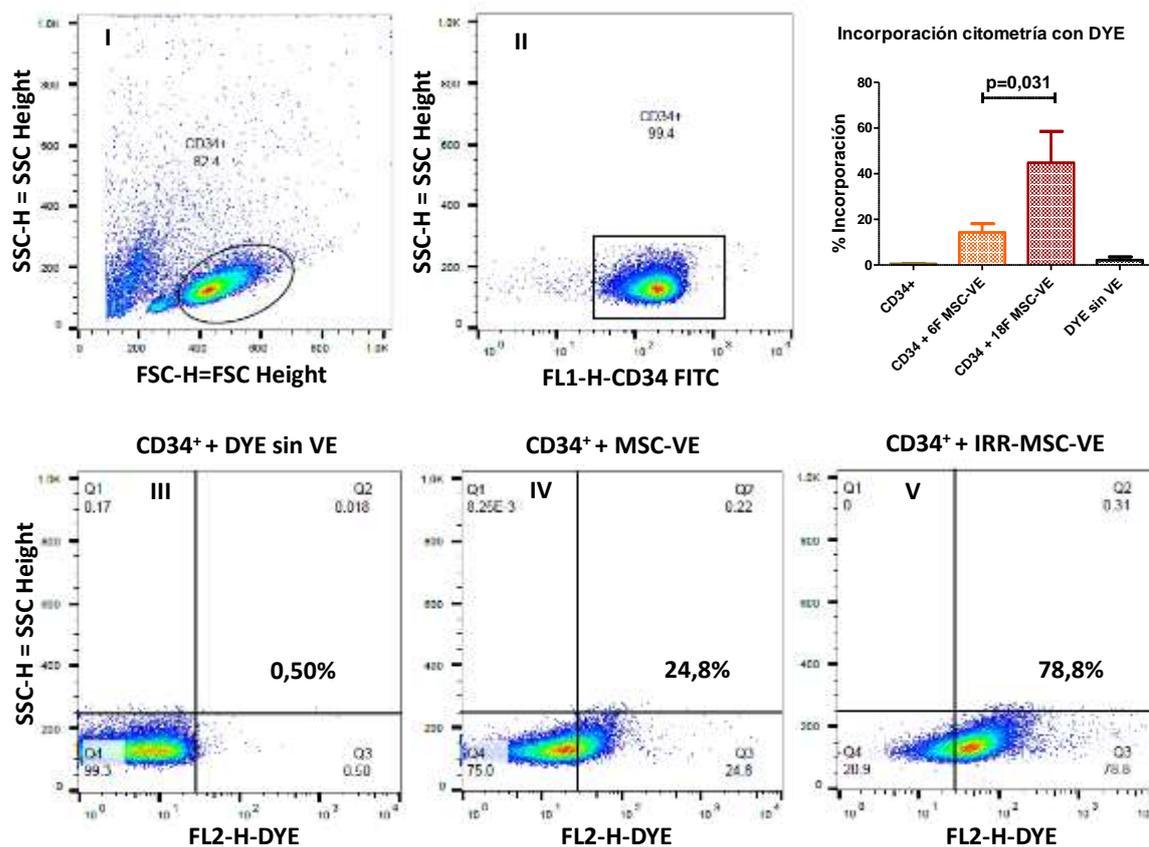


Figura 56. Análisis de la incorporación de VE por células CD34⁺ mediante citometría de flujo. Imágenes representativas de la incorporación mediante citometría de flujo en 1 muestra. Los dos primeros dot plots muestran los ejes forward y side (I) y la selección de las células que son positivas para el anticuerpo CD34 (II). El resto de los dot plots representan el porcentaje de células que han incorporado VE: células CD34⁺ con sobrenadante teñido con DYE (III), células CD34⁺ cultivadas con VE aisladas a partir de 3×10^6 MSC (IV), células CD34⁺ cultivadas con VE aisladas a partir de 9×10^6 MSC (V).

3.2. Papel de la dosis de MSC-VE en la viabilidad de células CD34⁺

Como ya se había visto en el capítulo anterior, la incorporación de MSC-VE favorece la viabilidad de las células CD34⁺ aisladas a partir de SP movilizada. Con el fin de confirmar estos resultados en células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical y analizar el efecto de las diferentes dosis de VE, se analizó la viabilidad empleando el kit de Anexina V y 7AAD mediante citometría de flujo tras 24 horas (n=10) y 48 horas (n=10) de co-cultivo. A pesar de que tras 24 horas de co-cultivo no se observaban diferencias, tras 48 horas las células CD34⁺ sin MSC-VE presentaban una viabilidad menor 60,38% [59,91% - 64,93%] que las células CD34⁺ que las que habían incorporado MSC-VE procedentes de 6F 61,23% [57,76% - 71,97%] o de 18F

70,30% [63,43% - 72,42%], siendo la viabilidad de estas últimas la mayor aunque en ningún caso los resultados alcanzaron significación estadística (**Figura 57**).

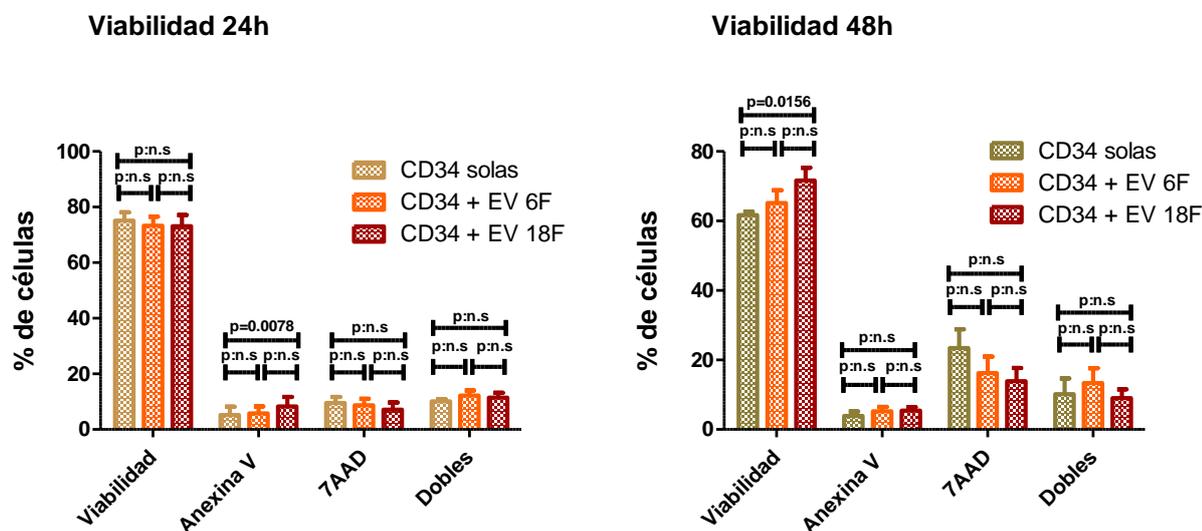


Figura 57. Estudio de viabilidad en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3x10⁶MCS y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9x10⁶MCS. Ensayo de viabilidad tras 24 horas y 48 horas (n=10) de co-cultivo. Resultados expresados como media del porcentaje de células.

3.3. Estudio de la influencia de la dosis de MSC-VE en la expresión de moléculas relacionadas con la hematopoyesis en células CD34⁺ mediante Citometría de Flujo

Del mismo modo, se analizó de qué manera afectaba la incorporación de las diferentes dosis de MSC-VE a la expresión proteica de estas moléculas implicadas en hematopoyesis en las células CD34⁺ mediante citometría de flujo (n=10). Se observó que la expresión de CD44 aumentaba significativamente tras la incorporación de ambas dosis de MSC-VE con respecto a las células CD34⁺ que habían sido cultivadas solas (p=0,002 en ambas comparaciones) y además incrementaba significativamente de manera dosis-dependiente (p=0,013).

En cuanto a la expresión de CXCR4, se encontraba ligeramente aumentada únicamente con la dosis baja de MSC-VE (p=0,048).

La expresión de cKIT, no variaba al incorporar las VE aisladas a partir de 3×10^6 MSC, sin embargo, se encontraba significativamente disminuida tras la incorporación de una dosis de MSC-VE mayor.

Por último, la expresión de ITGA4 no variaba entre las distintas condiciones (**Figura 58**).

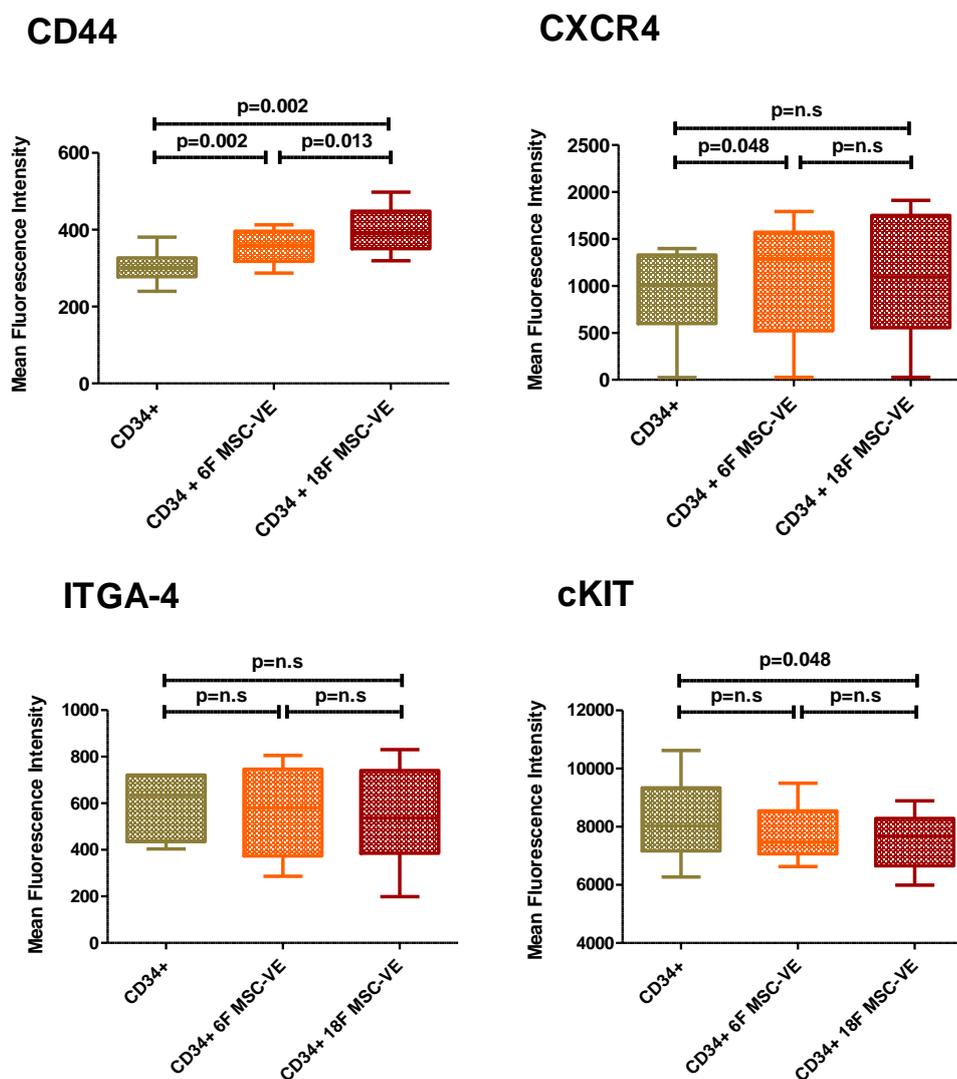


Figura 58. Análisis de la expresión de proteínas implicadas en hematopoyesis en células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3×10^6 MCS y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9×10^6 MCS mediante citometría de flujo. Análisis de la intensidad media de fluorescencia de proteínas implicadas en hematopoyesis como CD44, CXCR4, ITGA4 y cKIT tras 24 horas de co-cultivo. Para este estudio se emplearon 10 muestras.

3.4. Influencia de la dosis de MSC-VE en la capacidad clonogénica de células CD34⁺

A continuación, se analizó la capacidad clonogénica de las células CD34⁺ aisladas de cordón umbilical y si esta se veía afectada con la incorporación de las diferentes dosis de MSC-VE. Al igual que hemos mencionado antes, se cultivaron las células en las 3 condiciones experimentales (solas, con MSC-VE aisladas a partir de 3×10^6 MSC o con MSC-VE aisladas a partir de 9×10^6 MSC) durante 24 horas y se analizó su capacidad de formar colonias (n=10). Observamos que la capacidad de las células CD34⁺ para formar colonias CFU-GM aumentaba significativamente con la incorporación de ambas dosis de VE ($p=0,019$ y $p=0.013$) sin existir diferencias significativas entre las dos dosis analizadas (Figura 59).

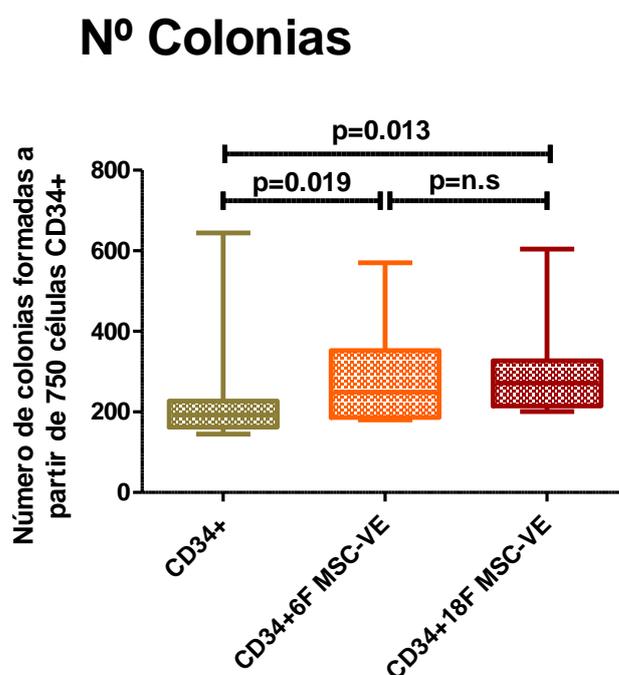


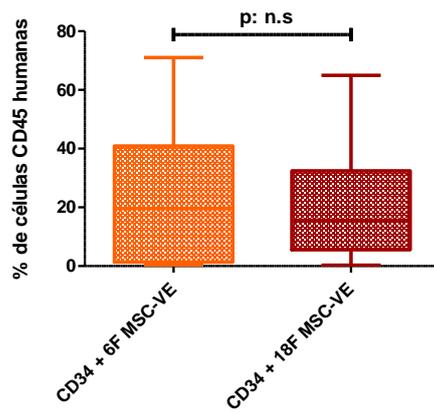
Figura 59. Análisis de la capacidad clonogénica de células CD34⁺ solas, células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3×10^6 MSC y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9×10^6 MSC. El número total de colonias CFU-GM formadas por las células CD34⁺ se contaron tras 14 días de cultivo en medio de metilcelulosa. El análisis se realizó en 10 muestras.

3.5. Papel de la dosis de MSC-VE en la capacidad de injerto de las células CD34⁺ en ratones NOD-SCID

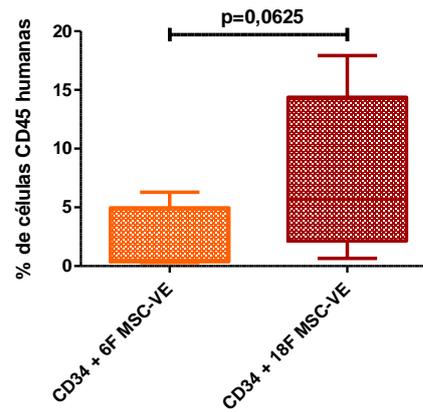
Por último, de igual manera que se realizó en el capítulo anterior, se empleó el mismo modelo murino de xenotrasplante hematopoyético, esta vez con el fin de analizar si la incorporación de una dosis mayor de VE a las células CD34⁺ de cordón, podría incrementar todavía más su capacidad de injerto.

Para ello, inyectamos células CD34⁺ humanas co-cultivadas durante 24 horas en las 2 condiciones experimentales indicadas (con MSC-VE aisladas a partir de 3×10^6 MSC o con con MSC-VE aisladas a partir de 9×10^6 MSC) en el fémur derecho de ratones NOD-SCID y después de 4 semanas se analizó el quimerismo humano en MO de fémur inyectado (derecho), en el el fémur no inyectado (izquierdo) y en bazo mediante citometría de flujo (n=5). La capacidad de injerto de las células humanas se representó como el porcentaje de célula CD45⁺ humanas del total de células analizadas. No se observaron diferencias significativas en el injerto humano ni en los fémures derechos, ni en los fémures izquierdos, ni en los bazos analizados (**Figura 60**).

CD45 Fémur Derecho



CD45 Fémur Izquierdo



CD45 Bazo

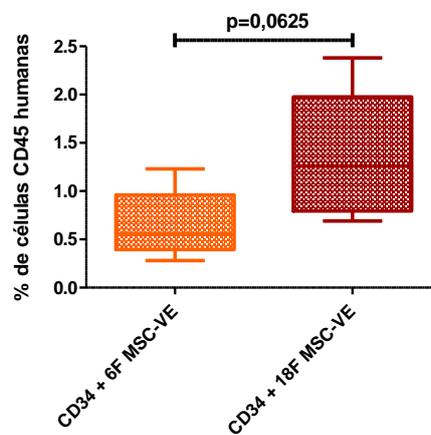


Figura 60. Análisis del injerto de células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE aisladas a partir de 3x10⁶MCS y células CD34⁺ que han incorporado VE aisladas a partir de 9x10⁶MCS en ratones NOD/SCID. Representado como el porcentaje de células CD45⁺ humanas en el total de células analizadas aisladas de MO de fémur derecho (inyectado), fémur izquierdo (contralateral) y bazo mediante citometría de flujo 4 semanas después del trasplante. Los datos representan la mediana de 10 experimentos.

6. Discusión

Hoy en día, el trasplante de progenitores hematopoyéticos, se considera un tratamiento estándar para múltiples enfermedades del sistema hematopoyético, siendo en algunas ocasiones la única alternativa terapéutica. El intercambio de información entre las células hematopoyéticas y su micromedioambiente en la médula ósea es clave para el correcto desarrollo de la hematopoyesis, para el anidamiento o *homing* de las HSC y por tanto para el injerto tras un TPH. Previo al TPH, es necesario el acondicionamiento del receptor. Tras dicho acondicionamiento, las HSC son eliminadas debido a su sensibilidad a tanto a agentes quimioterápicos como a la radioterapia. Sin embargo, se ha demostrado que el efecto de la irradiación es dependiente de la dosis, o más concretamente, que existe un efecto de hormesis, es decir, que dosis bajas de irradiación tienen un efecto contrario al de dosis altas y es que, dosis bajas de irradiación pueden estimular la proliferación de las células hematopoyéticas, favorecer su movilización a sangre periférica y acelerar la reconstitución de la hematopoyesis tras ser trasplantadas. De hecho, en algunos estudios se ha observado cómo HSC trasplantadas a partir de un ratón previamente irradiado con dosis bajas de ICT injertan mejor en el ratón donante que HSC aisladas de un ratón que no ha sido previamente irradiado¹⁸⁰⁻¹⁸².

Sin embargo, el efecto de la irradiación sobre las MSC no ha sido estudiado con tanta profundidad. Se sabe que son más resistentes que las HSC a la irradiación y que tras un TPH las MSC siguen siendo del receptor¹¹⁷. También se ha visto que a pesar de mantener su viabilidad, las MSC pueden verse alteradas tras dosis altas de irradiación. Por el contrario, los efectos de las dosis bajas de irradiación sobre el estroma humano han sido muy poco estudiados. Esto además tiene una notable importancia, porque varios grupos están empleando dosis bajas (hasta 200 cGy) de ICT como único acondicionamiento en pacientes muy frágiles o de edad avanzada^{100, 101}. Los resultados de nuestros estudios muestran que las alteraciones génicas y en la capacidad de diferenciación de las MSC, inducidas por una dosis baja de irradiación, mejoran su capacidad de soporte de la hematopoyesis. En este sentido, con respecto a la radiorresistencia de las MSC, hemos observado que tras 2,5Gy las MSC mantienen su morfología habitual de célula fibroblástica y la capacidad de adherencia al plástico como era esperable. Además, ni su viabilidad ni su perfil inmunofenotípico se ven alterados, como ya se había descrito en trabajos anteriores¹²². De acuerdo con estos datos, Sugrue *et al.* describieron en líneas de MSC murinas cómo estas MSC expresan niveles altos

de proteínas de respuesta a daño en el DNA (DDR) que les permiten, crear respuestas al daño por irradiación. Estos mecanismos se podrían deber a la activación de DDR mediante la formación de γ -H2AX, a la parada del ciclo celular o la reparación de roturas de doble hebra en el DNA. Es por ello que varios trabajos reportan que al irradiar las MSC a dosis medias o altas, se observaba un retraso en la progresión del ciclo celular debido a una parada en fase G₂ que permite la reparación del DNA antes de entrar en la siguiente fase del ciclo. Además, las MSC expresan altos niveles de proteínas anti-apoptóticas, niveles bajos de proteínas pro-apoptóticas y una alta capacidad anti-oxidante^{120, 121}.

Está descrito en la literatura como las MSC humanas responden de forma diferente a la irradiación dependiendo del lugar anatómico en el que se encuentren. Tras una exposición a diferentes dosis de irradiación, las MSC presentes en mandíbula o maxila superior se recuperan de la irradiación antes que las localizadas en la cresta ilíaca¹⁸³. Como ya se ha comentado, los efectos de la irradiación también son dependientes de la dosis, así se ha visto que la proliferación de las MSC se ve reducida de manera dosis dependiente desde 2Gy hasta 10Gy^{122, 125, 184} mientras que dosis muy bajas de irradiación aumentan la proliferación de MSC en cultivo^{123, 127, 185, 186}, aunque nosotros no hemos observado este hecho en nuestro estudio, puesto que la proliferación y crecimiento de las MSC irradiadas con 2,5 Gy fueron similares a las de las MSC basales.

Por otro lado, hemos detectado una alteración global de la expresión génica de las MSC tras la irradiación, estos resultados concuerdan con publicaciones anteriores en las que describen como dosis bajas de irradiación causan alteraciones genéticas en varios tipos de células humanas como sangre, piel, células embrionarias y MSC¹⁸⁷. En nuestro análisis, encontramos una sobre-expresión de 5 genes implicados en ciclo celular, dimerización de proteínas y formación de vesículas y una infra-expresión de más de 40 genes siendo el más infra-expresado PDK1. Este gen está implicado en la adipogénesis mediante la activación de CEBPA vía GSK¹⁸⁸. La infra-expresión de PDK1 en las MSC irradiadas podría suponer la infra-expresión de CEBPA contribuyendo a la disminución de la adipogénesis.

Además, observamos que moléculas clave en la comunicación entre las HSC y su micromedioambiente, como ANGPT y SDF-1, se encuentran significativamente sobre-

expresadas en las MSC irradiadas. Estas moléculas son muy importantes en el mantenimiento de las HSC en el nicho e intervienen en el correcto desarrollo de la hematopoyesis. SDF-1 a través de la interacción con CXCR4 expresado en las HSC²⁰ y ANGPT-1 mediante la activación del receptor TIE-2 de las HSC²⁴. En relación con estos datos, ya se había descrito que dosis bajas de irradiación pueden inducir cambios en la secreción de algunos factores como SCF, GM-CSF e IL-11 por parte de las MSC pudiendo influir así en el sistema hematopoyético y en el sistema inmune¹⁸⁶. Observamos además un aumento en la liberación de SDF-1 por parte de las MSC irradiadas tanto a 1 como a 3 días tras la irradiación con respecto a las MSC control. Estos resultados confirmaron los reportados anteriormente de forma similar por Poncin et. al, remarcando la implicación de SDF-1 en promover la diferenciación osteoblástica¹⁸⁹.

Analizamos también la capacidad de diferenciación de las MSC y observamos que, después de ser irradiadas, las MSC siguen siendo capaces de diferenciarse al menos a adipocitos y osteoblastos en medios de diferenciación específicos como ya se había descrito en MSC humanas tratadas con dosis de irradiación de 4Gy a 10Gy¹¹⁹ o incluso de hasta 30Gy y 60Gy¹⁹⁰. Sin embargo, a pesar de que siguen diferenciándose, hemos observado que lo hacen de diferente forma y es que el balance osteogénesis/adipogénesis se encuentra alterado, observamos una clara reducción en el número de adipocitos en las MSC irradiadas. Además, comprobamos que los niveles de expresión de CEBPA y PPARG, dos moléculas clave en la diferenciación adipogénica, se encuentran significativamente disminuidos en las MSC basales que habían sido irradiadas con respecto a las MSC control, estos resultados mantienen la concordancia con la infra-expresión del gen PDK1 descrita anteriormente. Todo estos resultados concuerdan con varios estudios en los que describe una disminución de la diferenciación adipogénica en MSC irradiadas de ratón, rata o humanas a diferentes dosis de irradiación^{122, 124, 125}. Los cambios observados en la capacidad de diferenciación osteogénica tras la irradiación, sin embargo, son más sutiles. Detectamos que la expresión de RUNX2, implicado en osteogénesis temprana, estaba significativamente disminuida mientras que la expresión de SPP1, implicado en osteogénesis tardía y mineralización, se encontraba aumentada significativamente tras la irradiación en MSC basales. Estos resultados se confirmaron por el aumento en los niveles de depósitos de calcio en las MSC irradiadas. Otros estudios también reportan de forma similar el aumento en la expresión de RUNX2, ALP y osteocalcina en MSC irradiadas con dosis de hasta 7 y 12Gy¹²⁴. En relación con estos

resultados, el grupo de Abramovitch-Gottlib, estudió el efecto de dosis bajas de irradiación laser sobre MSC de ratón cultivadas sobre una matriz biológica tridimensional de CaCO_3 , observando mayor nivel de osificación en las MSC irradiadas con respecto a las MSC control tras 28 días de cultivo¹⁹¹. También se ha visto como dosis bajas de irradiación en MSC de MO de ratas con osteoporosis post-menopáusica aumentan su viabilidad, ciclo celular, secreción de $\text{TGF}\beta$ y expresión de ALP mejorando la calidad del hueso¹⁹². Otros grupos han reportado resultados similares con dosis bajas de irradiación en MSC humanas cultivadas *in vitro*^{123, 127}.

