

## 2. Células madre hematopoyéticas

JORDI BARQUINERO MÁÑEZ

### RESUMEN

Las células madre hematopoyéticas (CMH) son, con diferencia, las mejor conocidas de las células madre adultas. Se definen como aquellas capaces de repoblar a largo plazo todos los linajes hematopoyéticos cuando son trasplantadas a receptores sometidos a un tratamiento mioablativo que permita su injerto. En humanos adultos, las CMH se encuentran fundamentalmente en la médula ósea (MO), con una frecuencia relativa de 1 entre  $10^4$  a 1 entre  $10^5$  células nucleadas. Aunque quedan muchas lagunas por conocer, y de hecho aún no es posible su identificación ni su aislamiento de forma prospectiva con una certeza o pureza absoluta, los últimos años han sido pródigos en avances relativos a su caracterización y aplicaciones clínicas.

En cuanto a sus aplicaciones, las CMH fueron las primeras en ser trasplantadas con éxito hace más de medio siglo. Inicialmente sólo podían obtenerse a partir de la MO, pero actualmente se obtienen mediante un proceso mucho menos traumático llamado aféresis, tras ser movilizadas a la sangre periférica o, más recientemente, a partir de la sangre del cordón umbilical. Los trasplantes hematopoyéticos han salvado miles de vidas de pacientes con hemopatías malignas y enfermedades hereditarias. Otra potencial aplicación de las CMH es la inducción de tolerancia inmunológica. Finalmente, las CMH constituyen una diana excepcional para la terapia génica (TG), y no es casualidad que los dos primeros éxitos de esta joven disciplina estén basados en CMH.

## ABSTRACT

Hematopoietic stem cells (HSC) are by far the best known among adult stem cells. They are defined by their ability to repopulate all hematopoietic lineages long-term upon transplantation into myeloablated hosts. In human adults, HSC are primarily found in the bone marrow at a relative frequency of 1 in  $10^4$  to 1 in  $10^5$  nucleated cells. Although many gaps remain and their prospective identification and isolation in pure form are still not possible, considerable progress has been made in the recent years both in their characterization and in their clinical applications.

Regarding their applications, HSC were the first stem cells to be successfully transplanted, more than 50 years ago. Initially they could only be obtained from the bone marrow, but now they can be harvested using a much less painful procedure called apheresis, upon mobilization of the progenitor cells into the peripheral blood or, more recently, from umbilical cord blood. Hematopoietic transplants have saved thousands of patients with hematological malignancies and with genetic diseases. Another potential application of HSC is the induction of immune tolerance. Finally, HSC constitute a preferred target for gene therapy, and it is not by chance that the first two successful clinical trials reported so far were based on HSC.

## INTRODUCCIÓN

El creciente éxito del trasplante hematopoyético ha constituido durante más de medio siglo el paradigma de la existencia de células madre adultas. Hasta hace poco más de una década, hablar de células madre no embrionarias era referirse casi inequívocamente a la MO o a las CMH, ya que fueron éstas las primeras en conocerse y en ser aplicadas al tratamiento de enfermedades humanas. Al ser el hematopoyético un tejido líquido trasplantable que se puede cultivar y manipular *ex vivo*, las CMH se han convertido en una herramienta insustituible para un sinfín de terapias celulares y aplicaciones en medicina regenerativa, así como en una diana preferida para la TG.

La hematopoyesis (palabra que literalmente significa fabricación o producción de sangre, y que indirectamente lleva implícita la noción de

células madre) es un proceso que garantiza una producción continua de células sanguíneas que permita mantener unas concentraciones de éstas dentro de unos rangos o niveles normales, a lo largo de toda la vida de un individuo. La hematopoyesis humana tiene una organización jerárquica, que está esquematizada en la figura 1. La tabla 1 da una idea de las ingentes cantidades de células que se deben estar produciendo cada día para mantener esta homeostasis. Es una obviedad que las células sanguíneas se están produciendo (en la MO) a la misma velocidad que se destruyen (principalmente en el bazo). Si tenemos en cuenta que en su inmensa mayoría las CMH son quiescentes, se hace evidente que todas estas células maduras que cada día acceden a la circulación san-