Sin embargo, en otros trabajos se han obtenido resultados diferentes en cuanto a la diferenciación osteogénica de las MSC. Tras ser irradiadas con dosis bajas de 2Gy ó 3Gy observaron mediante ensayos de calcio, tinción de Von Kossa o actividad ALP como la capacidad de diferenciación a la línea osteogénica se veía reducida en las MSC^{122, 125}. Estas diferencias en los resultados de los diversos grupos podrían deberse a que la mayoría de los estudios están hechos sobre células primarias aisladas a partir de MO mediante una metodología que no permite aislar un único tipo de MSC sino que lo que se aísla es una mezcla de MSC progenitoras más inmaduras con MSC mas diferenciadas. Está visto que las MSC más diferenciadas son mucho más resistentes a la irradiación que las MSC más inmaduras, y esto puede llevar a la obtención de diferentes resultados entre grupos¹²².

Analizamos además el efecto de la irradiación en la capacidad de diferenciación de las mismas células, pero induciendo su diferenciación mediante el cultivo en medios de diferenciación específicos. En este caso, la expresión de los marcadores de diferenciación adipogénica no se modificaron por la irradiación y, a excepción de SPP1 que seguía estando aumentado significativamente tras la irradiación, los marcadores osteogénicos y la expresión de rojo de alizarina tampoco presentaban cambios significativos, por lo que podemos decir que la inducción de la diferenciación enmascara algunos efectos de la irradiación que sí que se detectaban en MSC basales.

Estudios previos han demostrado que la alteración en la capacidad de diferenciación de las MSC, puede alterar su capacidad de mantenimiento de la hematopoyesis. Cuando se irradiaron ratones con una dosis de 4Gy con el fin de inducir aplasia en la médula ósea, se detectó un aumento significativo de marcadores osteogénicos y una disminución significativa

de marcadores adipogénicos en las MSC de médula ósea. Además, las MSC aisladas a partir de estos ratones eran capaces de mantener una hematopoyesis *in vitro* de forma más eficaz que las aisladas a partir de ratones control¹⁸⁹. De acuerdo con estos resultados, en nuestro trabajo hemos observado como los estromas formados a partir de MSC que habían sido irradiadas con una dosis de 2,5Gy presentan un menor grado de diferenciación adipocítica y un mayor grado de diferenciación osteogénica que les lleva a ser capaces de mantener la hematopoyesis de un modo más eficaz. Las células CD34⁺ cultivadas sobre estos estromas formaron un número mayor de colonias que las células CD34⁺ cultivadas sobre estromas formados a partir de MSC control. Estos resultados concuerdan además con lo demostrado por Navieras *et al*, en cuanto a que en las zonas de médula ósea ricas en adipocitos se encuentra una frecuencia menor de HSC que en las zonas menos ricas en adipocitos. Además, en este estudio se reporta que la ablación de adipocitos en la médula ósea de ratones favorecía la recuperación de la hematopoyesis tras la irradiación, demostrando así la regulación negativa de la hematopoyesis por parte de los adipocitos⁴⁰. Existen también estudios *in vitro* en los que se ha visto que MSC humanas inducidas a diferenciarse en adipocitos disminuyen la capacidad formadora de colonias de las células CD34⁺¹⁹³. Por otro lado, está demostrado que las células de linaje osteoblástico son clave en el mantenimiento de la hematopoyesis. Expresan múltiples receptores y secretan varias citocinas que permiten la regulación de las HSC^{18, 22, 26}.

Por tanto, con estos resultados podemos concluir que dosis bajas de irradiación inducen en las MSC alteraciones génicas y cambios en su capacidad de diferenciación que incrementan su capacidad de soporte de la hematopoyesis.

Por otro parte, existen múltiples estudios en los que se ha visto que las MSC son capaces de mantener una hematopoyesis *in vitro* no solo mediante contacto célula célula sino también mediante la secreción de determinadas citocinas¹⁹⁴. Además, se ha publicado en modelos murinos que la co-infusión de MSC humanas expandidas *ex vivo* con las HSC promueve la mejora del injerto hematopoyético y reduce la EICR post-trasplante¹⁹⁵⁻¹⁹⁸. Actualmente, la administración de MSC junto con las HSC en el contexto del trasplante hematopoyético se está evaluando en ensayos clínicos, la mayoría de ellos se han basado en pacientes con EICR resistente a esteroides^{141, 142, 147} pero también se están desarrollando ensayos clínicos para el tratamiento de fallo de injerto o injerto pobre en pacientes sometidos

a trasplante hematopoyético^{145, 150, 199, 200} en los que los resultados están siendo muy prometedores.

A pesar de que datos previos de nuestro grupo han demostrado que puede encontrarse cierto grado de quimerismo mixto en las MSC tras un alotrasplante²⁰¹, el efecto terapéutico de estas MSC se ha visto que no se debe tanto a su capacidad de injerto y diferenciación en el organismo receptor, sino a sus efectos paracrinos. De hecho, la mayoría de los estudios reportan que tras ser administradas por vía endovenosa en el organismo receptor, no es fácil detectarlas en MO sino que la mayoría se acumulan en pulmón y no es posible su rastreo unos días después. Sin embargo, a pesar de su ausencia se siguen observando sus efectos terapéuticos durante un tiempo prolongado¹⁹⁷.

Además de la secreción de sustancias al medio de forma libre, se ha visto que parte importante del efecto biológico de las MSC se debe a la secreción de vesículas extracelulares^{158, 202}. De hecho, se ha demostrado que las MSC-VE son capaces de mantener la expansión de células CD34⁺ *in vitro*²⁰³ y ya se han desarrollado varios estudios pre-clínicos en los que se ha reportado el papel de las MSC-VE en la mejora del injerto hematopoyético y la recuperación hematopoyética tras un trasplante hematopoyético cuando son inyectadas junto a las HSC^{161, 204, 205} o incluso cuando son inyectadas solas, sin el soporte hematopoyético¹⁵⁹.

Nuestros resultados muestran como este nuevo sistema de comunicación intercelular basado en MSC-VE induce un cambio fisiológico en la célula receptora (CD34⁺) modificando su expresión génica, aumentando su viabilidad y capacidad clonogénica *in vitro*, lo que implica una mejora de su capacidad de injerto *in vivo*.

Algunos estudios reportan como las MSC-VE, al ser incorporadas por las células CD34⁺ pueden alterar su expresión génica, modificando su capacidad de supervivencia y favoreciendo su atracción por la médula ósea¹⁵³. De acuerdo con estos resultados, en nuestro estudio hemos confirmado que la incorporación de MSC-VE a las células CD34⁺, modifica la expresión de varios genes, en concreto, encontramos 176 genes sobre-expresados y 432 infra-

expresados con respecto a las células CD34⁺ que no habían incorporado MSC-VE. Varios de los genes alterados estaban implicados en la vía de la apoptosis, algunos de ellos pro-apoptóticos se encontraban infra-expresados mientras que otros genes anti-apoptóticos se encontraban sobre-expresados. Corroboramos mediante citometría de flujo que la proporción de células viables era significativamente superior en las células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE y que además la activación de las caspasas 3/7 y 9 en estas células era significativamente menor. Estos resultados concuerdan con lo descrito anteriormente respecto a que la incorporación de MSC-VE causa una disminución en los niveles de fosforilación de H2AX en células CD34⁺ a las que se les había inducido daño, llevando a una mejor reparación en el DNA y por tanto a una disminución de la apoptosis²⁰⁵.

Por otro lado, se ha descrito que las MSC-VE no solo ayudan a la recuperación de las células CD34⁺ mediante la inhibición de la muerte celular sino también a través de la estimulación de la proliferación celular²⁰³ y, aunque en nuestro análisis no encontramos cambios significativos en cuanto a la proporción de células en fase S, sí que observamos una disminución significativa de células CD34⁺ en fase G₀/G₁ tras la incorporación de MSC-VE. Además, en el análisis de arrays de expresión, observamos una sobre-expresión de los genes implicados en la vía JAK-STAT la cual confirmamos a nivel proteico con el aumento de los niveles de STAT 5 fosforilado tras la incorporación de MSC-VE en las células CD34⁺. A pesar de no haber datos previos sobre la implicación de la sobre-expresión de la vía JAK-STAT de forma probablemente transitoria en las células CD34⁺, sí que es bien conocida la sobre-expresión de esta vía de forma constitutiva en las células CD34⁺, como ocurre en las neoplasias mieloproliferativas por la mutación de V617F de JAK-2, lo que conlleva a un aumento de la proliferación y una disminución de la apoptosis^{206, 207}. También se ha observado una sobre-expresión de la vía JAK-STAT en células CD34⁺ de pacientes con leucemia mieloide aguda con respecto a las células *stem* sanas de sangre periférica o cordón umbilical, lo que sugiere que en estos casos la vía de señalización JAK-STAT está favoreciendo también el crecimiento y la supervivencia de las células leucémicas^{208, 209}.

Como se ha demostrado ya en trabajos previos en nuestro grupo, las MSC-VE contienen moléculas bioactivas como proteínas y RNA que pueden ser transferidos a la célula a la que se incorporan¹⁵⁵, y desencadenar respuestas dentro de ella. En este trabajo, hemos observado que la expresión de CD44, una molécula muy conocida por su implicación en la

migración y la adhesión celular, se encuentra sobre-expresada en las células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE. Además, confirmamos que las MSC-VE expresan la molécula CD44 en su superficie mediante citometría de flujo. De acuerdo con estos resultados, otros grupos han visto como las MSC-VE contienen RNA mensajero para CD44²¹⁰.

En cuanto a la expresión de la molécula CXCR4, algunos grupos han descrito el aumento de su expresión en las células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical tras la incorporación de MSC-VE¹⁵³. En nuestro caso, no encontramos diferencias significativas al analizar la expresión de esta molécula en células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada (células en las que se han realizado todos los experimentos de células CD34⁺ discutidos hasta el momento) pero, sin embargo, sí que observamos un aumento significativo de la expresión de CXCR4 tras la incorporación de MSC-VE a células CD34⁺ aisladas a partir de sangre de cordón umbilical. Detectamos también un aumento en la expresión de SDF-1 en las células CD34⁺ tras la incorporación de MSC-VE. En relación con estos resultados, la importancia del eje SDF-1-CXCR4 en la migración, el injerto y el mantenimiento de las células CD34⁺ en médula ósea es incuestionable pero generalmente este eje se tiene en cuenta solamente en la dirección más importante, es decir, la interacción entre SDF-1 expresado en las MSC y CXCR4 expresado en las células CD34⁺. Sin embargo, está demostrado que las MSC también pueden expresar niveles bajos de CXCR4²¹¹⁻²¹³, por lo tanto, el hecho de que la incorporación de MSC-VE implique el aumento de la expresión de SDF-1 en las células CD34⁺, podría favorecer de alguna manera la interacción SDF-1-CXCR4, mejorando la capacidad de injerto de las células CD34⁺. También detectamos un aumento en la expresión de PTGS1, precursor de la Prostaglandina E2 (PGE₂) tras la incorporación de MSC-VE en las células CD34⁺. PGE₂ facilita el anidamiento, la supervivencia y la proliferación celular²¹⁴.

Por otro lado, comprobamos mediante la aplicación mirPath de Diana Tools que muchos de los genes que encontramos infra-expresados tras la incorporación de MSC-VE en las células CD34⁺, son genes diana de los micro-RNAs que encontramos más expresados en las MSC-VE en nuestro estudio. Una correlación similar se había realizado ya en un trabajo de *De Luca et al.* en el que identificaron al menos un gen infra-expresado en las células CD34⁺ como target de cada uno de los micro-RNAs más representativos (pertenecientes al primer cuartil) obtenidos en su estudio de secuenciación de los micro-RNAs contenidos en MSC-VE,

demostrando que los micro-RNAs y pi-RNAs contenidos en las MSC-VE alteran la expresión génica de las células CD34⁺ favoreciendo su supervivencia y proliferación en todos los linajes hematopoyéticos¹⁵³. Otros estudios igualmente identificaron los micro-RNAs más expresados en las MSC-VE y vieron que entre ellos había varios implicados en la regulación de la hematopoyeisis²⁰³.

Finalmente, después de estudiar los cambios génicos y proteicos en las células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE, lo realmente interesante fue analizar si estas alteraciones se traducían en cambios funcionales en la célula. Analizamos estas posibles alteraciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios clonogénicos *in vitro* revelaron que las células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE formaban una cantidad de colonias CFU-GM significativamente superior a las formadas por las células CD34⁺ control. Estos resultados concuerdan con la sobre-expresión de algunos genes involucrados en la formación de colonias hematopoyéticas como IL11, CD22 e IL3RA detectada en los arrays de expresión en las células que habían incorporado MSC-VE. Otros trabajos apoyan estos resultados, mostrando una mayor capacidad formadora de colonias en las células CD34⁺ que han incorporado MSC-VE^{159, 203, 205}.

Los últimos estudios y los más relevantes se realizaron en un modelo murino en el cual se quiso analizar si las MSC-VE podrían mejorar la capacidad de injerto *in vivo* de las células CD34⁺. Para estos experimentos se utilizaron células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical ya que su capacidad de injerto en ratón es mayor que las de las células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada²¹⁵. Este cambio en la fuente de aislamiento de células CD34⁺ con respecto al experimento *in vitro* se realizó con el fin de reducir la cantidad de células CD34⁺ y sobretodo de MSC-VE necesarias para la realización de estos experimentos pero manteniendo en todo momento la proporción MSC-VE/células CD34⁺ empleada en los experimentos *in vitro*. Infundimos las células vía intrafemoral ya que es la vía de administración celular más eficaz cuando el número de células administradas es bajo²¹⁶.

Demostramos que los ratones a los que se les había trasplantado células CD34⁺ previamente co-cultivadas con MSC-VE presentaban una capacidad de retención de estas células en los fémures en los que habían sido inyectadas significativamente mayor. El único estudio similar al nuestro fue publicado por De Luca *et al.*, quienes observaron una mejora en

el injerto precoz de células CD34⁺ previamente co-cultivadas con MSC-VE 24 horas tras la infusión, pero no analizaron el injerto humano en tiempos posteriores a las 24 horas¹⁵³.

Otros autores han destacado los potenciales efectos beneficiosos tanto de las MSC-VE murinas como las humanas en las células CD34⁺ en diferentes diseños experimentales con objetivos diferentes al nuestro. Del mismo modo, Wen S et al. mostraron como tanto las MSC-VE murinas como las humanas son capaces de mejorar el injerto de células CD34⁺ murinas que habían sido dañadas por irradiación, es decir, las MSC-VE revierten el daño causado por la irradiación en estas células recuperando su capacidad de injerto²⁰⁵. Por otro lado, Schoefinius *et al.* observaron que mediante la inyección de MSC-VE se recuperaba la hematopoyesis en ratones que habían sido irradiados, incluso sin necesidad de trasplantar células CD34⁺ ¹⁵⁹.

Analizamos también el injerto hematopoyético humano en fémur contralateral y bazo de los ratones sin observar diferencias significativas entre los ratones trasplantados con células CD34⁺ control y células CD34⁺ previamente co-cultivadas con MSC-VE en ninguno de los dos lugares anatómicos. Con respecto a estos resultados, varios grupos han reportado que la inyección de células vía intraósea lleva a una mayor tasa de injerto o quimerismo en el fémur inyectado a expensas de que el injerto en lugares anatómicos más distales sea más bajo que lo que sería de haber sido las células CD34⁺ trasplantadas de forma intravenosa. Sugieren que la retención de las células en el lugar en el que han sido inyectadas favorece el quimerismo local, perjudicando de alguna manera al quimerismo a nivel sistémico^{217, 218}. En estudios previos publicados por nuestro grupo, ya se había demostrado que en ratones a los que se les inyectaron células CD34⁺ humanas vía intrafemoral, el porcentaje de quimerismo humano analizado 6 semanas post-trasplante era superior en el fémur inyectado que en el fémur contralateral¹⁹⁵. Con estos resultados podemos decir que las MSC-VE incorporadas en las células CD34⁺ mejoran su capacidad de quedar retenidas en la médula ósea del fémur en el que han sido inyectadas pero no se puede concluir que aumenten su capacidad de injerto o migración a las distintas partes de la médula ósea del organismo porque no observamos un aumento del quimerismo global en cada región. Una hipótesis posible sería que el aumento del injerto en el fémur inyectado no es suficiente como para que se pueda extender al resto de los nichos distales.

Por otro lado, debido a que habíamos observado en la primera parte del presente trabajo de tesis doctoral que las MSC pre-irradiadas a dosis bajas eran capaces de mantener la hematopoyesis de forma más eficaz que las MSC control, analizamos también el efecto de las vesículas extracelulares aisladas a partir de estas MSC irradiadas (IRR-MSC-VE) sobre las células CD34⁺ y lo comparamos con el efecto de las MSC-VE. Un motivo adicional para realizar esto experimentos fue que no existen estudios en la literatura que hayan comparado los efectos de las VE procedentes de MSC pre-irradiadas frente a basales. Para ello, tras caracterizar ambos tipos de VE y ver que eran comparables en cuanto a morfología, tamaño y expresión de marcadores y que se incorporaban en igual cantidad en las células CD34⁺, analizamos la expresión de micro-RNAs en ambos tipos de vesículas y observamos una infra-expresión general de micro-RNA en las IRR-MSC-VE con respecto a las MSC-VE llegando a alcanzar significación estadística 19 micro-RNA. Analizamos la expresión de algunos de estos micro-RNA con funciones relevantes en la hematopoyesis en las células CD34⁺ que habían incorporado MSC-VE o IRR-MSC-VE en comparación con las células CD34⁺ control y no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ninguno de los micro-RNA analizados, por lo que a pesar de existir diferencias en cuanto al contenido en micro-RNA en las VE, estas diferencias no se transmiten a la célula CD34⁺ a la que se incorporan. Sin embargo, sí que encontramos diferencias a nivel génico, 1330 genes se encontraban sobre-expresados en las células CD34⁺ que habían incorporado IRR-MSC-VE con respecto a las que habían incorporado MSC-VE. Hemos observado, que las IRR-MSC-VE además de alterar las vías de la apoptosis, JAK-STAT, linaje hematopoyético y receptores de citocinas de manera similar a como lo hacían las MSC-VE, también causaban la sobre-expresión de infinidad de moléculas HLA y por tanto, la sobreexpresión de vías como las de procesamiento y presentación de antígenos, rechazo de injerto o enfermedad injerto contra huésped. También alteran las vías de biogénesis de ribosomas, proteasoma, ciclo celular y varias vías relacionadas con la disparidad HLA.

A pesar de estas diferencias a nivel génico, no encontramos diferencias significativas entre los efectos causados por la incorporación de MSC-VE y la incorporación de IRR-MSC-VE sobre las CD34⁺ en cuanto a viabilidad, ciclo celular, expresión de moléculas relacionadas con el mantenimiento de la hematopoyesis o capacidad formadora de colonias. En cuanto a la capacidad de injerto, no observamos diferencias significativas entre las células CD34⁺ que

habían incorporado MSC-VE o IRR-MSC-VE ni en el fémur en el que se inyectan las células ni en el fémur contralateral, sin embargo, sí que se pudo observar un aumento significativo del injerto en bazo cuando las células CD34⁺ habían sido co-cultivadas con IRR-MSC-VE. Estos resultados sugieren que los efectos beneficiosos de la irradiación sobre el estroma no están relacionados con el intercambio de VE entre las células del estroma y las CD34⁺ sino con otros cambios inducidos en el micromedioambiente medular como la alteración en la capacidad de diferenciación de estas células favoreciendo la osteogénesis e inhibiendo la adipogénesis, como hemos demostrado en este trabajo.

Seguidamente, quisimos analizar *in vitro* el efecto de las MSC-VE sobre las células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical ya que todos los experimentos realizados *in vitro* hasta el momento se habían hecho sobre células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada y, sin embargo, los experimentos realizados en modelos murinos se habían realizado con células CD34⁺ aisladas a partir de cordón umbilical (esto último en aras de una menor necesidad de donantes de MSC y de VE para evaluar el injerto, que es mucho más eficiente con las células de cordón que con los progenitores adultos movilizados). Como pudiera ser esperable, los resultados fueron similares a los obtenidos en células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica movilizada, aumentando viabilidad, marcadores implicados en mantenimiento de la hematopoyesis y capacidad clonogénica de las células CD34⁺ tras la incorporación de MSC-VE. La única diferencia, ya discutida anteriormente, fue que sí que observamos un aumento significativo de la expresión de CXCR4 tras la incorporación de MSC-VE, que no observábamos en el caso de las células CD34⁺ aisladas a partir de sangre periférica. La mayoría de los trabajos realizados anteriormente se hicieron con células aisladas a partir de cordón umbilical^{153, 203}.

Finalmente, analizamos el efecto de la dosis de VE en los cambios observados. Para ello evaluamos si una dosis mayor de MSC-VE, concretamente el triple de la empleada hasta el momento, ejercía un efecto diferente sobre las células CD34⁺ aisladas de cordón umbilical. Observamos que había un aumento significativo de las células que habían incorporado MSC-VE mediante un análisis por citometría de flujo, además, algunos efectos como el aumento de la viabilidad, de la expresión de CD44 o su capacidad clonogénica o la disminución de cKIT parecían ser más pronunciados cuando la dosis de MSC-VE era mayor, sin embargo no

observamos diferencias significativas en ningún caso y tampoco en su capacidad de injerto en ratones. Podríamos concluir con estos datos que la dosis empleada para la realización de nuestros estudios ha sido una dosis óptima y que el aumento de estas dosis no aportaría mejoras adicionales a las ya observadas con la dosis empleada.

Sin embargo, existen retos y limitaciones para el empleo de VE procedentes de MSC a escala industrial con fines terapéuticos. Por lo evaluado hasta ahora, nuestros resultados y los de otros grupos sugieren que los efectos de las MSC-VE sobre las células CD34⁺ no llegan a igualar a los efectos de las MSC de las que provienen, probablemente porque las MSC actúan no solo a través de sus efectos paracrinicos sino también mediante contacto directo. Además, todavía no se conoce por completo el mecanismo de acción de las MSC-VE ni su contenido tras diferentes estímulos por lo que son necesario más estudios pre-clínicos que nos ayuden a elucidar todas estas incógnitas. Por otro lado, hoy en día, el aislamiento de las MSC-VE es muy costoso tanto en tiempo como económicamente. Por ello, se está trabajando intensamente en la estandarización de la producción de MSC-VE estableciendo líneas inmortalizadas de MSC que permitan la producción de MSC-VE a gran escala y con un contenido y función estable²¹⁹. Se está tratando de poner a punto metodologías como la filtración o la cromatografía que permitan el aislamiento de MSC-VE a partir de grandes volúmenes de medio²²⁰. Por último, sería imprescindible el establecimiento de protocolos GMP para la purificación de MSC-VE que aseguren la traslación de los estudios pre-clínicos a los ensayos clínicos²²¹.

Mención Internacional

7. Conclusions

1. Regarding the effects of low-dose γ -irradiation on MSC and their impact on the hematopoietic function:

- 1.1. Irradiated MSC displayed the characteristic fibroblastic-like morphology of this cell type and their cell surface immunophenotype fulfilled the criteria established by the International Society of Cellular Therapy without differences compared to non-irradiated MSC.
- 1.2. Low-dose γ -irradiation of MSC did not decrease the viability of MSC but induced an alteration in their gene expression profile increasing the expression levels of some genes involved in hematopoiesis maintenance as SDF-1 and ANGPT.
- 1.3. Low-dose γ -irradiation of MSC favored their differentiation towards osteogenic lineage and decreased their adipogenic differentiation capacity.
- 1.4. These modifications induced in MSC led to an improvement in their hematopoietic-supporting ability.

2. Regarding the effects on MSC-EV incorporation into CD34⁺ cells and their impact on the hematopoietic function:

- 2.1. MSC-EV exhibited the EV characteristics described by the International Society of Extracellular Vesicles, with a size smaller than 200nm, round morphology and expression of tetraspanin CD63 and CD81.
- 2.2. Human MSC-EV are able to incorporate into human CD34⁺ cells modifying their gene expression. These modified CD34⁺ cells showed increased viability, increased expression of CD44 and CXCR4, involved in hematopoiesis maintenance and displayed a higher clonogenic potential *in vitro*.
- 2.3. Bone marrow lodging ability assessed at 4 weeks after intrabone transplantation into NOD –SCID mice was significantly higher in CD34⁺ cells that incorporated MSC-EV than in control CD34⁺ cells.

3. Regarding the characteristics of EV from pre-irradiated MSC (IRR-MSC-EV) and the effects induced after their incorporation into CD34⁺ cells:

3.1. IRR-MSC-EV were similar in size, morphology, concentration and immunophenotype to MSC-EV and exhibited similar capacity of incorporation into CD34⁺ cells.

3.2. IRR-MSC-EV induced similar genomic and functional changes as MSC-EV when incorporated into CD34⁺ cells in terms of viability, cell cycle, colony forming capacity and BM lodging ability, without significant differences between them.

4. Regarding the effects of the MSC-EV dose in their incorporation into CD34⁺ cells and in their capacity to modify the hematopoietic function:

4.1. The percentage of CD34⁺ cells that incorporated EV was significantly higher when co-cultured with EV preparations isolated from a greater amount of MSC.

4.2. Nevertheless, EV isolated from higher MSC numbers (9×10^6 cells) did not improve the beneficial effects on the hematopoietic function induced by EV isolated from lower MSC numbers (3×10^6 cells) when incorporated into CD34⁺ cells.

Abstract

Role of Bone Marrow Stroma in the Improvement of Hematopoietic Function: From Irradiation to Extracellular Vesicles

Background

Bone marrow (BM) microenvironment regulates growth and differentiation of hematopoietic stem cells (HSC) and is composed of several cell types, including osteoblasts (that have a critical role in the regulation of hematopoiesis and in the maintenance of the clonogenic potential of HSC) and adipocytes (which exert an inhibitory effect on hematopoiesis), both derived from mesenchymal stromal cells (MSC).

Allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-SCT) remains as the only curative therapeutic approach for a variety of hematopoietic diseases. An adequate hematopoietic function after an allo-SCT is not only dependent on the number of hematopoietic stem cells infused, that is a key factor for engraftment. In the last few years, the focus has also been oriented to the BM microenvironment, especially to MSC.

In the current work, we have hypothesized that inducing some modifications in the BM microenvironment (as the ones induced by low-dose irradiation, that is increasingly used in the conditioning regimens used in elderly patients) or the release of MSC-derived extracellular vesicles (MSC-EV) (one of the most important mechanism by which MSC exert their therapeutic effects) could increase the hematopoietic function, with its potential application to improve the outcome of allo-SCT, especially in those cases with poor graft function.

Objectives

Thus, the main objective of our work was to evaluate multiparametrically the effects of a reduced dose (2.5Gy) of irradiation on MSC and the effects of the incorporation of MSC-EV into HSC and their potential role in the improvement of the hematopoietic function.

The specific aims were: 1) To evaluate the effects of low-dose irradiation on MSC and their impact on hematopoietic function, 2) To study the effects on MSC-EV incorporation into CD34⁺ cells and their impact on hematopoietic function, 3) To study the effects of previous-

irradiation of MSC on their VE (IRR-MSC-EV) capacity on hematopoietic function improvement, and 4) To evaluate the effects of different doses of MSC-EV incorporation into HSC and their capacity on hematopoietic function improvement.

Methods

In the current work, a total of 70 bone marrow samples from healthy donors, 45 leukapheresis samples and 33 cord blood units were used, after proper informed consent was obtained and with the approval of the local Ethics Committee.

To evaluate the effects of low-dose irradiation on MSC and their impact on hematopoietic function, MSC at third passage were irradiated with 2.5 Gy or not (the latter were used as controls). Cells were characterized following International Society for Cellular Therapy criteria, including *in vitro* differentiation assays. Adipogenic differentiation was assessed by Oil-Red staining and reverse transcriptase (RT)-PCR of CEBPA and PPARG, osteogenic differentiation was evaluated by alkaline phosphatase staining and RT-PCR of RUNX2 and ALP and mineralization was analyzed RT-PCR of SPP1 and quantified by Alizarin Red staining. Apoptosis was evaluated by flow cytometry with annexin V/7-AAD staining. Gene expression profile was studied by Chip Human Gene ST Arrays and the most relevant genes involved in hematopoiesis maintenance (SDF-1, ANGPT-1, COL1A1, THPO, CXCR4, ITGA-4, CD44 and NGF) were analyzed by RT-PCR, SDF-1 expression was confirmed by ELISA. Finally, long-term bone marrow cultures were performed to test the hematopoietic-supporting ability. Clonal growth of progenitor cell population was assayed weekly culturing CD34⁺ cells in methylcellulose Media. Differentiation status of stroma was evaluated during culture.

To study the effects on MSC-EV incorporation into CD34⁺ cells and their impact on hematopoietic function, MSC-EV were characterized by flow cytometry, Western blot, electron microscopy (TEM), and nano-particle tracking analysis (NTA). Micro-RNA content of MSC-EV and IRR-MSC-EV was analyzed by TaqMan Arrays. 1x10⁵ CD34⁺ cells were co-cultured with EV isolated from 3x10⁶ MSC and EV incorporation into CD34⁺ cells was confirmed by flow cytometry and confocal microscopy after staining EV with Vybrant Dil cell labeling solution. Then Gene expression profile was studied by Chip Human Gene ST Arrays. Apoptosis and cell

cycle were evaluated by flow cytometry and Caspase 3/7 and Caspase 9 activity was measured by luminescence. RT-PCR were performed in modified CD34⁺ cells in order to analyze expression of some genes (SDF-1, COL1A1, CD44, CXCR4, ITGA-4 y cKIT) and micro-RNAs (150, 155, 181a, 17, 363, 494 and Let7g). Protein expression of CD44, CXCR4, ITGA-4 and cKIT was evaluated by flow cytometry and CXCR4 and cKIT expression was confirmed by Western blot (Wes Simple). Phosphorylation of STAT5 was also analyzed by WES Simple. Finally, clonal growth of CD34⁺ cells in the different experimental conditions (after MSC-EV incorporation or not) was assessed by clonogenic assays and their capacity of engraftment was analyzed 4 weeks after CD34⁺ cell transplantation in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice by flow cytometry in bone marrow and spleen.

Similar experiments were done to evaluate either the effect of different doses of MSC-EV (isolated from 3x10⁶MSC or 9x10⁶MSC), or the effect of EV released by low-dose irradiated MSC on CD34⁺ cells.

Results

After low-dose irradiation of MSC, the immunophenotypic characterization and viability of irradiated MSC was comparable to that of control cells. Gene expression profiling showed a significant differential expression in 50 genes. Of them, 5 genes were overexpressed and 45 were down-regulated in irradiated compared with non-irradiated MSC. The most downregulated gene was pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), which is involved in the regulation of adipogenesis. By RT-PCR, we observed that SDF-1 and ANGPT were overexpressed, whereas COL1A1 was down-regulated in irradiated cells ($p=0.015$, $p=0.007$, and $p=0.031$, respectively). The over-expression of SDF-1 in irradiated cells was confirmed by ELISA. Analyzing their differentiation capacity, we observed that, differentiation of irradiated MSC was skewed toward osteogenesis, whereas adipogenesis was impaired. Higher expression of SPP1 ($p=0.039$), involved in mineralization, and lower expression of genes involved in adipogenesis, CEBPA and PPARG ($p=0.003$ and $p=0.019$), was observed in irradiated cells. Moreover, an increase in the mineralization capacity quantified by Alizarin Red staining and a decrease in adipocyte counts were observed in irradiated cells at days 7, 14, and 21 after culture in specific differentiation media ($p=0.018$ $p=0.046$, and $p=0.018$,

respectively). Finally, colony-forming unit granulocyte macrophage (CFU-GM) numbers in long-term bone marrow cultures were higher in the irradiated cells during the five weeks of the culture, with significant differences after 4 and 5 weeks ($p=0.046$ and $p=0.007$). In summary, the irradiation of MSC with 2.5 Gy improved their hematopoietic-supporting ability by increasing osteogenic differentiation and decreasing adipogenesis.

Regarding the effects on MSC-EV incorporation into CD34⁺ cells and their impact on hematopoietic function, the isolation and characterization of the EV showed that EV size evaluated by NTA was homogeneous among samples with a mean of 131.93 nm (124.4–143.6 nm) and a mean particle concentration of $9.09E^{+10}$ particles/milliliter ($5.16E^{+10}$ – $1.21E^{+11}$) in preparations of EV isolated from 3×10^6 MSC. In addition, by TEM we observed the characteristic rounded morphology of EV. By flow cytometry, we confirmed that EV were smaller than 1 μ m, negative for hematopoietic markers and positive for MSC and exosome markers (CD81 and CD63). CD63 expression was also confirmed by Western blot. MSC-EV incorporation was visualized by confocal microscopy and quantified by flow cytometry. Upon incorporation into CD34⁺ cells, MSC-EV induced a down-regulation of proapoptotic genes, an overexpression of genes involved in colony formation, and an activation of the JAK-STAT pathway. A significant decrease in apoptosis and Caspases 3/7 and Caspase 9 activation was observed in CD34⁺ cells after the incorporation of MSC-EV. Increased CD44 and CXCR4 expression and decreased cKIT expression upon the incorporation of MSC-EV were confirmed by FC. Increased levels of phospho-STAT5 were detected by WES Simple in CD34⁺ cells with MSC-EV. In addition, these cells displayed a higher colony-forming unit granulocyte/macrophage clonogenic potential and the *in vivo* bone marrow lodging ability of human CD34⁺ cells with MSC-EV was significantly increased in the injected femurs. In summary, the incorporation of MSC-EV induces genomic and functional changes in CD34⁺ cells, increasing their clonogenic capacity and their bone marrow lodging ability.

When comparing the effects of EV from pre-irradiated MSC (IRR-MSC-EV) we observed that were similar in size, morphology, concentration and immunophenotype to non irradiated MSC-EV and they had similar capacity of incorporation into CD34⁺ cells. Regarding micro-RNA content, we found 19 micro-RNAs significantly downregulated in IRR-MSC-EV compared to MSC-EV. Some of them were analyzed in CD34⁺ cells that had incorporated either MSC-EV or

IRR-MSC-EV but we did not find differences in its expression in these cells. However, upon the incorporation of IRR-MSC-EV, 1330 genes were modified in CD34⁺ cells inducing a downregulation of proapoptotic genes, an overexpression of genes involved in colony formation, and an activation of the JAK-STAT pathway as MSC-EV did. Moreover, we detected an over-expression of many HLA molecules resulting in the overexpression of antigen processing and presentation, graft versus host disease or allograft rejection pathways. Also proteasome, ribosome biogenesis and other pathway were altered. Despite these differences in gene expression, we did not find differences in viability, cell cycle, expression of molecules involved in hematopoiesis or colony formation capacity between CD34⁺ cells that had incorporated IRR-MSC-EV or MSC-EV. In addition, IRR-MSC-EV and MSC-EV significantly increase BM lodging ability of CD34⁺ cells without significant differences among both experimental groups.

Finally we evaluated the potential impact of the MSC-EV dose in the observed effects in CD34⁺ cells. As expected, particle concentration assessed by NTA of EV preparations isolated from 9×10^6 MSC (3.02×10^{12} particles/ml) was higher than that of EV isolated from 3×10^6 MSC (2.88×10^{11} particles/ml). Besides, we observed by flow cytometry a significant increase of CD34⁺ cells that had incorporated EV when they were co-cultured with the higher dose of EV. However, despite the fact that some effects (increase of viability, CD44 expression and clonogenic capacity) were more pronounced after the incorporation of higher dose of EV in CD34⁺ cells, we did not find significant differences between different doses, neither in their bone marrow lodging ability. So we can conclude that the lower dose (EV isolated from 3×10^6 MSC) could be optimal for inducing changes in CD34⁺ cells in the experiments performed and that higher doses do not contribute to improve these beneficial effects.

Conclusions

1) Low-dose γ -irradiation of MSC causes an alteration in their gene expression profile increasing the expression levels of SDF-1 and ANGPT, favoring osteogenic differentiation and decreasing adipogenesis. These modifications lead to an improvement of MSC hematopoietic-supporting ability.

2) Human MSC-EV are able to incorporate into human CD34⁺ cells, modifying their gene expression and increasing their viability, clonogenic capacity *in vitro*, and their 4-week BM lodging ability *in vivo*.

3) IRR-MSC-EV induce similar genomic and functional changes as MSC-EV when incorporate into CD34⁺ cells without significant differences in the viability, cell cycle, colony forming capacity and BM lodging ability of CD34⁺ cells. These results confirms that the beneficial effect of low-irradiation on MSC hematopoietic-supporting ability is not related to their exchange of molecules through EV.

4) EV isolated from 9x10⁶ MSC do not improve the beneficial effects in the hematopoietic function induced by EV isolated from 3x10⁶ when they incorporate into CD34⁺ cells.

Bibliografía

1. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-168.
2. Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, et al. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(11):1599-1611.
3. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*. 1961;14(2):213-222.
4. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *The American journal of pathology*. 2006;169(2):338-346.
5. Giebel B. Cell polarity and asymmetric cell division within human hematopoietic stem and progenitor cells. *Cells, tissues, organs*. 2008;188(1-2):116-126.
6. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(2):93-106.
7. Bradford GB, Williams B, Rossi R, et al. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Experimental hematology*. 1997;25(5):445-453.
8. Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(3):201-209.
9. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87(1):1-13.
10. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, et al. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218-221.
11. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997;91(5):661-672.
12. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-197.
13. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844-2853.
14. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*. 1978;4(1-2):7-25.
15. Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1106(41-53).
16. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(10):589-595.
17. Li J. Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Experimental hematology*. 2011;39(5):511-520.
18. Taichman RS, Emerson SG. The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem cells*. 1998;16(1):7-15.
19. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105(7):2631-2639.
20. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, et al. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-988.
21. Stier S, Ko Y, Forkert R, et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(11):1781-1791.

22. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005;106(4):1232-1239.
23. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-841.
24. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-161.
25. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell*. 2007;1(6):685-697.
26. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-846.
27. Kovach NL, Lin N, Yednock T, et al. Stem cell factor modulates avidity of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood*. 1995;85(1):159-167.
28. Deguchi K, Yagi H, Inada M, et al. Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;255(2):352-359.
29. Corral DA, Amling M, Priemel M, et al. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(23):13835-13840.
30. Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, et al. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010;116(9):1422-1432.
31. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439(7076):599-603.
32. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature cell biology*. 2013;15(5):533-543.
33. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine*. 2004;10(1):64-71.
34. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, et al. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nature medicine*. 2012;18(11):1651-1657.
35. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834.
36. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(3):421-428.
37. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, et al. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology*. 2005;20(349-356).
38. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006;441(7097):1075-1079.
39. Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, et al. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood*. 2004;103(8):2981-2989.
40. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-263.

41. Belaid-Choucair Z, Lepelletier Y, Poncin G, et al. Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. *Stem cells*. 2008;26(6):1556-1564.
42. Ghode SS, Bajaj MS, Kulkarni RS, et al. Neuropilin-1 Is an Important Niche Component and Exerts Context-Dependent Effects on Hematopoietic Stem Cells. *Stem cells and development*. 2017;26(1):35-48.
43. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine*. 2001;226(6):507-520.
44. Wong RS. Mesenchymal stem cells: angels or demons? *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011;2011(459510).
45. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*. 1976;4(5):267-274.
46. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics*. 1987;20(3):263-272.
47. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood reviews*. 2006;20(3):161-171.
48. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research*. 2009;88(9):792-806.
49. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 11):2204-2213.
50. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
51. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-3843.
52. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 2003;57(1):11-20.
53. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005;105(10):4120-4126.
54. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem cells*. 2006;24(1):74-85.
55. Maccario R, Podesta M, Moretta A, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005;90(4):516-525.
56. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental hematology*. 2004;32(5):414-425.
57. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology*. 2011;164(1):1-8.
58. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of immunology*. 2008;180(4):2581-2587.

59. Chin SP, Poey AC, Wong CY, et al. Cryopreserved mesenchymal stromal cell treatment is safe and feasible for severe dilated ischemic cardiomyopathy. *Cytotherapy*. 2010;12(1):31-37.
60. Gu X, Yu X, Zhao C, et al. Efficacy and Safety of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients with Diabetic Retinopathy. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;49(1):40-52.
61. Jo CH, Lee YG, Shin WH, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem cells*. 2014;32(5):1254-1266.
62. Pers YM, Rackwitz L, Ferreira R, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(7):847-856.
63. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine*. 1999;5(3):309-313.
64. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Diseases of the colon and rectum*. 2009;52(1):79-86.
65. Awaya N, Rupert K, Bryant E, et al. Failure of adult marrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation. *Experimental hematology*. 2002;30(8):937-942.
66. Bartsch K, Al-Ali H, Reinhardt A, et al. Mesenchymal stem cells remain host-derived independent of the source of the stem-cell graft and conditioning regimen used. *Transplantation*. 2009;87(2):217-221.
67. Brooke G, Cook M, Blair C, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Seminars in cell & developmental biology*. 2007;18(6):846-858.
68. Harting MT, Srivastava AK, Zhaorigetu S, et al. Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation. *Stem cells*. 2018;36(1):79-90.
69. Mao F, Tu Q, Wang L, et al. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget*. 2017;8(23):38008-38021.
70. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*. 2014;30(255-289).
71. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967-978.
72. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;101(3):439-451.
73. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015;65(8):783-797.
74. Tkach M, Thery C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*. 2016;164(6):1226-1232.
75. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013;200(4):373-383.
76. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4(27066).

77. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS one*. 2010;5(7):e11803.
78. Stoorvogel W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*. 2012;119(3):646-648.
79. Jalalian SH, Ramezani M, Jalalian SA, et al. Exosomes, new biomarkers in early cancer detection. *Analytical biochemistry*. 2019;571(1-13).
80. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-659.
81. Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood reviews*. 2013;27(1):31-39.
82. Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *International journal of cancer*. 2009;125(7):1595-1603.
83. Kanchanapally R, Deshmukh SK, Chavva SR, et al. Drug-loaded exosomal preparations from different cell types exhibit distinctive loading capability, yield, and antitumor efficacies: a comparative analysis. *International journal of nanomedicine*. 2019;14(531-541).
84. Piffoux M, Nicolas-Boluda A, Mulens-Arias V, et al. Extracellular vesicles for personalized medicine: The input of physically triggered production, loading and theranostic properties. *Advanced drug delivery reviews*. 2019;138(247-258).
85. Meng Y, Sun J, Wang X, et al. Exosomes: A Promising Avenue for the Diagnosis of Breast Cancer. *Technology in cancer research & treatment*. 2019;18(1533033818821421).
86. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, et al. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *Journal of the National Cancer Institute*. 1951;12(1):197-201.
87. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 1957;257(11):491-496.
88. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer research*. 1965;25(9):1525-1531.
89. Dausset J, Brecy H. Identical nature of the leucocyte antigens detectable in monozygotic twins by means of immune iso-leuco-agglutinins. *Nature*. 1957;180(4599):1430.
90. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, et al. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet*. 1968;2(7583):1364-1366.
91. Yoshihara S, Ikegame K, Taniguchi K, et al. Salvage haploidentical transplantation for graft failure using reduced-intensity conditioning. *Bone marrow transplantation*. 2012;47(3):369-373.
92. Amouzegar A, Dey BR, Spitzer TR. Peripheral Blood or Bone Marrow Stem Cells? Practical Considerations in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfusion medicine reviews*. 2019;33(1):43-50.
93. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *The New England journal of medicine*. 2001;344(3):175-181.
94. Yu X, Gu Z, Wang Y, et al. New strategies in cord blood cells transplantation. *Cell biology international*. 2013;37(9):865-874.
95. Stanevsky A, Goldstein G, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation: pros, cons and beyond. *Blood reviews*. 2009;23(5):199-204.

96. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, et al. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2009;15(12):1628-1633.
97. Clift RA, Radich J, Appelbaum FR, et al. Long-term follow-up of a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide for patients receiving allogeneic marrow transplants during chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999;94(11):3960-3962.
98. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75(3):555-562.
99. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014;124(3):344-353.
100. Mielcarek M, Storer BE, Sandmaier BM, et al. Comparable outcomes after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with unrelated and related donors. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(12):1499-1507.
101. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 2001;97(11):3390-3400.
102. Storb R, Gyurkocza B, Storer BE, et al. Graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(12):1530-1538.
103. Ballen KK, Colvin G, Porter D, et al. Low dose total body irradiation followed by allogeneic lymphocyte infusion for refractory hematologic malignancy--an updated review. *Leukemia & lymphoma*. 2004;45(5):905-910.
104. Storb R. Nonmyeloablative preparative regimens: how relevant for acute myelogenous leukemia? *Leukemia*. 2001;15(4):662-663.
105. Roberts MM, To LB, Gillis D, et al. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation*. 1993;12(5):469-475.
106. Bergonie J, Tribondeau L. Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. *Radiation research*. 1959;11(587-588).
107. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, et al. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2002;17(4):405-426.
108. Sanchez-Guijo FM, Sanchez-Abarca LI, Villaron E, et al. Posttransplant hematopoiesis in patients undergoing sibling allogeneic stem cell transplantation reflects that of their respective donors although with a lower functional capability. *Experimental hematology*. 2005;33(8):935-943.
109. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia*. 2009;23(4):664-672.
110. Ramos TL, Sanchez-Abarca LI, Roson-Burgo B, et al. Mesenchymal stromal cells (MSC) from JAK2+ myeloproliferative neoplasms differ from normal MSC and contribute to the maintenance of neoplastic hematopoiesis. *PloS one*. 2017;12(8):e0182470.
111. Perez-Simon JA, Tabera S, Sarasquete ME, et al. Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Cytotherapy*. 2009;11(6):698-705.

112. Adams SW, Wang L, Fortney J, et al. Etoposide differentially affects bone marrow and dermal derived endothelial cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2004;8(3):338-348.
113. Clutter SD, Fortney JE, Gibson LF. Chemotherapy disrupts activity of translational regulatory proteins in bone marrow stromal cells. *Experimental hematology*. 2006;34(11):1522-1531.
114. Somaiah C, Kumar A, Sharma R, et al. Mesenchymal stem cells show functional defect and decreased anti-cancer effect after exposure to chemotherapeutic drugs. *Journal of biomedical science*. 2018;25(1):5.
115. Kemp K, Morse R, Wexler S, et al. Chemotherapy-induced mesenchymal stem cell damage in patients with hematological malignancy. *Annals of hematology*. 2010;89(7):701-713.
116. Gencheva M, Hare I, Kurian S, et al. Bone marrow osteoblast vulnerability to chemotherapy. *European journal of haematology*. 2013;90(6):469-478.
117. Rieger K, Marinets O, Fietz T, et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Experimental hematology*. 2005;33(5):605-611.
118. Ruhle A, Xia O, Perez RL, et al. The Radiation Resistance of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Is Independent of Their Tissue of Origin. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2018;100(5):1259-1269.
119. Nicolay NH, Sommer E, Lopez R, et al. Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;87(5):1171-1178.
120. Sugrue T, Brown JA, Lowndes NF, et al. Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines. *Stem cells*. 2013;31(1):137-145.
121. Sugrue T, Lowndes NF, Ceredig R. Mesenchymal stromal cells: radio-resistant members of the bone marrow. *Immunology and cell biology*. 2013;91(1):5-11.
122. Mussano F, Lee KJ, Zuk P, et al. Differential effect of ionizing radiation exposure on multipotent and differentiation-restricted bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;111(2):322-332.
123. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, et al. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers in medical science*. 2012;27(2):423-430.
124. Schonmeyer BH, Wong AK, Soares M, et al. Ionizing radiation of mesenchymal stem cells results in diminution of the precursor pool and limits potential for multilineage differentiation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(1):64-76.
125. Li J, Kwong DL, Chan GC. The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Pediatric transplantation*. 2007;11(4):379-387.
126. Wang Y, Zhu G, Wang J, et al. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular medicine reports*. 2016;13(1):213-223.
127. Wang L, Wu F, Liu C, et al. Low-level laser irradiation modulates the proliferation and the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under healthy and inflammatory condition. *Lasers in medical science*. 2019;34(1):169-178.
128. Carreras E, Diaz-Ricart M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation*. 2011;46(12):1495-1502.

129. Merli P, Caruana I, De Vito R, et al. Role of IFN γ in immune-mediated graft failure occurring after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2019;
130. Olsson RF, Logan BR, Chaudhury S, et al. Primary graft failure after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia*. 2015;29(8):1754-1762.
131. Locatelli F, Lucarelli B, Merli P. Current and future approaches to treat graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2014;15(1):23-36.
132. Dandoy CE, Ardura MI, Papanicolaou GA, et al. Bacterial bloodstream infections in the allogeneic hematopoietic cell transplant patient: new considerations for a persistent nemesis. *Bone marrow transplantation*. 2017;52(8):1091-1106.
133. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174-1182.
134. Horwitz ME, Sullivan KM. Chronic graft-versus-host disease. *Blood reviews*. 2006;20(1):15-27.
135. Couriel D, Caldera H, Champlin R, et al. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer*. 2004;101(9):1936-1946.
136. Hill L, Alousi A, Kebriaei P, et al. New and emerging therapies for acute and chronic graft versus host disease. *Therapeutic advances in hematology*. 2018;9(1):21-46.
137. Cooke KR, Luznik L, Sarantopoulos S, et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2017;23(2):211-234.
138. MacDonald KPA, Betts BC, Couriel D. Emerging Therapeutics for the Control of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24(1):19-26.
139. Negrin RS. Graft-versus-host disease versus graft-versus-leukemia. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2015;2015(225-230).
140. Huang X, Broxmeyer HE. Progress towards improving homing and engraftment of hematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Current opinion in hematology*. 2019;26(4):266-272.
141. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371(9624):1579-1586.
142. Sanchez-Guijo F, Caballero-Velazquez T, Lopez-Villar O, et al. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(10):1580-1585.
143. Wang L, Zhu CY, Ma DX, et al. Efficacy and safety of mesenchymal stromal cells for the prophylaxis of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of hematology*. 2018;97(10):1941-1950.
144. Fisher SA, Cutler A, Doree C, et al. Mesenchymal stromal cells as treatment or prophylaxis for acute or chronic graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with a haematological condition. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2019;1(CD009768).

145. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007;21(8):1733-1738.
146. Sanchez-Guijo FM, Lopez-Villar O, Lopez-Anglada L, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for refractory cytopenias after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion*. 2012;52(5):1086-1091.
147. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. 2007;110(7):2764-2767.
148. Wang Z, Yu H, Cao F, et al. Donor-derived marrow mesenchymal stromal cell co-transplantation following a haploidentical hematopoietic stem cell transplantation trial to treat severe aplastic anemia in children. *Annals of hematology*. 2019;98(2):473-479.
149. Goto T, Murata M. [Mesenchymal stem cell therapy in hematopoietic stem cell transplantation]. [Rinsho ketsueki] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2018;59(2):195-204.
150. Goto T, Murata M, Terakura S, et al. Phase I study of cord blood transplantation with intrabone marrow injection of mesenchymal stem cells: A clinical study protocol. *Medicine*. 2018;97(17):e0449.
151. Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I, et al. Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study. *Stem cells and development*. 2009;18(9):1247-1252.
152. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1542-1555.
153. De Luca L, Trino S, Laurenzana I, et al. MiRNAs and piRNAs from bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles induce cell survival and inhibit cell differentiation of cord blood hematopoietic stem cells: a new insight in transplantation. *Oncotarget*. 2016;7(6):6676-6692.
154. Khare D, Or R, Resnick I, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Affect mRNA Expression and Function of B-Lymphocytes. *Frontiers in immunology*. 2018;9(3053).
155. Muntion S, Ramos TL, Diez-Campelo M, et al. Microvesicles from Mesenchymal Stromal Cells Are Involved in HPC-Microenvironment Crosstalk in Myelodysplastic Patients. *PLoS one*. 2016;11(2):e0146722.
156. Ramos TL, Sanchez-Abarca LI, Lopez-Ruano G, et al. Do endothelial cells belong to the primitive stem leukemic clone in CML? Role of extracellular vesicles. *Leukemia research*. 2015;39(8):921-924.
157. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunology letters*. 2012;147(1-2):47-54.
158. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(5):1474-1483.
159. Schoefinius JS, Brunswig-Spickenheier B, Speiseder T, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Provide Long-Term Survival After Total Body Irradiation Without Additional Hematopoietic Stem Cell Support. *Stem cells*. 2017;35(12):2379-2389.
160. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(3):4142-4157.

161. De Luca L, Trino S, Laurenzana I, et al. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles: A Role in Hematopoietic Transplantation? *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5):
162. Yin K, Wang S, Zhao RC. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomarker research*. 2019;7(8).
163. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014;28(4):970-973.
164. Sharma J, Hampton JM, Valiente GR, et al. Therapeutic Development of Mesenchymal Stem Cells or Their Extracellular Vesicles to Inhibit Autoimmune-Mediated Inflammatory Processes in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in immunology*. 2017;8(526).
165. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Experimental hematology*. 2008;36(8):1014-1021.
166. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13(12):1901-1928.
167. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-264.
168. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*. 2007;8(1):118-127.
169. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5116-5121.
170. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry*. 2004;329(1):77-84.
171. They C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*. 2006;Chapter 3(Unit 3 22).
172. T LR, Sanchez-Abarca LI, Muntion S, et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell communication and signaling : CCS*. 2016;14(2).
173. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
174. Wang J, Duncan D, Shi Z, et al. WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic acids research*. 2013;41(Web Server issue):W77-83.
175. Gentalen ET, Proctor JM. Using the Peggy Simple Western system for fine needle aspirate analysis. *Methods in molecular biology*. 2015;1219(139-155).
176. Misiewicz-Krzeminska I, Corchete LA, Rojas EA, et al. A novel nano-immunoassay method for quantification of proteins from CD138-purified myeloma cells: biological and clinical utility. *Haematologica*. 2018;103(5):880-889.
177. Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *The Biochemical journal*. 2006;393(Pt 1):7-20.
178. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(26913).

179. Havelange V, Garzon R. MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *American journal of hematology*. 2010;85(12):935-942.
180. Wang GJ, Cai L. Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2000;53(2):369-376.
181. Zhang L, Tian Y, Wu Y, et al. Low-dose radiation-induced hormetic effect on hematopoietic reconstitution. *International journal of radiation biology*. 2010;86(4):329-333.
182. Li W, Wang G, Cui J, et al. Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. *Experimental hematology*. 2004;32(11):1088-1096.
183. Damek-Poprawa M, Stefanik D, Levin LM, et al. Human bone marrow stromal cells display variable anatomic site-dependent response and recovery from irradiation. *Archives of oral biology*. 2010;55(5):358-364.
184. Zhang Z, Zhang H, Liu F, et al. Effects of gamma radiation on bone-marrow stromal cells. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2010;73(7):514-519.
185. Liang X, So YH, Cui J, et al. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells. *Journal of radiation research*. 2011;52(3):380-386.
186. Yang L, Liu Z, Chen C, et al. Low-dose radiation modulates human mesenchymal stem cell proliferation through regulating CDK and Rb. *American journal of translational research*. 2017;9(4):1914-1921.
187. Sokolov M, Neumann R. Global Gene Expression Alterations as a Crucial Constituent of Human Cell Response to Low Doses of Ionizing Radiation Exposure. *International journal of molecular sciences*. 2015;17(1):
188. Kwak DH, Lee JH, Song KH, et al. Inhibitory effects of baicalin in the early stage of 3T3-L1 preadipocytes differentiation by down-regulation of PDK1/Akt phosphorylation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;385(1-2):257-264.
189. Poncin G, Beaulieu A, Humblet C, et al. Characterization of spontaneous bone marrow recovery after sublethal total body irradiation: importance of the osteoblastic/adipocytic balance. *PloS one*. 2012;7(2):e30818.
190. Fekete N, Erle A, Amann EM, et al. Effect of high-dose irradiation on human bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2015;21(2):112-122.
191. Abramovitch-Gottlib L, Gross T, Naveh D, et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers in medical science*. 2005;20(3-4):138-146.
192. Fallahnezhad S, Piryaee A, Darbandi H, et al. Effect of low-level laser therapy and oxytocin on osteoporotic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2018;119(1):983-997.
193. Le Y, Fraineau S, Chandran P, et al. Adipogenic Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow and Their Hematopoietic Supportive Role: Towards Understanding the Permissive Marrow Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia. *Stem cell reviews*. 2016;12(2):235-244.
194. Carrancio S, Blanco B, Romo C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: an in vitro and in vivo model. Part 2: Effect on bone marrow microenvironment. *PloS one*. 2011;6(10):e26241.

195. Carrancio S, Romo C, Ramos T, et al. Effects of MSC coadministration and route of delivery on cord blood hematopoietic stem cell engraftment. *Cell transplantation*. 2013;22(7):1171-1183.
196. Hiwase SD, Dyson PG, To LB, et al. Cotransplantation of placental mesenchymal stromal cells enhances single and double cord blood engraftment in nonobese diabetic/severe combined immune deficient mice. *Stem cells*. 2009;27(9):2293-2300.
197. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Experimental hematology*. 2002;30(8):870-878.
198. Robles JD, Liu YP, Cao J, et al. Immunosuppressive mechanisms of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells in BALB/c host graft versus host disease murine models. *Experimental hematology & oncology*. 2015;4(13).
199. Baron F, Lechanteur C, Willems E, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(6):838-847.
200. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology letters*. 2015;168(2):215-221.
201. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2004;89(12):1421-1427.
202. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*. 2010;4(3):214-222.
203. Xie H, Sun L, Zhang L, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Support Ex Vivo Expansion of Cord Blood-Derived CD34(+) Cells. *Stem cells international*. 2016;2016(6493241).
204. Timari H, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, et al. The Effect of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Hematopoietic Stem Cells Fate. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2017;7(4):531-546.
205. Wen S, Dooner M, Cheng Y, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016;30(11):2221-2231.
206. Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(24):22788-22792.
207. Pearson S, Williamson AJK, Blance R, et al. Proteomic analysis of JAK2V617F-induced changes identifies potential new combinatorial therapeutic approaches. *Leukemia*. 2017;31(12):2717-2725.
208. Cook AM, Li L, Ho Y, et al. Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2014;123(18):2826-2837.
209. Murone M, Radpour R, Attinger A, et al. The Multi-kinase Inhibitor Debio 0617B Reduces Maintenance and Self-renewal of Primary Human AML CD34(+) Stem/Progenitor Cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2017;16(8):1497-1510.
210. Arasu UT, Karna R, Harkonen K, et al. Human mesenchymal stem cells secrete hyaluronan-coated extracellular vesicles. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017;64(54-68).

211. Jin W, Liang X, Brooks A, et al. Modelling of the SDF-1/CXCR4 regulated in vivo homing of therapeutic mesenchymal stem/stromal cells in mice. *PeerJ*. 2018;6(e6072).
212. Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem cells*. 2004;22(3):415-427.
213. Jeltsch KS, Radke TF, Laufs S, et al. Unrestricted somatic stem cells: interaction with CD34+ cells in vitro and in vivo, expression of homing genes and exclusion of tumorigenic potential. *Cytotherapy*. 2011;13(3):357-365.
214. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, et al. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood*. 2009;113(22):5444-5455.
215. Matsumura T, Kametani Y, Ando K, et al. Functional CD5+ B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice transplanted either with human umbilical cord blood, bone marrow, or mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Experimental hematology*. 2003;31(9):789-797.
216. Ramirez PA, Wagner JE, Brunstein CG. Going straight to the point: intra-BM injection of hematopoietic progenitors. *Bone marrow transplantation*. 2010;45(7):1127-1133.
217. Futrega K, Lott WB, Doran MR. Direct bone marrow HSC transplantation enhances local engraftment at the expense of systemic engraftment in NSG mice. *Scientific reports*. 2016;6(23886).
218. Yahata T, Ando K, Sato T, et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood*. 2003;101(8):2905-2913.
219. Chen TS, Arslan F, Yin Y, et al. Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *Journal of translational medicine*. 2011;9(47).
220. Nordin JZ, Lee Y, Vader P, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2015;11(4):879-883.
221. Witwer KW, Van Balkom BWM, Bruno S, et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications. *Journal of extracellular vesicles*. 2019;8(1):1609206.

Anexos

ANEXO 1: Metodología para el marcaje de células para estudios de citometría de flujo y listado de los anticuerpos monoclonales empleados.

Reactivos Necesarios:

- ✓ PBS de citómetro (BD FACSTFlow™)
- ✓ Anticuerpos (especificados en la tabla):

Método:

Para el análisis mediante citometría de flujo, las células se recogieron del cultivo en tubos de poliestireno (Falcon, Corning, Mexico) y se lavaron con PBS para eliminar los restos del medio de cultivo. Seguidamente se procedió a su marcaje con anticuerpos monoclonales, según las cantidades especificadas en la tabla contigua. Una vez añadido el anticuerpo, las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, tras los cuales se lavaron con PBS, centrifugando 5 minutos a 2.000 rpm con el fin de eliminar los restos de anticuerpo no unidos a las células. El pellet se resuspendió en un volumen de 200µl de PBS para su adquisición en el citómetro de flujo.

Tabla 1: Anticuerpos monoclonales empleados en el trabajo

	Fluorocromo	Volumen	Casa Comercial	Anti-
CD34	FITC	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Diego, CA	Humano
CD73	PE	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD45	PerCPCy5.5	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD105	APC	3 µl	R&D System Minneapolis, MN, USA	Humano
CD44	FITC	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD14	PE	10 µl	Cytognos Salamanca, Spain	Humano
CD19	PerCPCy5.5	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD90	FITC	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD166	PE	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
HLA-DR	PerCPCy5.5	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
7AAD	PerCPCy5.5	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano

CD63	PE	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD34	PerCPCy5.5	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD44	APC	5 µl	Cytognos Salamanca, Spain	Humano
CD81	APCH7	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD45	V500	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD34	PE	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD184	APC	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD117	PC7	10 µl	Beckman Coulter Marseille, France	Humano
CD49d	APCH7	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD45	FITC	10 µl	Inmunostep Salamanca, Spain	Humano
CD34	APC	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD13	PE	10 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD19	APC	5 µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Humano
CD45	PerCPCy5.5	5µl	Becton-Dickinson eBiosciences, San Jose, CA	Ratón

FITC: Fluoresceína de-5-Isocianato; PE: Ficoeritrina; PerCPCy5.5: Proteína Peridinin Clorofílica cianina 5.5; APC: Aloficocianina; APCH7: Aloficocianina con cianina H7 en tándem; PC7: Phycoerythrin Cyanin 7; 7AAD: 7-aminoactinomicina.

ANEXO 2: Metodología para la extracción, purificación y cuantificación de RNA

1. Extracción y purificación de RNA

Reactivos Necesarios:

- ✓ Trizol: TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, USA)
- ✓ Cloroformo (Sigma, Aldrich)
- ✓ Isopropanol (Merk, USA)
- ✓ Etanol (Miltenyi Biotec, Merck KGaA, Germany)
- ✓ AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Quiagen GmbH, Germany)

Método:

En todos los casos, para la extracción de RNA, las células en cultivo se lavaron con PBS, se resuspendieron en trizol y se congelaron a -80°C para su posterior utilización. En el momento de hacer los estudios de RNA, las muestras en trizol se descongelaron, se homogeneizaron, se les añadió cloroformo y se agitaron empleando un vortex con el fin de romper las células y así obtener el material intracelular. Después de 20 minutos en cloroformo, las células se centrifugaron a 10.000rpm durante 30 minutos a 4°C de modo que la muestra quedó separada en tres fases de las cuales la fase superior acuosa, que contenía el RNA se transfirió a un eppendorf nuevo. A esta fase se le añadió Isopropanol frío y se volvió a centrifugar, quedándonos con el pellet. El pellet de RNA se lavó con etanol frío al 70% y tras la centrifugación se resuspendió en agua estéril.

Solamente para los estudios de Gene Chip Human Gene ST Arrays, las muestras de RNA se purificaron empleando el kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit y siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Cuantificación de RNA mediante Nanodrop

La concentración del RNA obtenido se determinó empleando un espectrofotómetro NANOdrop. Se consideró un RNA aceptable aquel cuyos ratios 260nM/280nM y 260nM/230nM eran próximos a 2.

Para evaluar la integridad del RNA se utilizó el sistema de Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA) con el kit RNA 6000 Nano LabChip.

ANEXO 3: Metodología para el análisis de la expresión génica mediante RT-PCR y listado de los *primers* empleados

Reactivos Necesarios:

- ✓ High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)*
- ✓ FAST Universal PCR Master Mix
- ✓ Primers específicos: TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA), detallados en la **Tabla 1**.

* High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit contiene: dNTPs with dTTP 100mM, MultiScribe Reverse Transcriptase 50U/μl, 10x RT Buffer, RNase Inhibitor 20U/μl, RT Random Primers, 10x.

Método:

En primer lugar, se hizo la transcripción reversa de 2.000ng de RNA total empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. La reacción se incubó en un termociclador en las siguientes condiciones: 10minutos a 25°C, dos horas a 37°C y 5 segundos a 85°C.

Para analizar la expresión de los genes de interés, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR en placas MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems). Para ello, se añadieron 2μl del cDNA obtenido en el paso anterior a un volumen de 8μl de Master Mix compuesta por 5μl de FAST Universal PCR Master Mix, 2,5μl de agua destilada y 0,5μl del primer específico correspondiente llegando a un volumen final de 10μl que se incubó en el termociclador Step One Plus Real-Time PCR System en las siguientes condiciones: 15 segundos a 95°C y 50 ciclos de 1 segundo a 95°C - 20 segundos a 60°C.

Los genes control se emplearon para analizar la calidad del RNA y normalizar la expresión de los genes en estudio. El ciclo en el cual la reacción superaba el umbral determinado (Ct) ayudó a cuantificar la expresión del gen de estudio con respecto al gen control. La cuantificación relativa se calculó como $2^{-\Delta Ct}$ siguiendo la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = C_t \text{Gene} - C_t \text{Control}$$

Tabla 1: *Primers* empleados para el estudio de genes mediante RT-PCR.

Símbolo Gen	Nombre	ID
SDF1	Factor Derivado del Estroma-1	Hs00171022
ANGPT1	Angiopoyetina 1	Hs00375822
COL1A1	<i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>	Hs00164004
THPO	Trombopoyetina	Hs01061346
CXCR4	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>	Hs00607978
ITGA4	<i>Integrin Subunit Alpha 4</i>	Hs00168433
CD44	<i>CD44 Molecule (Indian Blood Group)</i>	Hs01075861
cKIT	<i>KIT Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase</i>	Hs00174029
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>	Hs00171458
CEBPA	<i>Enhancer Binding Protein Alpha</i>	Hs00269972
PPARG	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i>	Hs01115512
RUNX2	<i>Runt Related Transcription Factor 2</i>	Hs00231692
ALPL	Fosfatasa Alcalina	Hs00758162
SPP1	Osteopontina	Hs00959010
SPARC	Osteonectina	Hs00277762
GAPDH	Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa	Hs99999905
GUSB	Glucuronidasa Beta	Hs99999908

Publicaciones



Biology

Mesenchymal Stromal Cell Irradiation Interferes with the Adipogenic/Osteogenic Differentiation Balance and Improves Their Hematopoietic-Supporting Ability



Silvia Preciado^{1,2,3,4}, Sandra Muntión^{1,2,4}, Ana Rico^{1,4}, Luis A. Pérez-Romasanta⁵, Teresa L. Ramos^{4,6,7}, Rebeca Ortega¹, Javier Borrajo³, Luis A. Corchete¹, Concepción Rodríguez¹, María Díez-Campelo^{1,3,4}, Luis I. Sánchez-Abarca^{1,2,8}, María-Consuelo Del Cañizo^{1,2,3,4,8}, Fermín Sánchez-Guijo^{1,2,3,4,7,8,*}

¹ Servicio de Hematología, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

² Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, Spain

³ Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

⁴ RETIC TerCel, ISCIII, Salamanca, Spain

⁵ Servicio de Oncología Radioterápica, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

⁶ Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Spain

⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain

⁸ Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

Article history:

Received 3 August 2017

Accepted 2 November 2017

Key Words:

Hematopoiesis
Bone marrow
Transplantation
Irradiation
Differentiation

ABSTRACT

Bone marrow mesenchymal stromal cells (MSCs) are precursors of adipocytes and osteoblasts and key regulators of hematopoiesis. Irradiation is widely used in conditioning regimens. Although MSCs are radio-resistant, the effects of low-dose irradiation on their behavior have not been extensively explored. Our aim was to evaluate the effect of 2.5 Gy on MSCs. Cells from 25 healthy donors were either irradiated or not (the latter were used as controls). Cells were characterized following International Society for Cellular Therapy criteria, including in vitro differentiation assays. Apoptosis was evaluated by annexin V/7-amino-actinomycin staining. Gene expression profiling and reverse transcriptase (RT)-PCR of relevant genes was also performed. Finally, long-term bone marrow cultures were performed to test the hematopoietic-supporting ability. Our results showed that immunophenotypic characterization and viability of irradiated cells was comparable with that of control cells. Gene expression profiling showed 50 genes differentially expressed. By RT-PCR, SDF-1 and ANGPT were overexpressed, whereas COL1A1 was downregulated in irradiated cells ($P = .015$, $P = .007$, and $P = .031$, respectively). Interestingly, differentiation of irradiated cells was skewed toward osteogenesis, whereas adipogenesis was impaired. Higher expression of genes involved in osteogenesis as SPP1 ($P = .039$) and lower of genes involved in adipogenesis, CEBPA and PPARG ($P = .003$ and $P = .019$), together with an increase in the mineralization capacity (Alizarin Red) was observed in irradiated cells. After differentiation, adipocyte counts were decreased in irradiated cells at days 7, 14, and 21 ($P = .018$, $P = .046$, and $P = .018$, respectively). Also, colony-forming unit granulocyte macrophage number in long-term bone marrow cultures was significantly higher in irradiated cells after 4 and 5 weeks ($P = .046$ and $P = .007$). In summary, the irradiation of MSCs with 2.5 Gy improves their hematopoietic-supporting ability by increasing osteogenic differentiation and decreasing adipogenesis.

© 2017 American Society for Blood and Marrow Transplantation.

Financial disclosure: See Acknowledgments on page 450.

* Correspondence and reprint requests: Fermín Sánchez-Guijo, MD, Hematology Department, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo San Vicente 58-182, 37007 Salamanca, Spain.

E-mail address: ferminsg@usal.es (F. Sánchez-Guijo).

INTRODUCTION

The bone marrow (BM) microenvironment controls growth and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) and is composed of several cell types, including osteoblastic-lineage cells. They have a critical role in the regulation of primitive HSCs, stimulating growth and maintaining the clonogenic potential of CD34⁺ cells [1–3]. CXCL12-abundant

reticular cells and a subset of Nestin⁺ cells are also key regulators contributing to HSC maintenance in an undifferentiated state [4]. Adult BM also contains adipocytes, which exert an inhibitory effect on hematopoiesis and preventing hematopoietic progenitor cell expansion. The number of correlates inversely with the hematopoietic activity in the BM [5]. Adipocytes block granulopoiesis and inhibit the release of granulocyte colony-stimulating factor production by macrophages via neuropilin-1 (*NRP1*) expression [6]. Adipocytes also secrete transforming growth factor β 1, a well-known inhibitor of hematopoiesis [7].

Many cells of the BM microenvironment (including osteoblasts and adipocytes) derive from mesenchymal stromal cells (MSCs) [8]. MSCs are a key component of the hematopoietic microenvironment despite the fact that they constitute a small proportion of BM mononuclear cells [9,10]. Communications between marrow stromal cells and hematopoietic cells regulate homing, cell survival, proliferation, and mobilization of blood cells [11]. MSCs are not only able to differentiate into osteoblast and adipocytes but also exert a potent immunomodulatory activity [12,13]. Thus, they represent an attractive therapeutic tool, being currently evaluated in multiple cell therapy programs. Most beneficial effects of MSCs are related to paracrine actions rather than to direct differentiation of MSCs [14].

On the other hand, the use of hematopoietic cells in hematopoietic cell transplantation remains as the most extended cell therapeutic approach for a variety of hematopoietic diseases. Preparative or conditioning regimens are needed before cell infusion to reduce the amount of malignant cells and to produce an adequate immunosuppression to allow engraftment. One of the components of classical conditioning regimens has been total body irradiation at high doses (12 Gy) [15]. Nevertheless, the use of a low dose of irradiation as a unique conditioning regimen for elderly or frail patients was successfully introduced in 2001 by the Seattle group [16,17]. Low-dose irradiation allows engraftment with significant reduced toxicity and has broadened the ability to undergo HSC transplantation for unfit or elderly patients.

When the hematopoietic system is exposed to ionizing radiation, hematopoietic homeostasis is altered. Hematopoietic stem and progenitor cells are extremely radiosensitive [18]. The abolition of the host hematopoietic system creates a new space in the BM niche where donor hematopoietic cells can engraft.

Research in this field has focused mostly on BM hematopoietic recovery after irradiation and transplantation, whereas less attention has been paid to the changes induced by irradiation into the microenvironment. It has been shown that after total body irradiation followed by BM transplantation, hematopoietic cells are from the donor and MSCs remain of host origin [19]. These results indicate that MSCs are able to survive doses of irradiation that are lethal to hematopoietic cells.

Although MSCs are resistant to radiation in terms of viability, cellular function can be altered. MSCs do not lose their differentiation capacity, but this capacity can be altered even at low irradiation doses [20]. In this regard the expression of adipogenic markers is significantly lower in murine cells exposed to irradiation [21], but it is controversial if the differentiation ability to osteoblastic cells is induced or not [22–25]. There is scarce information on the effects of irradiation on human MSCs, especially the effects of low-dose irradiation. Therefore, in the current study we assessed if a reduced dose (2.5 Gy) of irradiation modifies the differenti-

ation ability of human MSCs and also the functional changes induced in terms of their hematopoietic-supporting ability.

METHODS

Cell Isolation and Expansion

BM human MSCs were isolated from 25 healthy donors (18 men and 7 women) with a median age of 38 years (range, 21 to 65). In all cases written informed consent was previously obtained according to institutional guidelines and the Declaration of Helsinki. All experimental procedures were also approved by Ethics Committee of the Hospital Universitario de Salamanca (70/07/2015).

Ten to 20 mL BM was obtained from the iliac crest under local anesthesia. BM mononuclear cells were isolated and separated by Ficoll-Paque density-gradient centrifugation (Ficoll-Paque density, 1.077 g/mL; GE Healthcare BioSciences, AB, Uppsala, Sweden). Cells were counted and seeded at a density of 1×10^6 cells/cm², and expansion was carried out as previously described [26] in DMEM (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with FBS (GIBCO, Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin.

MSC Irradiation

Two aliquots of each MSC sample from passage 3 were cultured in parallel. One aliquot was irradiated with single doses of 2.5 Gy, delivered at a rate of 2 to 3 Gy/min, using a cesium source (GammaCell 1000; Nordion International, Ottawa, Ontario, Canada), whereas the non-irradiated aliquot was used as control. Cells from both groups were subjected to the subsequent assays.

Characterization of MSCs by Flow Cytometry

For immunophenotypic characterization MSCs from passage 3 were incubated with the following monoclonal antibodies conjugated with either FITC, PE, peridinin chlorophyll protein, or allophycocyanin: anti-CD34 FITC (eBioscience Inc., San Diego, CA); anti-CD105 (RD Systems, Minneapolis, MN); anti-CD14 (Cytognos, Salamanca, Spain); and anti-CD73, -CD45, -CD44, -CD19, -CD90, -CD166, and HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, CA). Unstained MSCs were used as control. Samples were acquired on a FACS Calibur flow cytometer using Cellquest Pro software (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data were analyzed using the Infinicyt software (Cytognos).

Apoptosis Assays

One hour and 72 hours after irradiation, cells were harvested, washed, and incubated with Annexin V, 7-AAD (7-amino-actinomycin) using the BD Pharmingen PE Annexin V Apoptosis Detection Kit 1 (BD Biosciences). FITC-conjugated CD90 (eBioscience) was added before the sample was acquired on a FACS Calibur flow cytometer using Cellquest Pro software (Becton Dickinson). At least 5×10^4 events per sample were recorded. Data were analyzed using Infinicyt (Cytognos). Cells were considered to be in an early apoptotic state, late apoptosis, or dead if they were Annexin V⁺/7-AAD⁻, Annexin V⁺/7-AAD⁺, or Annexin V⁻/7-AAD⁺, respectively. Five pairs of MSC samples were used for this analysis.

Gene Chip Human Gene ST Arrays

Because of cost constraints only 5 pairs of MSC samples (non-irradiated and irradiated) were used for this analysis. Total RNA was isolated and purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. The RNA integrity was assessed using the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). Labeling and hybridizations were performed according to protocols from Affymetrix (Santa Clara, CA). Briefly, 100 ng of total RNA were amplified and labeled using the WT Plus reagent kit (Affymetrix) and then hybridized to Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). Washing and scanning were performed using the GeneChip System (GeneChip Hybridization Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450, and GeneChip Scanner 7G; Affymetrix).

Raw data were extracted from unprocessed cell intensity files and normalized using the robust multi-array average algorithm [27], implemented in the Affymetrix expression console (version 1.4.1.46). The significance analysis of microarrays technique [28] was used for the identification of differentially expressed genes between paired samples. Genes with a q value $< .05$ were considered to be significantly over- or infra-expressed.

Reverse Transcriptase PCR of Genes Involved in Hematopoiesis

Total RNA was extracted from 10 pairs of non-irradiated and irradiated MSCs. cDNA was prepared by reverse transcription using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the converted cDNA was analyzed for genes involved in hematopoietic maintenance, including stromal-derived factor 1 (*SDF1*), angiopoietin 1 (*ANGPT1*), thrombopoietin (*THPO*), collagen type I alpha 1 chain (*COL1A1*), nerve growth factor cd271 (*NGF*), C-X-C motif chemokine receptor 4 (*CXCR4*), CD44 molecule (Indian blood group) (*CD44*), and integrin subunit alpha 4

(*ITGA4*), to specific gene expression of osteogenic lineage, including alkaline phosphatase (*ALP*), runt related transcription factor 2 (*RUNX2*), and osteopontin (*SPP1*), and for adipogenic specific gene expression, including peroxisome proliferator activated receptor gamma (*PPARG*) and enhancer binding protein alpha (*CEBPA*). *GADPH* was used as a control gene for genes implicated in differentiation, and *GLUS* was used as a control for genes implicated in hematopoietic maintenance.

Genes were quantified using TaqMan gene expression assays and the Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative quantification was calculated from the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ values where $\Delta C_t = C_t \text{ Gene} - C_t \text{ Control}$.

MSC Differentiation Analysis

BM-MSCs on third passage were seeded in 9-cm² tissue culture dishes (Corning, Ithaca, NY) and irradiated on the following day. For osteogenic differentiation cells were seeded at a density of 3.5×10^3 cells/cm², and for adipogenic differentiation control cells were seeded at a density of 22.5×10^3 . One hour after irradiation, differentiation medium was added to each well, and cells were grown for 21 days. Osteogenic differentiation was induced using NH Osteodiff Medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) supplemented with 1% penicillin/streptomycin. Adipogenic differentiation was induced with human MSC Adipogenic Induction SingleQuots (Lonza, Basel, Switzerland) and human MSC Adipogenic Maintenance SingleQuots (Lonza). Differentiation medium was replaced twice a week. To evaluate the osteoblastic differentiation cells were stained with alkaline phosphatase using an NBT/BCIP solution kit (Nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; Roche, Basel, Switzerland). Calcium deposits were quantified by Alizarin Red S staining in which the absorbance was proportional to calcium deposits in the sample and with the mineralization level of the cells (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Ten pairs of MSC samples were used for this analysis. Oil-red-O staining (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used for the assessment of adipogenic differentiation in 7 pairs of MSC samples.

CD34⁺ Cell Isolation

Mobilized CD34⁺ progenitor cells were isolated from leukapheresis products of 7 healthy donors (6 men and 1 woman) with a median age of 37 years (range, 26 to 52) by immunomagnetic sorting in an AutoMACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) after labeling cells with the human CD34 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's recommendations. Purity of cells was confirmed by flow cytometry using FITC-CD34 (eBioscience), and the viability was evaluated by labeling cells with 7-AAD.

Long-Term BM Culture and Clonogenic Assays

To establish the long-term BM culture (LT-BMC), the stromal layer was first induced by seeding 1.5×10^5 MSCs onto 9-cm² tissue culture dishes (Corning) in DMEM until confluence was obtained. Eight MSC samples were used in this experiment. Then, cells were irradiated, and 1 hour later medium was replaced by LT-BMC medium, containing 62.4% Iscove (GIBCO, Invitrogen, Grand Island NY), 10% horse serum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 10% FBS, and 1% hydrocortisone 5×10^{-5} M. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 1 week to establish the stromal layer. At day 7, 3×10^5 CD34⁺ progenitor cells were added to the stromal layer. Cultures were fed weekly by replacing half of the growth medium and maintained for 5 weeks.

Clonal growth of progenitor cell population was assayed weekly culturing 1.25×10^3 CD34⁺ progenitor cells isolated each week from the removed medium of LT-BMC into methylcellulose MACS Media Stem MACS HSC-CFU complete w/o Epo human (Miltenyi Biotec) during 2 weeks at 37°C in a fully humidified atmosphere of 5% CO₂. After these 2 weeks the colonies formed were scored using an inverted microscope.

Statistical Analysis

Values were summarized as median and range. The Wilcoxon signed ranks test was used to compare the differences between paired results (irradiated versus non-irradiated samples). Differences were considered to be statistically significant for values of $P < .05$. All statistical analyses were performed on the GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

Characterization of Irradiated and Non-Irradiated MSCs

Both non-irradiated and irradiated MSCs displayed the characteristic fibroblastic-like morphology and were able to adhere to plastic surfaces. Immunophenotypic analysis by flow cytometry showed that all samples expressed CD73, CD90, CD105, CD44, and CD166, whereas they were negative for

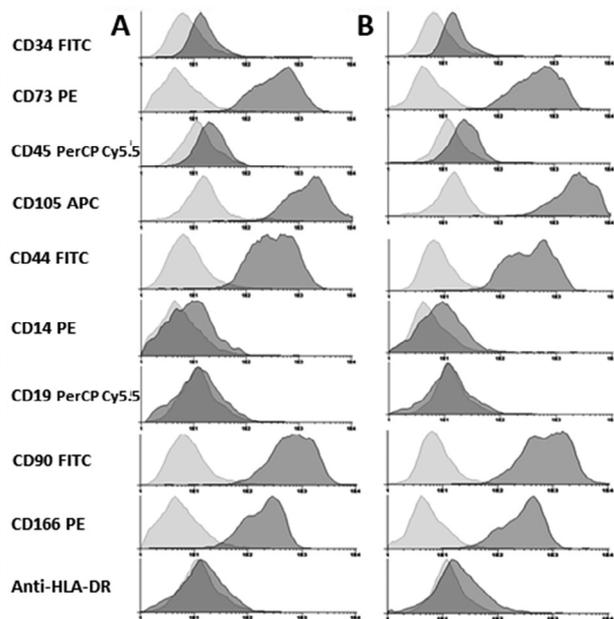


Figure 1. Phenotypic analysis of non-irradiated (A) and irradiated (B) BM MSCs. MSCs were isolated from human BM and expanded to passage 3. Then, expression of different cell surface markers was analyzed by flow cytometry. Data are representative of 3 MSC samples.

CD34, CD45, CD14, CD19, and HLA-DR, demonstrating a characteristic immunophenotypic profile of MSCs without differences between non-irradiated and irradiated cells (Figure 1).

MSC Viability

To evaluate if a 2.5-Gy irradiation dose induced apoptosis in MSCs, cell viability assay was performed both 1 hour and 72 hours after irradiation ($n = 5$). There were no differences in the percentage of viable cells (Annexin V/7AAD⁻), early apoptotic cells (Annexin V⁺/7AAD⁻), late apoptotic cells (Annexin V⁺/7AAD⁺), and dead cells (Annexin V⁻/7AAD⁺) between both groups neither at 1 hour nor at 72 hours after irradiation (Figure 2).

Gene Expression Profiling of Irradiated MSC

Applying significance analysis of microarrays analysis, statistically significant differences were found in 50 of 6661 tested genes by applying the established filtering criteria. From these 50 genes, 5 were overexpressed and 45 down-expressed in irradiated compared with non-irradiated MSCs (Figure 3 and Supplementary Table S1). The most downregulated gene was pyruvate dehydrogenase kinase 1 (*PDK1*), which is involved in the regulation of adipogenesis.

Expression of Genes Involved in Hematopoiesis

The expression of some important genes involved in homing or in the maintenance of hematopoiesis was analyzed by reverse transcriptase (RT)-PCR ($n = 10$). *NGF*, *THPO*, *CD44*, *CXCR4*, and *ITGA4* were expressed in both non-irradiated and irradiated MSCs without statistically significant differences between both groups. *COL1A1* showed lower expression in irradiated cells ($P = .031$). On the contrary, *SDF1* and *ANGPT* were significantly overexpressed in irradiated compared with control MSCs ($P = .015$ and $P = .007$, respectively; Figure 4).

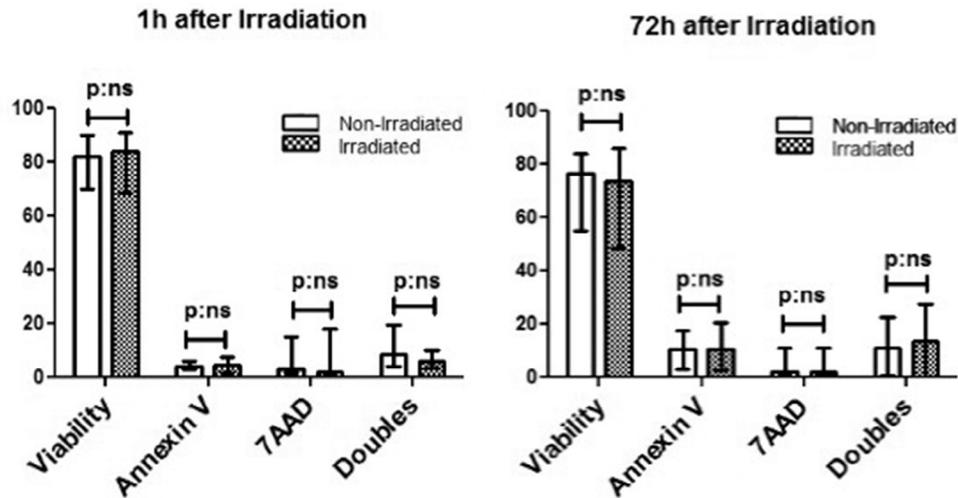


Figure 2. Apoptosis assays in non-irradiated and irradiated MSCs 1 hour and 72 hours after irradiation. MSCs were incubated with Annexin V, 7-AAD, and CD90. Then, the expression of different cell surface markers was analyzed by flow cytometry. Cells were considered to be viable (Annexin V⁻/7-AAD⁻), in an early apoptotic state (Annexin V⁺/7-AAD⁻), late apoptosis (Annexin V⁺/7-AAD⁺), or dead (Annexin V⁻/7-AAD⁺).

Differentiation Ability

Both non-irradiated and irradiated MSCs were positive for alkaline phosphatase staining and contained lipid droplets stained with Oil-red-O after culture with specific osteogenic and adipogenic differentiation media, respectively

(Figure 5A-D). To quantify the adipogenic capacity of MSCs, the number of adipocytes growing in adipogenic differentiation medium were counted at days 7, 14, and 21 of the differentiation process (n = 7). In all cases the number of adipocytes was significantly reduced in irradiated MSCs

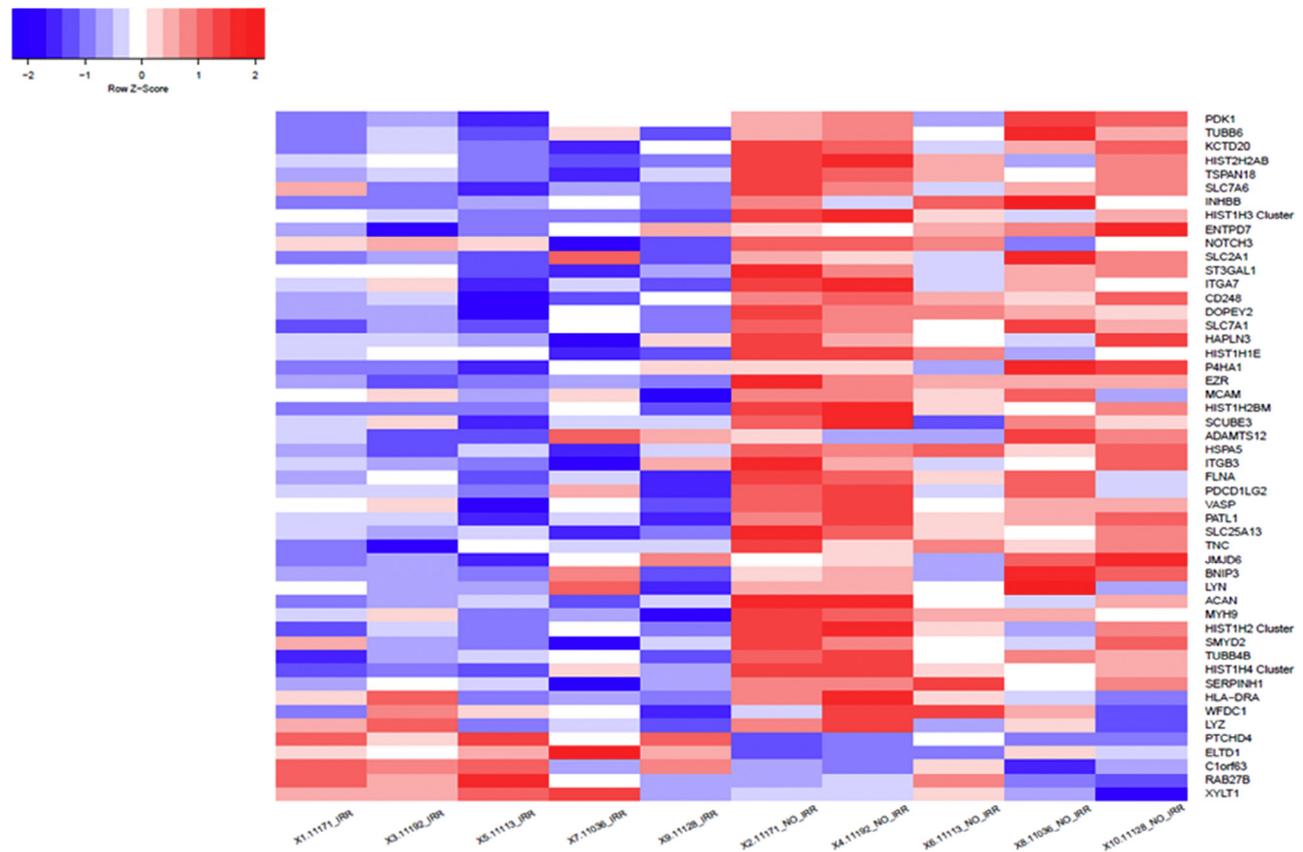


Figure 3. Heat map showing the top 50 genes found either downregulated or upregulated upon irradiation with 2.5 Gy. Purified RNA from 5 pairs of non-irradiated and irradiated MSC samples was hybridized in Gene Expression Arrays (Affymetrix). The significance analysis of microarrays technique was used for the identification of differentially expressed genes between paired samples. Gene downregulation is represented in blue and gene upregulation in red.

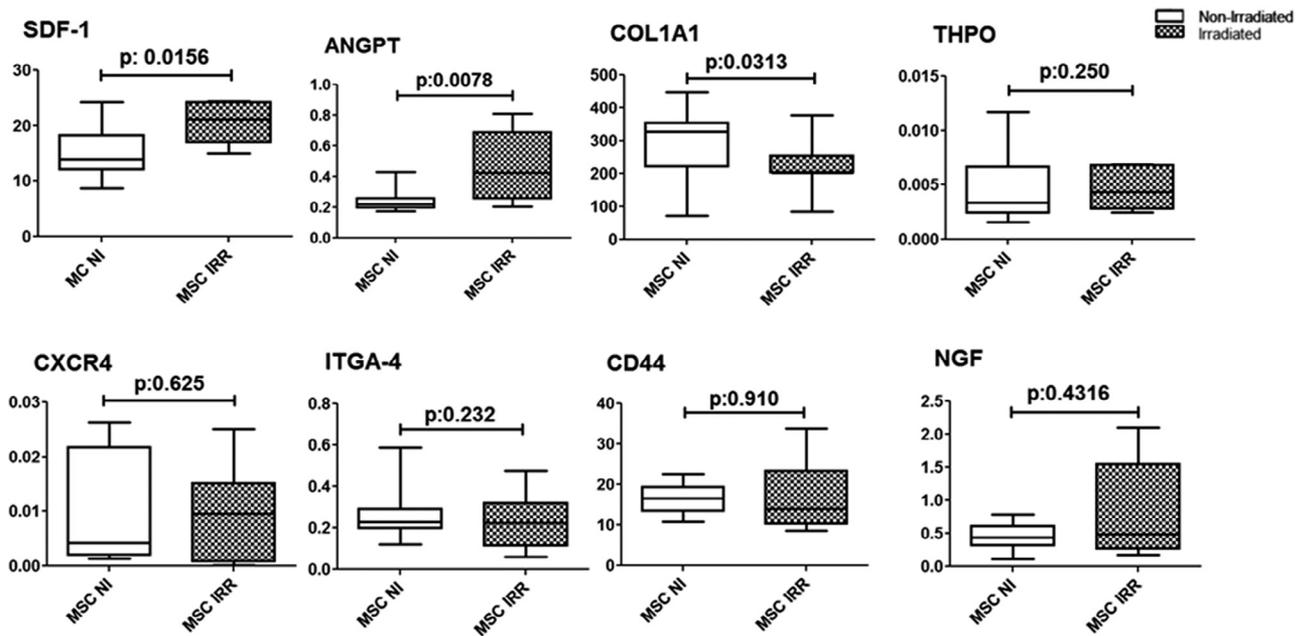


Figure 4. Expression of genes involved in hematopoiesis. Expression of *SDF1*, *ANGPT*, *COL1A1*, *THPO*, *CXCR4*, *ITGA4*, *CD44*, and *NGF* in non-irradiated (white) and irradiated (black) MSCs was performed by RT-PCR 3 days after irradiation. β -glucuronidase was used as a control.

compared with non-irradiated cells in all 3 time points ($P = .018$, $P = .046$, and $P = .018$, respectively; Figure 5E).

In addition, the expression of adipogenic differentiation genes, *CEBPA* and *PPARG*, was significantly lower in irradiated MSCs compared with non-irradiated cells ($P = .003$ and $P = .019$, respectively). Regarding genes involved in early osteogenesis, *RUNX2* was less expressed in irradiated cells ($P = .003$) compared with non-irradiated cells, whereas there were no differences in the expression of *ALP* between both groups. *SPP1*, involved in late osteogenesis and mineralization, was overexpressed in irradiated MSCs ($P = .039$; Figure 5F). Moreover, the capacity of mineralization quantified by Alizarin Red staining ($n = 10$) showed the presence of a slightly higher amount of calcium deposits in irradiated cells, although differences did not reach statistically significant differences ($P = .084$; Figure 5G).

Hematopoietic-Supportive Capacity by LT-BMCs

The ability of non-irradiated and irradiated MSCs to support hematopoiesis in vitro was assessed in LT-BMC ($n = 8$). Purity of $CD34^+$ progenitor cells isolated for these experiments was superior to 90%.

$CD34^+$ cultured with both types of stromal layers produced similar number of colonies in the first week. From the second week on more colony-forming unit (CFU)-granulocyte macrophage colonies were scored in $CD34^+$ cells grown on stromal layers from irradiated MSCs, with significant differences at the fourth and fifth weeks ($P = .046$ and $P = .007$, respectively; Figure 6).

During the 5 weeks of LT-BMC the predifferentiation status of the stromal layer coming from non-irradiated or irradiated MSCs was assessed ($n = 5$). From the first to the fifth week of culture the number of adipocytes per field in the irradiated stromal layer was significantly lower compared with the non-irradiated stromal layer (Figure 7A–C). In addition, stromal layers at the third and fifth week ($n = 6$) of LT-BMC were stained by Alizarin Red. At both time points the mineraliza-

tion level of cells was higher in stromal layers from irradiated MSCs, with significant differences at the third week ($P = .046$; Figure 7D).

DISCUSSION

After irradiation, a depletion of hematopoietic cells in the BM and subsequently in peripheral blood takes place. This depletion creates an “empty space” that favors hematopoietic engraftment after transplantation [29]. However, these effects of irradiation are generally dose dependent. After low-dose irradiation, peripheral blood mobilization and hematopoietic reconstitution are stimulated [30,31]. In this regard, Li et al. [32] reported in a murine model that transplantation of HSCs from a whole body irradiated donor led to a better engraftment than HSCs from non-irradiated mice.

The overall effects of irradiation on MSCs are only beginning to be disclosed. Despite the fact that MSCs maintain their viability, their global gene expression [33] and their capacity of differentiation can be altered even at low doses of irradiation [20].

The originality of our study is that we studied changes occurring after low-dose irradiation on human MSCs, addressing together MSC differentiation capacity and its impact on hematopoietic supportive function. The interest in low doses of irradiation is based on the fact that many groups are using low doses of total body irradiation as the sole conditioning regimen in patients with advanced age and/or comorbidities, allowing them to benefit from transplantation [16,17].

Regarding the radio-resistance of MSCs, we report that human BM MSCs irradiated with 2.5 Gy neither lose their viability nor modify their immunophenotypic profile. It is known that MSCs are less susceptible to radiation than HSCs. Sugrue et al. found that mouse MSC lines express high levels of key DNA damage response (DDR) and antiapoptotic proteins but low levels of proapoptotic proteins. Consequently, after 10 Gy of irradiation a delay of cell cycle progression was

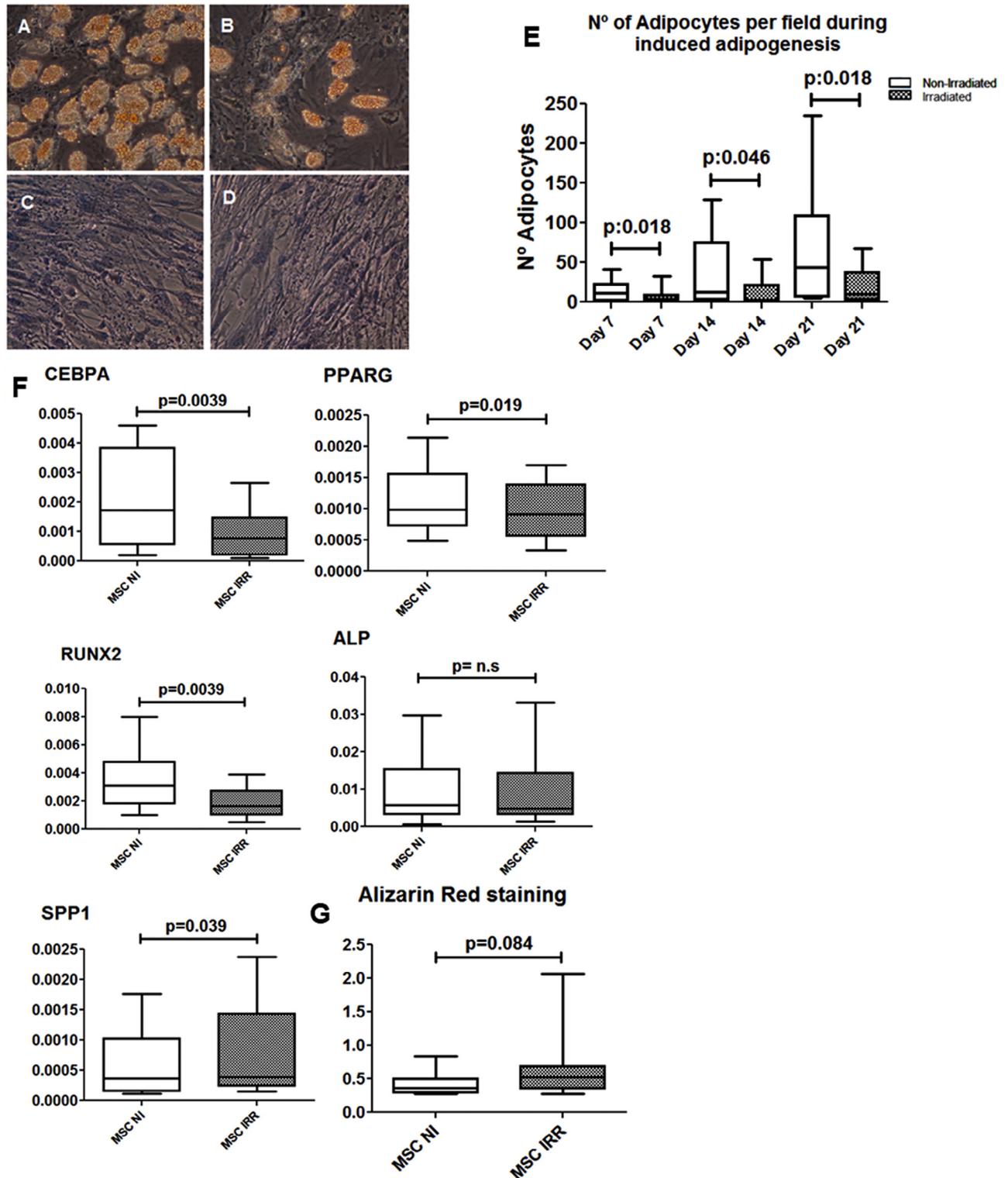


Figure 5. Differentiation capacity of irradiated MSCs. After exposure to 2.5 Gy, MSCs were cultivated in differentiation-inducing media during 21 days. Adipogenic differentiation of non-irradiated (A) and irradiated MSCs (B) was visualized by Oil-Red-O staining. Osteogenic differentiation of non-irradiated (C) and irradiated MSCs (D) was detected by alkaline phosphatase staining. The number of adipocytes growing in adipogenic differentiation medium was counted in non-irradiated (white) and irradiated MSCs (black) at days 7, 14, and 21 of the differentiation process (E). Expression of *CEBPA*, *PPARG* (adipogenesis), *RUNX2*, *ALP* (osteogenesis), and *SPP1* (mineralization) in non-irradiated (white) and irradiated MSCs (black) was performed by RT-PCR 3 days after irradiation. β -glucuronidase was used as a reference gene (F). Calcium deposition was quantified at day 21 after irradiation in non-irradiated (white) and irradiated MSCs (black) by Alizarin Red S staining in which the absorbance was proportional to calcium deposits in the sample and with the mineralization level of the cells (G).

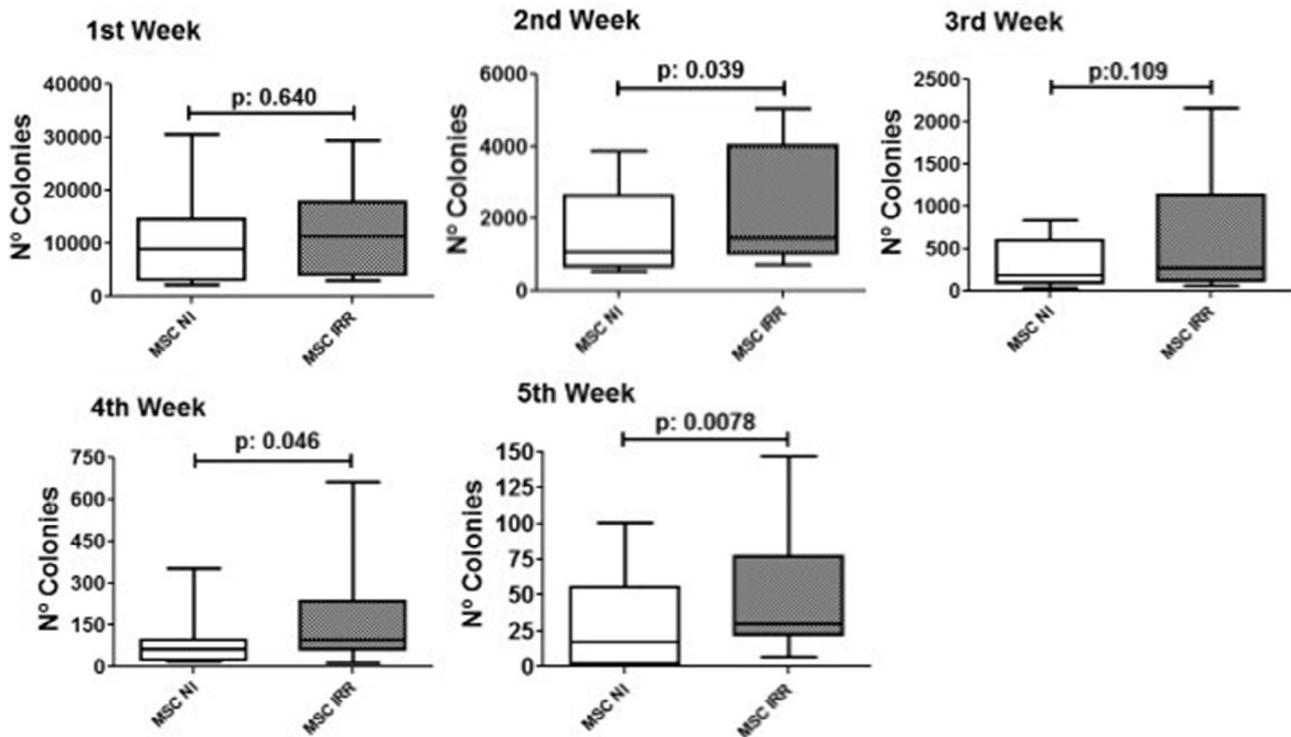


Figure 6. Colonies scored in LT-BMC. Mobilized CD34⁺ progenitor cells were isolated from leukapheresis and added to stromal layers from non-irradiated or irradiated MSCs. Clonal growth of progenitor cell population from non-irradiated (white) and irradiated (black) MSCs was assayed weekly.

observed in these cells to facilitate DNA repair before entering the next phase [34,35]. It has been also described that human MSCs display variable anatomic site-dependent response and recovery from irradiation. After exposition of 2.5 to 10 Gy of γ -irradiation, maxilla and mandible MSCs recover more quickly than iliac crest [36]. The effects on MSC as previously indicated are dose-dependent. In fact, proliferation of irradiated MSCs seems to be suppressed in a dose-dependent manner with 4 Gy of irradiation [37], whereas exposure of MSCs to low-dose irradiation was reported to result in increased proliferation of cultured rat MSCs [38,39].

We have detected an alteration in MSC global gene expression after irradiation, which is in accordance to previously reported data [33]. Genes involved in cellular cycle, protein dimerization, and vesicles formation were upregulated, whereas more than 40 genes were downregulated after irradiation. Interestingly, *PDK1*, the most downregulated gene in our analysis, is involved in adipogenesis through the activation of *CEBPA* via *GSK3* [40]. The downregulation of *PDK1* in irradiated MSCs would finally result in a downregulation of *CEBPA* (thus decreasing adipogenesis), as confirmed by RT-PCR.

We have also shown a significant overexpression of *ANGPT* and *SDF1* in MSCs after irradiation. The proper maintenance of normal HSCs within the niche is heavily dependent on the expression of these hematopoietic factors. In accordance with these data, it has been shown that low doses of irradiation could induce changes in the secretion of stem cell factor, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and *IL-11*, regulating the BM microenvironment [39].

In this regard, after irradiation treatment we have shown that MSCs retained their differentiation capacity as already described in human MSCs treated with different doses of irradiation 2 to 10 Gy [41] or even 30 to 60 Gy [42]. Although

MSCs are able to differentiate after being irradiated, we have shown here that the balance osteogenesis/adipogenesis was modified by low-dose irradiated MSCs. In the present study the expression levels of *CEBPA* and *PPARG*, key factors driving the adipogenic differentiation of BM MSCs, were decreased after irradiation. A clear reduction in the amount of adipocytes after the specific differentiation culture was also observed. This is concordant with a number of studies that describe the decrease of the adipogenic differentiation in irradiated MSCs [20,21,24]. What is more subtle are the changes in the osteogenic capacity of MSC induced by low-dose irradiation. We have seen by RT-PCR that the expression of *RUNX2* and *ALP* involved in early osteogenesis are decreased, whereas the expression of *SPP1*, involved in late osteogenesis or mineralization, increases after irradiation. In concordance with the expression of *SPP1*, the quantification of Alizarin Red-positive staining mineralization deposits are also increased in irradiated MSCs. These results are also supported by some previous reports. In this respect, Abramovitch-Gottlieb et al. [22] saw that low level laser irradiation stimulates osteogenic differentiation of MSC seeded on a 3-dimensional biomatrix, and Soleimani et al. [23] showed that low-level laser irradiation increased the BM MSC differentiation to osteoblast.

It has been shown that an altered differentiation capacity may impact the hematopoietic supportive ability of MSCs. Previous studies in murine models where mice were irradiated to induce BM aplasia have shown a significant increase in osteogenic and a decrease in adipogenic markers. Colony forming units–fibroblast from these mice favors HSC proliferation in vitro compared with colony forming units–fibroblast obtained from control mice [43]. Accordingly, we report from LT-BMC experiments that stromal layers from irradiated MSCs had a reduced adipogenic and increased osteogenic capacity

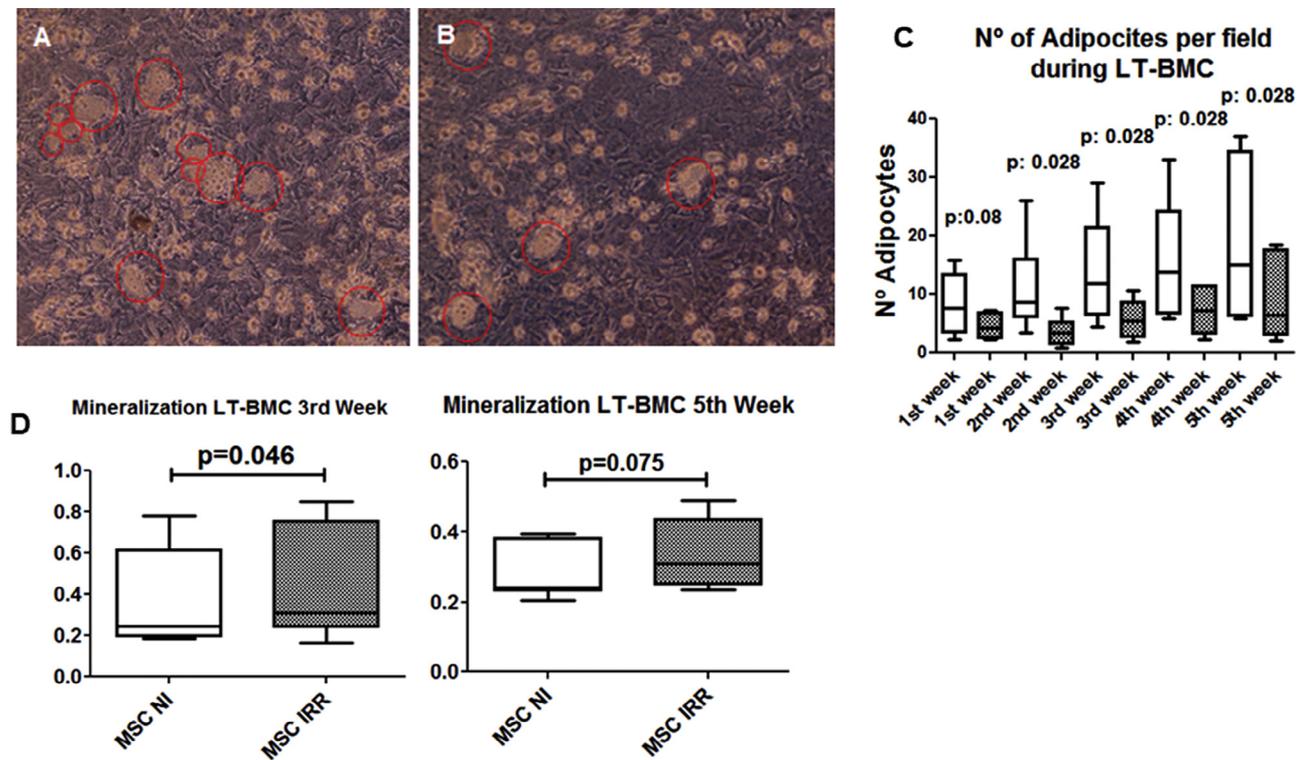


Figure 7. Differentiation status of LT-BMC stromal layer. During the 5 weeks of LT-BMC, the predifferentiation status of the stromal layer coming from non-irradiated or irradiated MSCs was assessed. Adipogenic differentiation of non-irradiated (A) and irradiated stromal layer (B) was visualized and the number of adipocytes growing were counted in non-irradiated (white) and irradiated (black) MSCs at days 7, 14 and 21 of the differentiation process (C). Calcium deposition was quantified at the third and fifth week of the LT-BMC in non-irradiated (white) and irradiated MSCs (black) by Alizarin Red S staining in which the absorbance was proportional to calcium deposits in the sample and with the mineralization level of the cells (D).

of differentiation, resulting in an increased hematopoietic colony-forming capacity. Our results are also in agreement with Naveiras et al. [5], who demonstrated that adipocyte-rich BM regions had a reduced frequency of HSCs and that adipocyte ablation in murine models enhanced hematopoietic recovery after irradiation, showing a negative regulation of hematopoiesis by BM adipocytes. There are also in vitro studies in which human MSCs induced to adipogenic differentiation attenuated the hematopoietic colony-forming capacity of CD34⁺ cells [44]. Nevertheless, some of our results showed some variability. Thus, further confirmatory studies performed on a paired sample with higher numbers of donors are warranted to assess the real impact of our results.

In summary, our results suggest that the modifications induced by low doses of γ -irradiation on the capacity of differentiation of MSCs improves their hematopoietic-supporting ability. Nevertheless, future studies are needed, especially in murine models to prove this effect in vivo. In addition, because some of the results obtained showed several variations, further studies with a higher number of paired samples are warranted. In addition, different doses of irradiation should be compared in the future to totally understand the effect of the irradiation dose on these effects.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial disclosure: Supported in part by grant PI12/01775 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), and grant HUS308U14 from Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. S.P. is supported by Santander-USAL grant. S.M. is supported by grant RD16/

001/0015 from ISCIII. C.R. is supported by Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León.

Conflict of interest statement: There are no conflicts of interest to report.

Authorship statement: M.C.C. and F.S.-G. designed the study, reviewed data, and interpreted results. S.P. and S.M. performed sample preparation, experiments, and statistical analysis. M.D.C. provided BM samples for most patients and obtained informed consent. C.R., L.I.S.A., and A.R. performed and analyzed flow cytometry studies. L.A.C. performed overall bioinformatic analysis. J.B. and L.A.P.R. irradiated the cells. T.L.R. and R.O. collaborated with LT-BMC. M.C.C., F.S.-G., S.P., and S.M. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript during its preparation and approved the final version submitted.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found online at [doi:10.1016/j.bbmt.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.007).

REFERENCES

1. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005;106:1232-1239.
2. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425:841-846.
3. Cordeiro Gomes A, Hara T, Lim VY, et al. Hematopoietic stem cell niches produce lineage-instructive signals to control multipotent progenitor differentiation. *Immunity*. 2016;45:1219-1231.
4. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25:977-988.

5. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460:259–263.
6. Belaid-Choucair Z, Lepelletier Y, Poncin G, et al. Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. *Stem Cells*. 2008;26:1556–1564.
7. Ghode SS, Bajaj MS, Kulkarni RS, Limaye LS, Shouche YS, Kale VP. Neuropilin-1 is an important niche component and exerts context-dependent effects on hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2017;26:35–48.
8. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*. 2001;226:507–520.
9. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(suppl 1):11917–11923.
10. Carrancio S, Blanco B, Romo C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: an in vitro and in vivo model. Part 2: effect on bone marrow microenvironment. *PLoS One*. 2011;6:e26241.
11. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci*. 2006;31:589–595.
12. Sanchez-Guijo F, Caballero-Velazquez T, Lopez-Villar O, et al. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:1580–1585.
13. Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011;164:1–8.
14. Brooke G, Cook M, Blair C, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18:846–858.
15. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014;124:344–353.
16. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 2001;97:3390–3400.
17. Mielcarek M, Storer BE, Sandmaier BM, et al. Comparable outcomes after nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with unrelated and related donors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:1499–1507.
18. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother Radiopharm*. 2002;17:405–426.
19. Rieger K, Marinets O, Fietz T, et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol*. 2005;33:605–611.
20. Mussano F, Lee KJ, Zuk P, et al. Differential effect of ionizing radiation exposure on multipotent and differentiation-restricted bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2010;111:322–332.
21. Schonmeyer BH, Wong AK, Soares M, Fernandez J, Clavin N, Mehrara BJ. Ionizing radiation of mesenchymal stem cells results in diminution of the precursor pool and limits potential for multilineage differentiation. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122:64–76.
22. Abramovitch-Gottlieb L, Gross T, Naveh D, et al. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci*. 2005;20:138–146.
23. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts—an in vitro study. *Lasers Med Sci*. 2012;27:423–430.
24. Li J, Kwong DL, Chan GC. The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. *Pediatr Transplant*. 2007;11:379–387.
25. Wang Y, Zhu G, Wang J, Chen J. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2016;13:213–223.
26. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol*. 2008;36:1014–1021.
27. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4:249–264.
28. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:5116–5121.
29. Green DE, Rubin CT. Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone*. 2014;63:87–94.
30. Zhang L, Tian Y, Wu Y, et al. Low-dose radiation-induced hormetic effect on hematopoietic reconstitution. *Int J Radiat Biol*. 2010;86:329–333.
31. Wang GJ, Cai L. Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation. *Toxicol Sci*. 2000;53:369–376.
32. Li W, Wang G, Cui J, Xue L, Cai L. Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. *Exp Hematol*. 2004;32:1088–1096.
33. Sokolov M, Neumann R. Global gene expression alterations as a crucial constituent of human cell response to low doses of ionizing radiation exposure. *Int J Mol Sci*. 2016;17:55–73.
34. Sugrue T, Brown JA, Lowndes NF, Ceredig R. Multiple facets of the DNA damage response contribute to the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cell lines. *Stem Cells*. 2013;31:137–145.
35. Sugrue T, Lowndes NF, Ceredig R. Mesenchymal stromal cells: radio-resistant members of the bone marrow. *Immunol Cell Biol*. 2013;91:5–11.
36. Damek-Poprawa M, Stefanik D, Levin LM, Akintoye SO. Human bone marrow stromal cells display variable anatomic site-dependent response and recovery from irradiation. *Arch Oral Biol*. 2010;55:358–364.
37. Zhang Z, Zhang H, Liu F, Qiu M, Tong J. Effects of gamma radiation on bone-marrow stromal cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73:514–519.
38. Liang X, So YH, Cui J, et al. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells. *J Radiat Res*. 2011;52:380–386.
39. Yang L, Liu Z, Chen C, et al. Low-dose radiation modulates human mesenchymal stem cell proliferation through regulating CDK and Rb. *Am J Transl Res*. 2017;9:1914–1921.
40. Kwak DH, Lee JH, Song KH, Ma JY. Inhibitory effects of baicalin in the early stage of 3T3-L1 preadipocytes differentiation by down-regulation of PDK1/Akt phosphorylation. *Mol Cell Biochem*. 2014;385:257–264.
41. Nicolay NH, Sommer E, Lopez R, et al. Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;87:1171–1178.
42. Fekete N, Erle A, Amann EM, et al. Effect of high-dose irradiation on human bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21:112–122.
43. Poncin G, Beaulieu A, Humblet C, et al. Characterization of spontaneous bone marrow recovery after sublethal total body irradiation: importance of the osteoblastic/adipocytic balance. *PLoS One*. 2012;7:e30818.
44. Le Y, Fraigneau S, Chandran P, et al. Adipogenic mesenchymal stromal cells from bone marrow and their hematopoietic supportive role: towards understanding the permissive marrow microenvironment in acute myeloid leukemia. *Stem Cell Rev*. 2016;12:235–244.

The Incorporation of Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stromal Cells Into CD34⁺ Cells Increases Their Clonogenic Capacity and Bone Marrow Lodging Ability

SILVIA PRECIADO,^{a,b,c,d} SANDRA MUNTIÓN ^{a,b,d}, LUIS A. CORCHETE,^a TERESA L. RAMOS,^{d,e} ANA G. DE LA TORRE,^{a,f} LIKA OSUGUI,^a ANA RICO,^{a,b} NATALIA ESPINOSA-LARA,^{a,b} IRENE GASTACA,^g MARÍA DÍEZ-CAMPELO,^{a,c,d} CONSUELO DEL CAÑIZO,^{a,b,c,d,f} FERMÍN SÁNCHEZ-GUIJO^{a,b,c,d,f}

Key Words. Engraftment • Extracellular vesicles • Stem cell transplantation • Mesenchymal stromal cells • Hematopoietic stem cells

^aServicio de Hematología, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ^bCentro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, Salamanca, Spain; ^cDepartment of Medicine, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ^dRETIC TerCel, ISCIII, Salamanca, Spain; ^eLaboratorio de Terapia Celular, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), UGC-Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/CIBERONC, Sevilla, Spain; ^fCentro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain; ^gServicio de Ginecología, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

Correspondence: Sandra Muntión, Ph.D., Servicio de Hematología, IBSAL-Hospital Universitario de Salamanca, Paseo San Vicente 58-182, Salamanca 37007, Spain. Telephone: 923 291100; e-mail: smuntion@usal.es

Received November 15, 2018; accepted for publication April 20, 2019; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* June 11, 2019.

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.3032>

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSC) may exert their functions by the release of extracellular vesicles (EV). Our aim was to analyze changes induced in CD34⁺ cells after the incorporation of MSC-EV. MSC-EV were characterized by flow cytometry (FC), Western blot, electron microscopy, and nanoparticle tracking analysis. EV incorporation into CD34⁺ cells was confirmed by FC and confocal microscopy, and then reverse transcription polymerase chain reaction and arrays were performed in modified CD34⁺ cells. Apoptosis and cell cycle were also evaluated by FC, phosphorylation of signal activator of transcription 5 (STAT5) by WES Simple, and clonal growth by clonogenic assays. Human engraftment was analyzed 4 weeks after CD34⁺ cell transplantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. Our results showed that MSC-EV incorporation induced a downregulation of proapoptotic genes, an overexpression of genes involved in colony formation, and an activation of the Janus kinase (JAK)-STAT pathway in CD34⁺ cells. A significant decrease in apoptosis and an increased CD44 expression were confirmed by FC, and increased levels of phospho-STAT5 were confirmed by WES Simple in CD34⁺ cells with MSC-EV. In addition, these cells displayed a higher colony-forming unit granulocyte/macrophage clonogenic potential. Finally, the *in vivo* bone marrow lodging ability of human CD34⁺ cells with MSC-EV was significantly increased in the injected femurs. In summary, the incorporation of MSC-EV induces genomic and functional changes in CD34⁺ cells, increasing their clonogenic capacity and their bone marrow lodging ability. *STEM CELLS* 2019;00:1–12

SIGNIFICANCE STATEMENT

In the current study, the authors validate for the first time that preincubating human CD34⁺ cells with extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells not only modifies the gene expression of the recipient cells (inducing a downregulation of proapoptotic genes and overexpression of genes involved in colony formation and JAK-STAT pathway) but also significantly increases their *in vitro* clonogenic ability and, most importantly, increases their 4-week bone marrow lodging ability *in vivo* in a standard xenotransplantation model. This strategy could potentially be exploited to increase the hematopoietic engraftment in the clinical setting.

INTRODUCTION

Graft failure or poor engraftment and their consequences are important complications after allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT). Such complications can be caused by an insufficient number of transplanted cells, by the presence of antibodies, or by a defective stroma [1–3].

It should be noted that bone marrow (BM) stroma remains of host origin after allo-SCT and can be damaged because of a number of factors,

including chemotherapy, infections or their treatments, graft-versus-host disease, or high-dose radiotherapy [4, 5].

Mesenchymal stromal cells (MSC) play an important role in the regulation of most cells of the BM microenvironment [6–8]. From a therapeutic perspective, the administration of MSC has been shown to increase the engraftment ability and the hematopoietic function in preclinical models of xenotransplantation [9–13]. In addition, it has been shown that the

administration of MSC from third-party donors can also potentially increase the engraftment and improve post-transplant cytopenias [14, 15].

It has been recently demonstrated that some of the beneficial effects of MSC can be exerted through the release of extracellular vesicles (EV) [16, 17]. Although there are several types of EV depending on their size and origin (e.g., exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies), all EV are small-size membrane-derived particles that selectively carry some mRNA, microRNA, lipids, and proteins that can be incorporated into recipient cells and modify their function [18–21].

Several groups have shown that MSC-EV participate in the communication between microenvironment and CD34⁺ cells [18, 22, 23]. Recent studies have demonstrated that EV released by MSC could have similar effects to those of MSC [24–26].

In the current work, we wanted to evaluate multiparametrically the changes induced in CD34⁺ cells after the incorporation of MSC-derived EV. Moreover, we have assessed if this incorporation has functional implications, evaluating their clonogenic ability *in vitro* and the *in vivo* engraftment in a xenotransplantation model.

MATERIALS AND METHODS

MSC Isolation and Expansion

BM-MSC were isolated from 48 healthy donors (29 males and 19 females) with a median age of 40 years (range 18–83 years), after written informed consent was obtained. All experimental procedures were approved by local Ethics Committee (code 70/07/2015).

BM mononuclear cells (BM-MNC) were isolated by density-gradient centrifugation (Ficoll-Paque, density: 1.077 g/ml, GE Healthcare-BioSciences). Cells were seeded at a density of 1×10^6 cells per centimeter square and expanded as previously described at 37°C and 5% of CO₂ in a humidified atmosphere [27, 28] in Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose (Gibco, Life-Technologies) with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin. After third passage, MSC were assessed according to the criteria proposed by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [29].

CD34⁺ Cell Isolation

CD34⁺ cells were isolated from residual material from leukapheresis products of 33 healthy donors (23 males and 10 females) with a median age of 47 years (range 20–71 years) used in our Transplant Program. A small aliquot (1 ml) of fresh leukapheresis products from healthy volunteer donors in our allogeneic stem cell transplant program was used for the study. All donors had been prior evaluated in our pretransplant clinic, and informed consent was obtained to obtain an aliquot for research purposes in case the CD34⁺ cell counts obtained exceeded the required maximum amount for a standard sibling allo-SCT according to institutional standard operational procedures. CD34⁺ cells were purified by immunomagnetic sorting in an AutoMACS (MiltenyiBiotec GmbH) after labeling with the human CD34 MicroBead Kit (MiltenyiBiotec). Purity and viability of cells was confirmed by flow cytometry (FC). The mobilization regimen for the donors was exclusively filgrastim at 5 µg/kg/12 hours during 4 days.

Only for xenotransplantation experiments (see below), CD34⁺ cells were isolated from umbilical cord blood (UCB),

based on the higher *in vivo* engraftment ability compared with adult CD34⁺ cells [30]. Ten fresh UCB units were either purchased from the Barcelona Blood and Tissue Bank and CHEMCYL or kindly provided by the Obstetrics Department of Hospital Universitario de Salamanca following standard procedures, after proper informed consent was obtained from the corresponding mothers. MNCs were isolated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation, and then CD34⁺ cells were isolated following the same protocol used for leukapheresis-derived cells. Nevertheless, to confirm that some of the observed results were also induced in cord-blood cells, some experiments were additionally performed and are included in Supporting Information Figure S2.

EV Isolation and Characterization

To avoid collecting EV from fetal calf serum, the latter was removed from the culture medium for 12 hours. Then, the supernatant was collected and centrifuged at 3,000g for 20 minutes and then at 10,000g for 30 minutes. Supernatants were then ultracentrifuged at 100,000g for 70 minutes at 4°C using a Beckman Coulter OptimaL-90K ultracentrifuge (Fullerton, CA) [31]. Then, EV were characterized by:

- Nanoparticle tracking analysis (NTA): EV size distribution and the amount of particles per millimeter were quantified using a NanoSight LM10 instrument (Nanosight Ltd., UK) with the NTA2.0 software.
- Transmission electron microscopy (TEM): The EV containing pellet was fixed in 2% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde and processed as described in Supporting Information Methods section. Samples were examined under a TEM (FEITecni G2 Spirit Biotwin) using a digital camera (Morada, Soft Imaging System, Olympus) [32].
- Flow cytometry: For immunophenotypic characterization, EV were incubated with monoclonal antibodies (see Supporting Information Methods section for details). Samples were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) using the FACSDiva 6.1 software (BD Biosciences). The cytometer was previously calibrated and compensated [33]. A mixture of fluorescent beads based on 1 µm monodisperse polystyrene (Sigma-Aldrich) and PerfectCount Microspheres (Cytognos, Salamanca, Spain) of 6–6.4 µm in size was used as a size marker. A total of 10^5 events were acquired. Data were analyzed with the Infinicyt software (Cytognos, Salamanca).
- Western blot: EV were lysed in $\times 1$ RIPA lysis buffer with Phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor cocktail, and sodium orthovanadate. Protein samples were loaded on a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gel and transferred to a poly(vinylidene fluoride) membrane, which was incubated with primary antibody followed by the corresponding horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Supporting Information data). The chemiluminescence was detected using Clarity Western ECL Substrate (BioRad).

Incorporation of EV into CD34⁺ Cells

To allow the incorporation of MSC-EV into human CD34⁺ cells, 1×10^5 CD34⁺ cells were cocultured with MSC-EV for 24 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) as it was described before [23]. For each coculture, around 30 µg of protein from MSC-derived EV was used. The same amount of CD34⁺ cells without EV was used as control.

To allow their tracking before coculture, EV were stained with Vybrant Dil cell labeling solution (Life Technology), following manufacturer's instructions [23, 34]. As a control, an ultracentrifugation tube was included containing only phosphate-buffered saline and Vybrant Dil. Then, the incorporation was measured both by FC and confocal microscopy. For the former, cells from 13 samples were stained and acquired in a FACSCalibur flow cytometer and analyzed with Flow JO (Oregon). For immunofluorescence, CD34⁺ cells were processed as indicated in Supporting Information. Cellular nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Cells were viewed with a TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) with the LAS AF acquisition program (version 2.6.0.7266).

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction of Stromal-Cell-Derived Factor-1 and Collagen Type I Alpha I

Total RNA was extracted from 10 pairs of CD34⁺ cells. cDNA was prepared by reverse transcription using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), and the converted cDNA was analyzed for stromal-cell-derived factor-1 (*SDF-1*) and Collagen type I Alpha I (*COL1A1*). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as a control. Genes were quantified using TaqMan Gene Expression Assays and the Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Relative quantification was calculated from the $2^{-\Delta C_t}$ values where: $\Delta C_t = C_t^{\text{Gene}} - C_t^{\text{Control}}$.

Gene Chip Human Gene ST Arrays

Total RNA was isolated and purified from five pairs of CD34⁺ cells cocultured for 24 hours using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed using Agilent 2100 Bioanalyzer. Labeling and hybridizations were performed according to protocols from Affymetrix in a Human Gene 2.0 ST Array. Washing and scanning were performed using GeneChip System of Affymetrix (GeneChip Hybridization Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450 and GeneChip Scanner 7G). The analysis is further detailed in Supporting Information. Genes with a *q*-value <0.05 were considered to be significantly expressed. The functional and pathway analysis was carried out in the Webgestalt application [35]. The Gene Expression Omnibus entry for each sample includes the raw data (code #GSE120803) and is located at the following website link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=exozqmwofdqblmj&acc=GSE120803>

Apoptosis and Caspase Activity Assays

After 24 and 48 hours of coculture, CD34⁺ cells were stained with Annexin V, 7-amino-actinomycin (7-AAD) using the BD Pharmigen PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences). Cells were also labeled with fluorescein isothiocyanate-conjugated CD34. Samples were acquired on a FACS Calibur device. At least 5×10^4 events were recorded. Data were analyzed using Infinicyt. Cells were considered to be in an early apoptotic state, late apoptosis, or dead if they were Annexin V⁻/7-AAD⁻, Annexin V⁺/7-AAD⁺, or Annexin V⁻/7-AAD⁺, respectively, as previously reported [27] (Supporting Information Fig. S3A). Caspase 3/7 and caspase 9 activity was measured after 24 hours of coculture using the Caspase-Glo 3/7 Assay Systems kit and the Caspase-Glo 9 Assay Systems kit (Promega). Ten samples were used to perform these experiments.

Cell Cycle Analysis

Ten samples of CD34⁺ cells were cocultured for 24 hours and stained with propidium iodide using the kit BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit (Beckton Dickinson), according to manufacturer's instructions. Samples were acquired in a FACS Calibur flow cytometer and analyzed using ModFit LT V5.0.9 (Verity Software; Supporting Information Fig. S3B).

Flow Cytometric Analysis of Proteins Involved in Hematopoiesis

Ten samples of CD34⁺ cells were incubated with the corresponding monoclonal antibodies (see Supporting Information). Samples were acquired on a FACS Calibur flow cytometer using Cellquest Pro software. Data were analyzed using the Infinicyt software. Data were represented as mean fluorescence intensity (Supporting Information Fig. S4).

Capillary Electrophoresis Immunoassay

Whole-cell lysates were obtained from two samples of CD34⁺ cells with or without incorporation of MSC-EV. Capillary Electrophoresis Immunoassay or Simple Western analyses were performed using the WES machine (ProteinSimple, Santa Clara, CA), according to the manufacturer's protocols [36]. The data were analyzed with inbuilt Compass software (ProteinSimple). Further details are provided in Supporting Information. For the assay, we used primary antibodies Calnexin, signal activator of transcription 5 (STAT5), and p-STAT5 (see also Supporting Information).

Clonogenic Assays

CD34⁺ cells from 10 samples were incubated in different conditions for 24 hours. Then, cells were recovered, and 1,500 cells were seeded into methylcellulose MACS Media Stem MACS HSC-CFU complete without Epo human (Miltenyi Biotec, Germany) to quantify progenitor cell colony-forming unit granulocyte/macrophage (CFU-GM), according to the manufacturer's instructions. After 14 days at 37°C in a fully humidified atmosphere of 5% CO₂, CFU-GM was scored using an inverted microscope.

Analysis of Human Hematopoietic Engraftment in Mice

For in vivo studies, 6-week-old nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID; NOD.CB17-Prkdcscid/NcrCrl) mice were purchased from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain) and maintained in the animal care facility of the University of Salamanca. All procedures followed the Spanish and European Union guidelines (RD 1201/05 and 86/609/CEE) and were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca (reg. 201100007924).

The murine transplant model was established as previously reported with minor modifications [9]. Thirty female mice were used (10 per experimental group). Six hours before transplantation, mice were irradiated with 350 cGy total body irradiation using a cesium source (Gammacell-200, Nordion International). Animals were anesthetized with a mixture of ketamine (90 mg/kg; Imalgene 500) and xylazine (10 mg/kg; Rompun 2%, KVP Pharma). Two experimental groups were established: (1) 2×10^5 UCB CD34⁺ cells and (2) 2×10^5 UCB CD34⁺ cells previously cocultured with MSC-EV. For each coculture, around 60 µg of protein from MSC-derived EV was used. Cocultures were incubated for 24 hours in a volume of 500 µl RPMI per well. Then 1×10^5 cells were administered via intraperitoneally,

through the knee. Four weeks after transplantation, mice were sacrificed and the hematopoietic engraftment was evaluated by FC in the injected femur (right), contralateral femur (left), and spleen [37]. All cell suspensions were collected and red blood cells were lysated. Samples were stained with monoclonal antibodies (specified in Supporting Information). Data analysis is detailed in Supporting Information.

Statistical Analysis

Values were summarized as median and range. The nonparametric Wilcoxon Signed Ranks Test was used, and *p* values <.05 were considered significant. Statistical analyses were done with GraphPad Prism version 5.00 for Windows.

RESULTS

Characterization of MSC, CD34⁺ Cells, and MSC-EV

In all the assays, MSCs were characterized according to the definition criteria established by ISCT [29] and as previously described [27] (Supporting Information Fig. S1). The viability of MSC at the time when EV were collected was over 77% in all cases.

CD34⁺ progenitor cell purity after immunomagnetic sorting was in all cases >85%. The viability was higher than 80% in all cases.

EV size evaluated by NTA was homogeneous among samples with a mean of 131.93 nm (range: 124.4–143.6 nm). Mean particle concentration was 9.09×10^{10} particles per milliliter (range: 5.16×10^{10} – 1.21×10^{11} ; Fig. 1A). In addition, the characteristic rounded morphology of EV with a hypodense center and the typical bilayer membrane was observed by TEM. (Fig. 1B) Next, FC analysis showed that all EV had a size smaller than 1 μ m, were negative for hematopoietic markers as CD34 and CD45, and positive for MSC markers (as CD90 and CD44) and exosome markers (as CD81 and CD63). Unstained EV were used as control. (Fig. 1C) Finally, by Western blot analysis, the characteristic expression of CD63 was also demonstrated (Fig. 1D). These results fulfill the recommendations of the International Society of Extracellular Vesicles [38].

Incorporation of MSC-EV into CD34⁺ Cells

The incorporation was first demonstrated by FC, and as it is shown in (Fig. 2A), the median of cells that had incorporated EV after 24 hours of coinubation was 40.34%. As a control, culture media without EV was labeled with Vybrant Dil and incubated in the same conditions with CD34⁺ cells. The incorporation was negative as well as when CD34⁺ cells were cultured alone for 24 hours.

To confirm these results, incorporation of MSC-EV into CD34⁺ cells was also demonstrated by confocal microscopy (Fig. 2B).

In addition, the reverse transcription polymerase chain reaction expression of *SDF-1* and *COL1A1*, genes that are described to be highly expressed in MSC, was increased in CD34⁺ cells that had been incubated with EV compared with control CD34⁺ cells (Fig. 2C).

Gene Expression Profiling of CD34⁺ Cells

In order to obtain a global view of the changes induced on CD34⁺ cells after the incorporation of MSC-EV, the gene expression profiling (GEP) of five samples was analyzed.

Applying SAM analysis, we found statistically significant differences in the expression of 608 genes between CD34⁺ cells alone and CD34⁺ cells that had incorporated MSC-EV out of 7,460 tested genes by applying the established filtering criteria.

Of them, 176 genes were upregulated and 432 genes were downregulated after the incorporation. These genes were involved in several pathways. One of these pathways was apoptosis where 12 genes were altered, among which some proapoptotic genes as *CASP3* and *CASP6* were downregulated, whereas some anti-apoptotic genes as *BIRC2*, *BIRC3*, and *NFKB* were upregulated. Another altered pathway was Janus kinase (JAK)-STAT that, overall, was upregulated. Hematopoietic cell lineage pathway had also some upregulated genes as *IL11*, *CD22*, and *IL3RA* involved in hematopoietic colony formation. Also cytokine-cytokine receptor interaction pathway was upregulated (Fig. 3; Supporting Information Table S1). Also, CD44, very important molecule in hematopoietic engraftment, and prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (*PTGS1*, *COX1*), precursor of prostaglandine E2 (*PGE₂*), were upregulated within the incorporation of MSC-EV.

Incorporation of MSC-EV into CD34⁺ Cells Increases Their Viability and Decreases Their Caspase Activity

As we observed in the GEP analysis, the incorporation of MSC-EV into CD34⁺ cells could induce changes in the genes involved in viability/apoptosis. In order to confirm these results, cell viability assay was performed after 24 hours (*n* = 14) and 48 hours (*n* = 11) of coculture with EV. After 24 hours of culture, 87.01% (80.19%–93.02%) of CD34⁺ cells were viable, and the incorporation of EV did not show any benefit in terms of early viability. However, after 48 hours of culture, CD34⁺ cells which incorporated MSC-EV had a significantly higher median viability compared with control cells, 72.19% (range: 67.85%–83.7%) versus 67.28% (range 63.66%–72.62%). This increase in cell viability was related to a significant decrease of late apoptotic cells (Annexin V⁺/7-AAD⁺) and dead cells (Annexin V⁻/7-AAD⁺; Fig. 4A). Besides, caspase 3/7 and caspase 9 activity was measured after 24 of coculture (*n* = 10). We observed a significant decrease in the activity of both caspase 3/7 and caspase 9 after the incorporation of MSC-EV in CD34⁺ cells (Fig. 4B).

Incorporation of MSC-EV into CD34⁺ Cells Do Not Significantly Modifies Cell Cycle S-Phase

To further investigate the implication of EV incorporation into CD34⁺ cells, cell cycle was studied in 11 samples. Cell cycle results showed that after 24 hours of culture, the percentage of cells in S phase was similar in the MSC-EV group (1.725 ± 0.3) compared with CD34⁺ controls (1.501 ± 0.22). However, we detected a significant decrease in the percentage of cells in phase G₀/G₁ in CD34⁺ cells that have incorporated MSC-EV (*p* = .032; Fig. 4C).

Expression of Genes Involved in Hematopoiesis in CD34⁺ Cells

Protein expression of genes involved in the maintenance of hematopoiesis was studied by FC. We detected a significant increase of CD44 expression after the incorporation of MSC-EV into CD34⁺ cells (already shown in the GEP analysis). We did not find significant changes in C-X-C chemokine receptor type 4 (*CXCR4*), Integrin Subunit Alpha 4 (*ITGA-4*), and c-KIT expression (Fig. 5A).

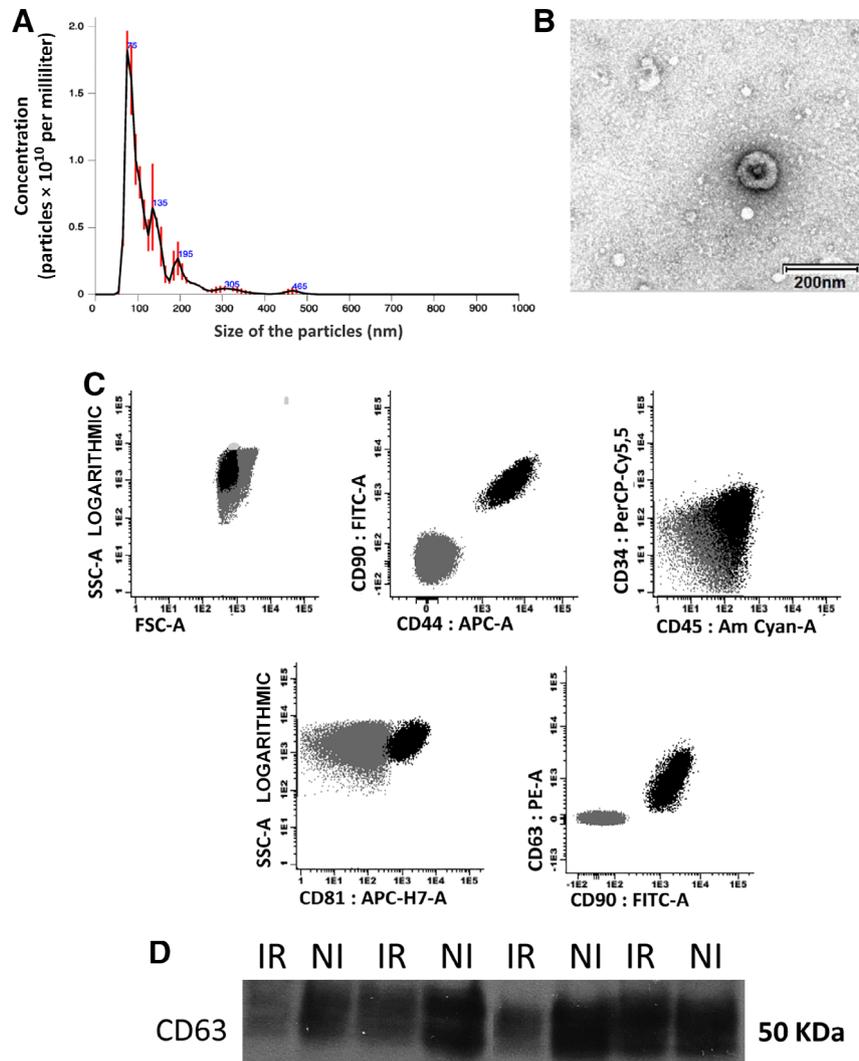


Figure 1. Characterization of extracellular vesicles (EV) released from mesenchymal stromal cells (MSC). Size distribution (nm) and concentration (particles $\times 10^{10}$ per milliliter) quantified by nanoparticle tracking analysis. **(A):** Representative graph for one sample of EV obtained from 3×10^6 MSC. **(B):** EV samples contrasted with uranyl-oxalate solution and examined under a transmission electron microscope. Scale bar = 200 nm, original magnification $\times 8,000$. Representative image of flow cytometry characterization of EV in one sample. Gates of EV were defined in the forward and side scatter dot plot by setting the upper size limit in 1 μ m. Microbeads with a diameter of 1 μ m were used for that purpose. The other dot plots represent EV stained with hematopoietic markers (CD34 and CD45), mesenchymal markers (CD90 and CD44), and exosomes markers (CD81 and CD63). Unstained controls are shown in gray, and EV stained with different antibodies are represented in black. **(C):** Samples were acquired on a FACS Calibur flow cytometer. **(D):** EV characterization by Western blot assay for the expression of CD63. Abbreviations: SSC, side scatter; FSC, forward scatter.

By WES Simple, we have also detected an increase in the levels of phospho-STAT5 after the incorporation of MSC-EV in CD34⁺ cells. The ratio phospho-STAT5/STAT5 increases in all cases after the incorporation of MSC-EV but the increase is heterogeneous among different samples of MSC-EV (Fig. 5B). These results were confirmed by FC where an increase in the mean of fluorescence intensity of p-STAT5 after the incorporation of MSC-EV in CD34⁺ cells was observed (Supporting Information Fig. S5).

Incorporation of MSC-EV into CD34⁺ Cells Increases Their Clonogenic Capacity

Clonogenic studies were performed in 10 samples. We observed that the capacity of CD34⁺ to form CFU-GM was significantly higher in those cells that had incorporated MSC-EV compared

with control CD34⁺ cells ($p = .032$). There were no differences in the size or shape of colonies between both experimental groups (Fig. 5C). The same results were observed in a subset of experiments performed with cord-blood CD34⁺ cells (Supporting Information Fig. S2).

Incorporation of MSC-EV into CD34⁺ Cells Increases Their BM Lodging Ability in NOD/SCID Mice

In vivo effects of the incorporation of MSC-EV were analyzed in a hematopoietic xenotransplantation model. For that, CD34⁺ cells with or without EV incorporation were injected intrafemorally into NOD/SCID mice. Human chimerism (human CD45⁺ cell percentage) after 4 weeks was analyzed in both the injected (right) and noninjected (left) femurs and the spleen ($n = 10$; Fig. 6).

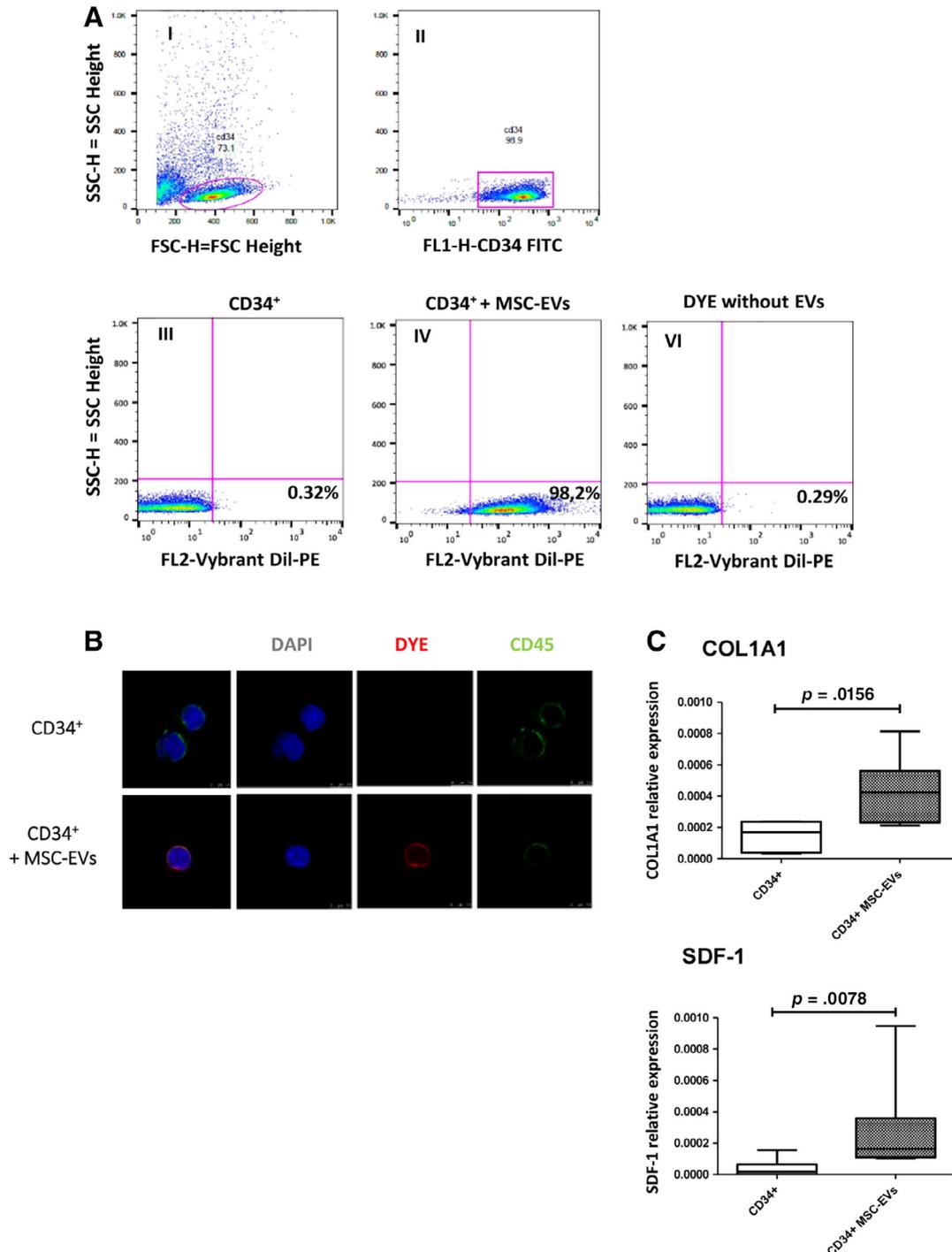


Figure 2. Uptake of EV from MSC into CD34⁺ cells. EV previously stained with fluorescent dye Vybrant Dil cell labeling solution (red) were cultured with CD34⁺ cells for 24 hours. Representative images of the incorporation after 24 hours by flow cytometry in one sample. The first two dot plots show the forward and side scatter axes (I) and the gate of cells that are positive for CD34 Ab (II). The other dot plots represent the percentage of CD34⁺ cells that have incorporated EV: CD34⁺ cells alone (III), CD34⁺ cells cultured with MSC-EV (IV), and CD34⁺ cells cultured with supernatant without EV, stained with Vybrant Dil (V). (A): Samples were acquired on a FACS Calibur flow cytometer. Representative images of the incorporation after 24 hours by confocal microscopy in one sample. Scale bar = 7.5 μ m. CD34⁺ cells were labeled with anti-CD45 ab (in green). Nuclei were stained with DAPI (blue). (B): Images in the top row represent cells without EV; images in the bottom row are from CD34⁺ cells that had incorporated MSC-EV. Relative expression of SDF-1 and COL1A1 in CD34⁺ alone or cultured with MSC-EV performed by reverse transcription polymerase chain reaction. (C): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as control $n = 10$. Abbreviations: COL1A1, collagen type i alpha 1; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; EV, extracellular vesicles; FSC, forward scatter; MSC, mesenchymal stromal cells; SDF-1, stromal-cell-derived factor-1; SSC, side scatter.

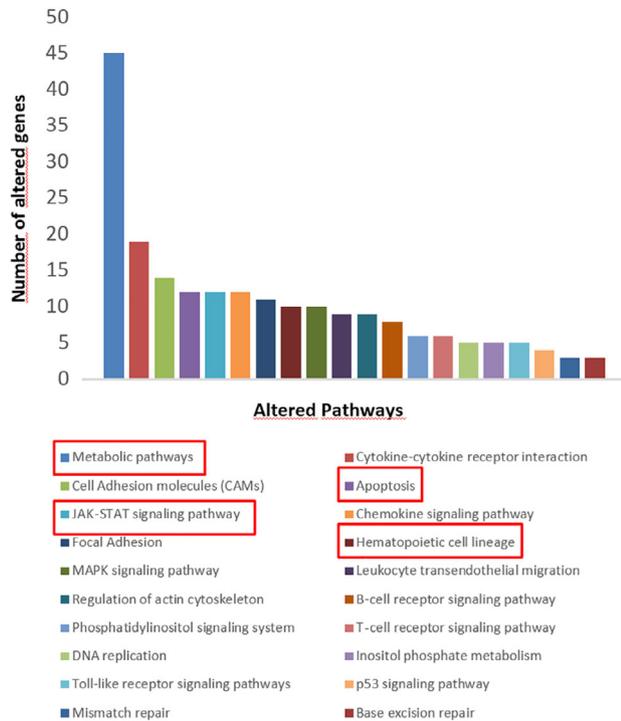


Figure 3. Gene expression profiling of CD34⁺ cells. Purified RNA from five samples in both conditions (alone or with mesenchymal stromal cells-extracellular vesicles) was hybridized in gene expression arrays (Affymetrix). The significance analysis of microarrays technique was used for the identification of differentially expressed genes among samples. Column graph representing the most altered pathways after a pathway analysis using the KEGG database and Webgestalt. Abbreviation: KEGG, kyoto encyclopedia of genes and genomes.

The percentage of human CD45⁺ cells in the injected femur was significantly higher in mice transplanted with CD34⁺ that had incorporated MSC-EV ($p = .027$) compared with CD34⁺ cells alone (Fig. 6A). Nevertheless, we did not observe significant differences between both groups in the left femurs and spleens (Fig. 6A).

In order to analyze multilineage cell engraftment, cell subpopulations were evaluated only in the injected femurs (right) due to their higher engraftment. We found higher levels of human CD34⁺, CD14⁺, CD13⁺, and CD19⁺ cells in mice transplanted with CD34⁺ cells that had incorporated MSC-EV compared with CD34⁺ cells alone, but these differences were not significant (Fig. 6B).

DISCUSSION

The current work validates the potential role of a new approach to benefit from the effects of MSC administration on hematopoietic function of CD34⁺ cells in the transplant setting: preincubating human CD34⁺ cells with EV derived from human MSC and infusing only the CD34⁺ cells. This strategy significantly increases the *in vitro* clonogenic ability of CD34⁺ cells but most importantly increase their 4-week BM lodging ability *in vivo* in the injected femur.

There is extensive information on the role of MSC to improve the hematopoietic engraftment [9, 39–42], and the administration of MSC to improve engraftment is being explored in clinical trials. As MSC may exert some of their effects through the

release of EV [24, 43, 44], there are some preclinical studies that have explored the role of MSC-EV in the improvement of hematopoiesis after hematopoietic transplantation [25, 45, 46] and to analyze the MSC-EV influence on CD34⁺ cells gene expression pattern, altering their survival and promoting their homing to the BM [26]. In this regard, we have observed that the incorporation of MSC-EV into CD34⁺ cells modifies the expression of some genes (176 upregulated and 432 downregulated) compared with control CD34⁺ cells. Some of these genes were involved in apoptosis. Therefore, we confirmed by FC that apoptosis was significantly decreased in CD34⁺ cells that incorporated vesicles. This is in accordance with findings that MSC-EV can down-regulate phosphorylation of H2AX after damage to CD34⁺ cells, leading to a better DNA repair efficiency and the inhibition of apoptosis [47]. It has also been reported that the mechanisms underlying recovery of CD34⁺ cells by MSC-EV are not only due to a decrease in apoptosis but also due to a stimulation of proliferation. We have observed an upregulation of JAK-STAT pathway and confirmed the increased levels of STAT5 phosphorylation by WES Simple and FC after the incorporation of MSC-EV in CD34⁺ cells. Although there are no previous data on the implications of this (probably transient) upregulation of JAK-STAT on CD34⁺ cells induced by MSC-EV incorporation, it is well established that a constitutive upregulation of this signaling pathway (as observed in V617F JAK-2 mutations in myeloproliferative neoplasms) leads to CD34⁺ cell proliferation and reduced apoptosis [48, 49]. In addition, an upregulation of JAK/STAT signaling has been shown in CD34⁺ cells from acute myeloid leukemia patients compared with normal cord blood or peripheral blood stem cells, suggesting that JAK/STAT signaling supports AML cells growth and survival [50, 51]. In addition, De Luca et al. demonstrated that MSC-EV miRNAs and piRNAs influence CD34⁺ cells gene profile, inducing cell survival and proliferation in all the hematopoietic lineages [26].

We have also shown that MSC-EV carry bioactive molecules and can transfer mRNA and proteins to the target cells [23, 34]. The bioactive cargo enclosed in MSC-EV may play a role in favoring hematopoietic engraftment. In fact, we have shown that the expression of CD44, a well-known factor involved in cell adhesion and migration, is increased after the incorporation of MSC-EV into CD34⁺ cells. These results are consistent with findings that MSC-EV carry mRNA for CD44 [52], we also have confirmed that MSC-EV express CD44 protein on their surface. The effects may not involve CXCR4, another important factor for homing and engraftment, as we have not observed changes in its expression after the incorporation of MSC-EV, although some groups have described an increase in its expression [26]. This discordance may be related to different experimental conditions (e.g., the latter results were obtained in cord-blood CD34⁺ cells, whereas our *in vitro* experiments were performed with G-CSF mobilized adult CD34⁺ cells). In this regard, we performed some of the experiments with cord blood cells (Supporting Information Fig. S2), and with cord blood cells, the increase in CXCR4 expression after MSC-EV incorporation is significantly increased. In addition, the fact that we have observed that CD34⁺ cells gain SDF-1 expression after the incorporation of MSC-EV warrants a specific comment. The importance of the SDF-1/CXCR4 axis in CD34⁺ cells homing and engraftment is unquestionable but is generally considered only in the most important direction, which is the interaction between SDF-1 expressed in MSC and CXCR4 expressed in CD34⁺ cells. However, MSC can also express low levels of CXCR4

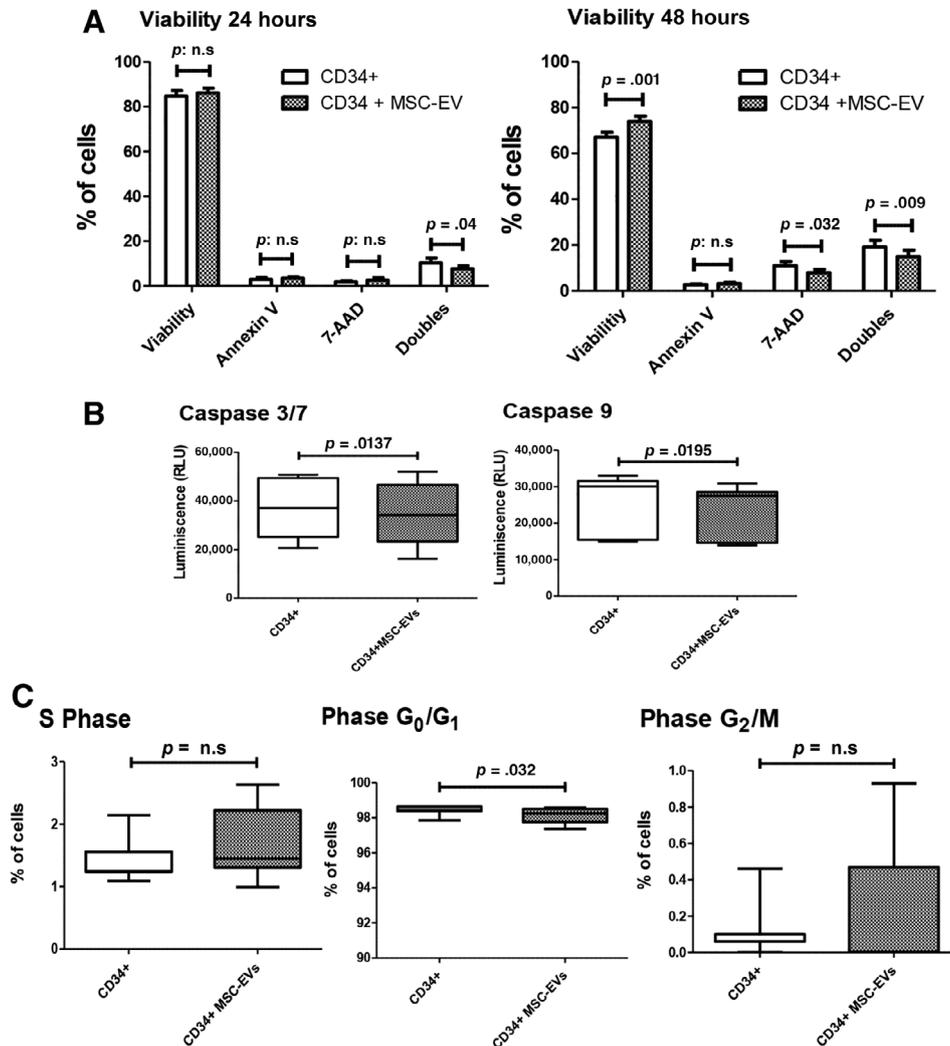


Figure 4. Viability, caspase activity, and proliferation of CD34⁺ cells. Apoptosis assays in CD34⁺ cells alone or CD34⁺ cells that have incorporated MSC-EV after 24 and 48 hours of culture. CD34⁺ cells were incubated with Annexin V, 7-AAD, and CD34, and the expression of different cell surface markers was analyzed by flow cytometry. Cells were considered to be viable (Annexin V⁻/7-AAD⁻), in an early apoptotic state (Annexin V⁺/7-AAD⁻), late apoptosis (Annexin V⁺/7-AAD⁺), or dead (Annexin V⁻/7-AAD⁺). **(A):** Data expressed as mean of the percentage of cells in the different conditions, caspase activity assays in CD34⁺ cells alone or CD34⁺ cells that have incorporated MSC-EV after 24 hours of culture. **(B):** Luminescence is expressed as the number of relRLU. Cell cycle profiling of CD34⁺ cells after 24 hours of incubation with MSC-EV analyzed by flow cytometry. **(C):** Data are represented as mean of the percentage of cells in each phase. Ten experiments were done for each group. Abbreviations: 7-AAD, 7-amino-actinomycin; EV, extracellular vesicles; MSC, mesenchymal stromal cells; RLU, relative light unit.

[53–55], so the fact that CD34⁺ cells express SDF-1 could also potentially favors the interaction between SDF-1 and CXCR4, enhancing the engraftment ability of CD34⁺ cells. We have also found an increased expression of PTGS1, precursor of PGE₂ after the incorporation of MSC-EV. PGE₂ enhances CD34⁺ cells homing, survival, and proliferation [56].

Besides these changes in gene and protein expression after the incorporation of MSC-EV into CD34⁺ cells, the most important questions are related to the potential functional implications of these changes. As it has been mentioned, we have addressed them both in vitro and in vivo. Interestingly, the in vitro clonogenic assays revealed a significant increase in colony formation after MSC-EV incorporation. This is again in agreement with the upregulation of some molecules involved in hematopoiesis as IL11, CD22, and IL3RA that were shown

in the GEP analysis. Other reports support these findings showing higher colony outgrowth after treatment of CD34⁺ cells with MSC-EV [25, 45, 47].

The latest and most relevant test was to evaluate whether MSC-EV could improve in vivo engraftment of CD34⁺ cells. For this experiments, we used cord blood CD34⁺ cells, as their engraftment capacity is higher, in order to reduce the number of cells and vesicles needed for each experiment [57] but maintaining the proportion of MSC-EV/ CD34⁺ cells we have previously used in all the in vitro experiments. We have observed a significant better BM lodging ability in the injected femurs after 4 weeks in mice with human CD34⁺ cells that had incorporated human MSC-EV in comparison with the lodging of control CD34⁺ cells. In accordance with our results, De Luca et al. analyzed the homing into the BM of intravenously

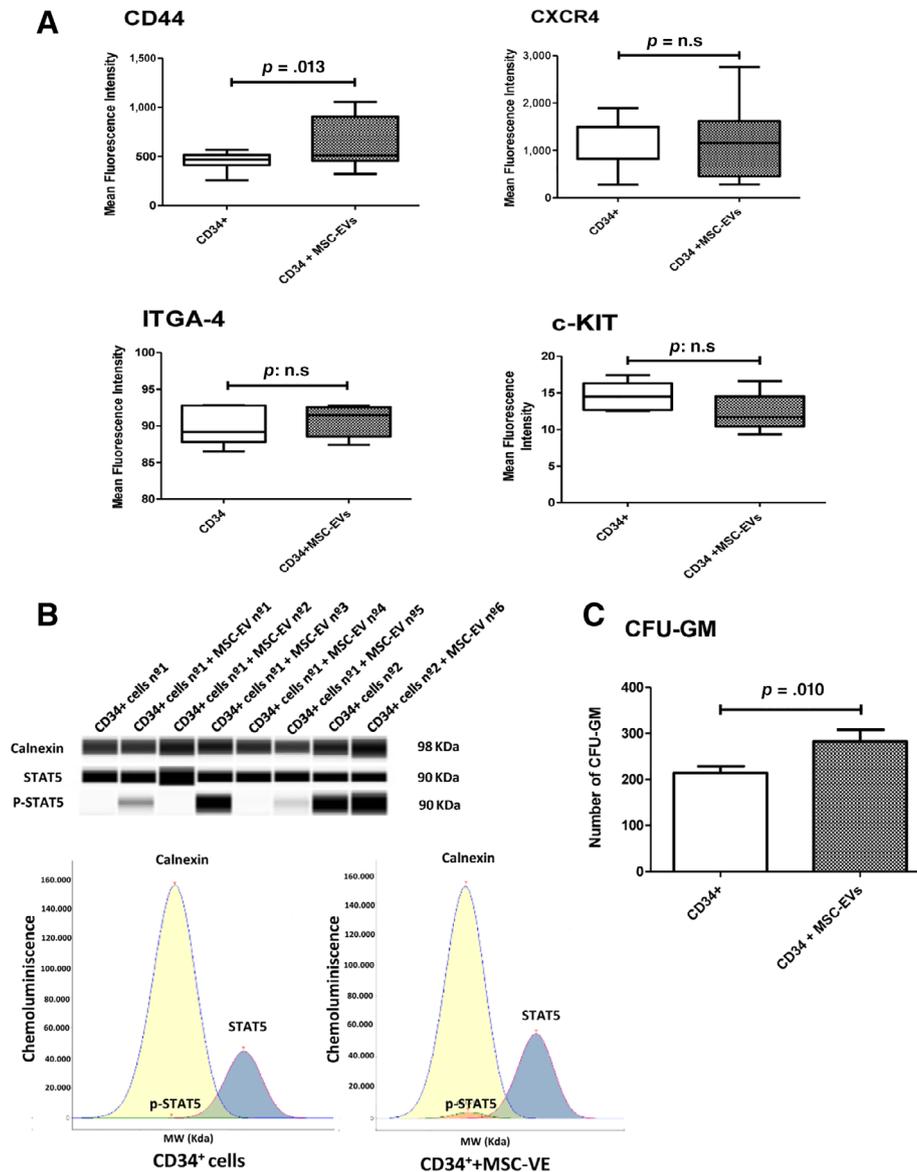


Figure 5. Expression of proteins involved in hematopoiesis on CD34⁺ cells and their capacity of colony formation. Mean fluorescence intensity of different proteins involved in hematopoiesis maintenance as CD44, CXCR4, ITGA-4, and c-KIT was evaluated by FACS analysis. **(A)**: Samples were acquired on a FACS Calibur flow cytometer. **(B)**: Results from Calnexin, STAT5, and phospho-STAT5 quantification in CD34⁺ cells, visualized as virtual blots (up) or peaks (only one representative sample of CD34⁺ cells and other representative sample of CD34⁺ cells that have incorporated MSC-EV) (down), analyzed by WES Simple technology using Compass software. Total CFU-GM from CD34⁺ cells were scored after 14 days in methylcellulose medium. **(C)**: CD34⁺ cells were cultured with or without EV for 24 hours and then, 1,500 cells were seeded into methylcellulose medium. Data are represented as mean of 10 experiments for each group. Abbreviations: CFU-GM, colony-forming unit granulocyte/macrophage; EV, extracellular vesicles; MSC, mesenchymal stromal cells.

(instead of intravenously) administered human CD34⁺ cells with incorporated vesicles only 24 hours after the injection [26], but human engraftment at later time points was not studied in their work. Other authors have found potential beneficial effects of either murine or human MSC-EV in different results with different experimental designs different from our approach. In this regard, Wen et al. showed that murine or human MSC-EV improves the engraftment of murine CD34⁺ cells damaged by irradiation [47], and Schoefinius et al. found that the injection of MSC-EV rescues hematopoiesis in irradiated mice without the addition of CD34⁺ cells [25]. We have not found differences in the percentage of human cells neither in the contralateral femur nor in the spleen of these mice.

Regarding these results, several groups have described that intrabone transplantation results in higher human cell engraftment or chimerism in the injected femurs, whereas engraftment at distal hematopoietic sites as the peripheral blood, spleen, and contralateral femur could be lower. Some studies suggest that the retention of human cells in the BM after intrabone injection enhances local chimerism at expense of systemic chimerism [58,59]. Furthermore, prior published studies from our own group also showed higher engraftment in the injected femur when compared with the contralateral femur [9]. It could be hypothesized that MSC-EV incorporation into CD34⁺ cells may only improve lodging and retention in the injected femur but not in the homing ability or that the

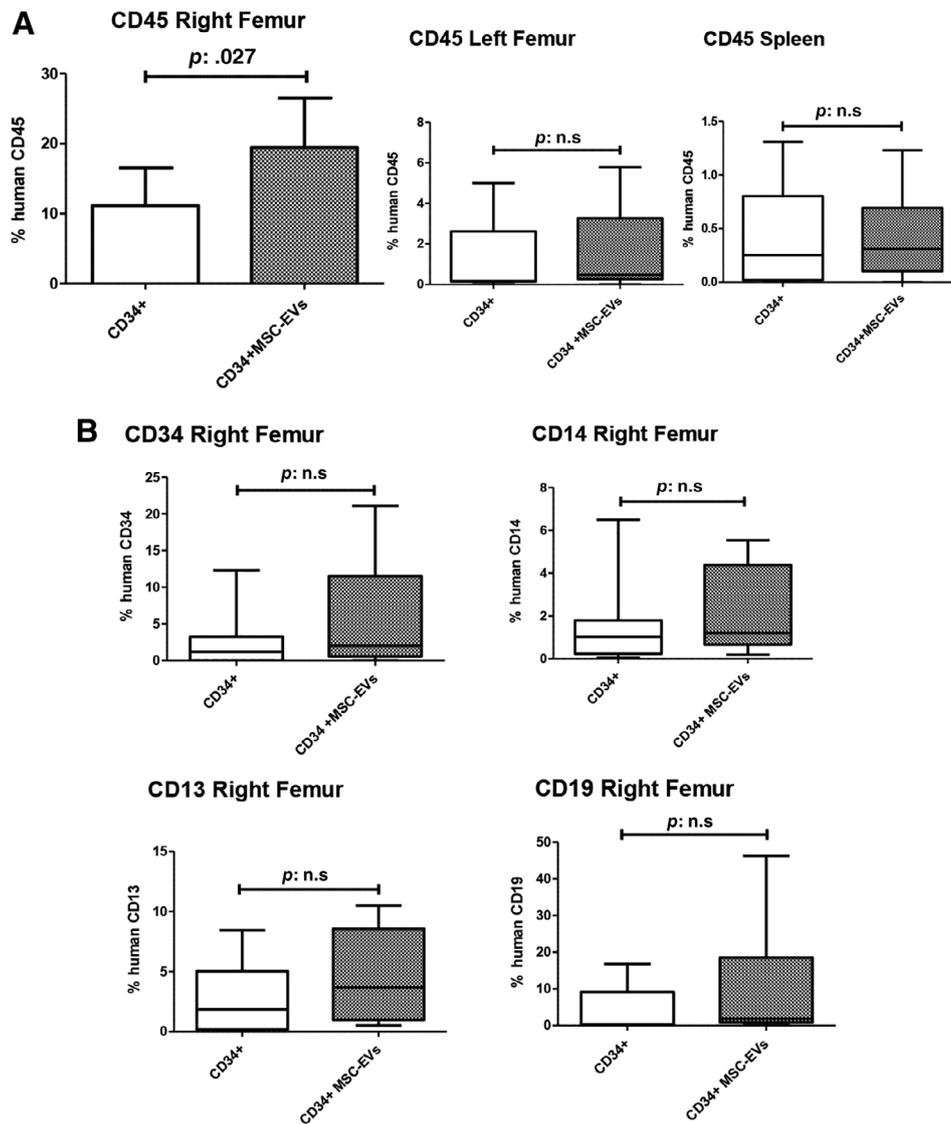


Figure 6. Analysis of human hematopoietic lodging in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. The percentage of human CD45⁺ cells (donor chimerism) in total bone marrow samples from both the femurs, right (injected site) (A) and left (contralateral) (B), and spleen (C) at 4 weeks after hematopoietic transplantation was analyzed by flow cytometry. Percentage of human hematopoietic subpopulations (CD34, CD14, CD13, and CD19) in right femur bone marrow at week 4 (D). Data are represented as mean of 10 experiments for each group. Abbreviations: EV, extracellular vesicles; MSC, mesenchymal stromal cells.

increase in engraftment in the injected femur is not enough to compensate that of other distal BM niches.

CONCLUSION

In this study, we have demonstrated that human MSC-EV are able to incorporate into human CD34⁺ cells, modifying their gene expression and increasing their viability, clonogenic capacity in vitro, and their 4-week BM lodging ability in vivo in the injected femurs in a xenotransplantation model.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III (Grants PI12/01775 and PI16/01407), Consejería de Educación (Grants HUS308U14 and

CAS079P17), and Consejería de Sanidad de Castilla y León (Grants GRS1348/A/19 and GRS1621/A/17), Junta de Castilla y León. S.P. is supported by Santander-USAL grant, N.E.-L. is supported by FEHH, L.O. is supported by Consejería de Educación, JCYL, A.R. is supported by IBSAL, and S.M. is supported by ISCIII.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.d.C.: conception/design, data interpretation, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; F.S.-G.: conception/design, data interpretation, manuscript writing, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; S.P.: collection and/or assembly of data, sample preparation, most experiments and statistical analysis, murine experiments, manuscript writing, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; S.M.:

collection and/or assembly of data, performed sample preparation, most experiments and statistical analysis, manuscript writing, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; L.O. and T.L.R.: performed and analyzed flow cytometry studies, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; L.A.C.: performed overall bioinformatics analysis, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; M.D.-C.: provision of study patients, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; A.R.: collaborate with confocal microscopy experiments, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; N.E.-L.: help with

reverse transcription polymerase chain reaction studies, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; A.G.d.I.T.: performed experiments with mice, reviewed the manuscript, final approval of manuscript; I.G.: provision of cord blood samples, reviewed the manuscript, final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: The state of the art. *Expert Rev Hematol* 2010;3:285–299.
- Roncarolo MG, Gregori S, Lucarelli B et al. Clinical tolerance in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Rev* 2011;241:145–163.
- Szyska M, Na IK. Bone marrow GvHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol* 2016;7:118.
- Rieger K, Marinets O, Fietz T et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 2005;33:605–611.
- Wang Y, Zhu G, Wang J et al. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Res* 2016;13:213–223.
- Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:881–887.
- Fernandez-Garcia M, Yanez RM, Sanchez-Dominguez R et al. Mesenchymal stromal cells enhance the engraftment of hematopoietic stem cells in an autologous mouse transplantation model. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:165.
- Carrancio S, Blanco B, Romo C et al. Bone marrow mesenchymal stem cells for improving hematopoietic function: An in vitro and in vivo model. Part 2: Effect on bone marrow microenvironment. *PLoS One* 2011;6:e26241.
- Carrancio S, Romo C, Ramos T et al. Effects of MSC coadministration and route of delivery on cord blood hematopoietic stem cell engraftment. *Cell Transplant* 2013;22:1171–1183.
- Hiwase SD, Dyson PG, To LB et al. Cotransplantation of placental mesenchymal stromal cells enhances single and double cord blood engraftment in nonobese diabetic/severe combined immune deficient mice. *STEM CELLS* 2009;27:2293–2300.
- Yang X, Balakrishnan I, Torok-Storb B et al. Marrow stromal cell infusion rescues hematopoiesis in lethally irradiated mice despite rapid clearance after infusion. *Adv Hematol* 2012;2012:142530.
- Angelopoulou M, Novelli E, Grove JE et al. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2003;31:413–420.
- Mohammadali F, Abroun S, Atashi A. Mild hypoxia and human bone marrow mesenchymal stem cells synergistically enhance expansion and homing capacity of human cord blood CD34+ stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2018;21:709–716.
- Sanchez-Guijo FM, Lopez-Villar O, Lopez-Anglada L et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for refractory cytopenias after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion* 2012;52:1086–1091.
- De Luca L, Trino S, Laurenzana I et al. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles: A role in hematopoietic transplantation? *Int J Mol Sci* 2017;18:E1022.
- Harting MT, Srivastava AK, Zhaorigetu S et al. Inflammation-stimulated mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate inflammation. *STEM CELLS* 2018;36:79–90.
- Mao F, Tu Q, Wang L et al. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget* 2017;8:38008–38021.
- Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell* 2016;164:1226–1232.
- Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO et al. Extracellular vesicles: Composition, biological relevance, and methods of study. *BioScience* 2015;65:783–797.
- Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* 2013;27:31–39.
- Collino F, Deregibus MC, Bruno S et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 2010;5:e11803.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200:373–383.
- Muntion S, Ramos TL, Diez-Campelo M et al. Microvesicles from mesenchymal stromal cells are involved in HPC-microenvironment crosstalk in myelodysplastic patients. *PLoS One* 2016;11:e0146722.
- Gatti S, Bruno S, Deregibus MC et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1474–1483.
- Schoefinius JS, Brunswig-Spickenheier B, Speiseder T et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles provide long-term survival after total body irradiation without additional hematopoietic stem cell support. *STEM CELLS* 2017;35:2379–2389.
- De Luca L, Trino S, Laurenzana I et al. MiRNAs and piRNAs from bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles induce cell survival and inhibit cell differentiation of cord blood hematopoietic stem cells: A new insight in transplantation. *Oncotarget* 2016;7:6676–6692.
- Preciado S, Muntion S, Rico A et al. Mesenchymal stromal cell irradiation interferes with the adipogenic/osteogenic differentiation balance and improves their hematopoietic-supporting ability. *Biol Blood Marrow Transplant* 2018;24:443–451.
- Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 2008;36:1014–1021.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.
- Ramirez M, Regidor C, Marugan I et al. Engraftment kinetics of human CD34+ cells from cord blood and mobilized peripheral blood co-transplanted into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:271–275.
- Thery C, Amigorena S, Raposo G et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;3.22.1–3.22.29; Chapter 3(Unit 3.22).
- van der Pol E, Coumans FA, Grootemaat AE et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* 2014;12:1182–1192.
- T LR, Sanchez-Abarca LI, Muntion S et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal* 2016;14:1.
- Ramos TL, Sanchez-Abarca LI, Lopez-Ruano G et al. Do endothelial cells belong to the primitive stem leukemic clone in CML? Role of extracellular vesicles. *Leuk Res* 2015;39:921–924.
- Wang J, Vasaikar S, Shi Z et al. WebGestalt 2017: A more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res* 2017;45:W130–W137.
- Misiewicz-Krzeminska I, Corchete IA, Rojas EA et al. A novel nano-immunoassay method for quantification of proteins from CD138-purified myeloma cells: Biological and clinical utility. *Haematologica* 2018;103:880–889.

- 37** Verlinden SF, van Es HH, van Bekkum DW. Serial bone marrow sampling for long-term follow up of human hematopoiesis in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 1998;26:627–630.
- 38** Lotvall J, Hill AF, Hochberg F et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracellular Vesicles* 2014;3:26913.
- 39** Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007;110:2764–2767.
- 40** Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett* 2015;168:215–221.
- 41** Goto T, Murata M, Terakura S et al. Phase I study of cord blood transplantation with intrabone marrow injection of mesenchymal stem cells: A clinical study protocol. *Medicine* 2018;97:e0449.
- 42** Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21:1733–1738.
- 43** Zhang Y, Chopp M, Meng Y et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2015;122:856–867.
- 44** Lai RC, Arslan F, Lee MM et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010;4:214–222.
- 45** Xie H, Sun L, Zhang L et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles support ex vivo expansion of cord blood-derived CD34(+) cells. *Stem Cells Int* 2016;2016:6493241.
- 46** Timari H, Shamsasenjan K, Movassaghpour A et al. The effect of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles on hematopoietic stem cells fate. *Adv Pharmaceut Bull* 2017;7:531–546.
- 47** Wen S, Dooner M, Cheng Y et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia* 2016;30:2221–2231.
- 48** Zhao R, Xing S, Li Z et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005;280:22788–22792.
- 49** Pearson S, Williamson AJK, Blance R et al. Proteomic analysis of JAK2V617F-induced changes identifies potential new combinatorial therapeutic approaches. *Leukemia* 2017;31:2717–2725.
- 50** Cook AM, Li L, Ho Y et al. Role of altered growth factor receptor-mediated JAK2 signaling in growth and maintenance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2014;123:2826–2837.
- 51** Murone M, Radpour R, Attinger A et al. The multi-kinase inhibitor Debio 0617B reduces maintenance and self-renewal of primary human AML CD34(+) stem/progenitor cells. *Mol Cancer Ther* 2017;16:1497–1510.
- 52** Arasu UT, Karna R, Harkonen K et al. Human mesenchymal stem cells secrete hyaluronan-coated extracellular vesicles. *Matrix Biol* 2017;64:54–68.
- 53** Jin W, Liang X, Brooks A et al. Modelling of the SDF-1/CXCR4 regulated in vivo homing of therapeutic mesenchymal stem/stromal cells in mice. *PeerJ* 2018;6:e6072.
- 54** Ji JF, He BP, Dheen ST et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *STEM CELLS* 2004;22:415–427.
- 55** Jeltsch KS, Radke TF, Laufs S et al. Unrestricted somatic stem cells: Interaction with CD34+ cells in vitro and in vivo, expression of homing genes and exclusion of tumorigenic potential. *Cytotherapy* 2011;13:357–365.
- 56** Hoggatt J, Singh P, Sampath J et al. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* 2009;113:5444–5455.
- 57** Matsumura T, Kametani Y, Ando K et al. Functional CD5+ B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gammac (null) (NOG) mice transplanted either with human umbilical cord blood, bone marrow, or mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 2003;31:789–797.
- 58** Futrega K, Lott WB, Doran MR. Direct bone marrow HSC transplantation enhances local engraftment at the expense of systemic engraftment in NSG mice. *Sci Rep* 2016;6:1–17.
- 59** Yahata T, Ando K, Sato T et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood* 2003;101:2905–2913.



See www.StemCells.com for supporting information available online.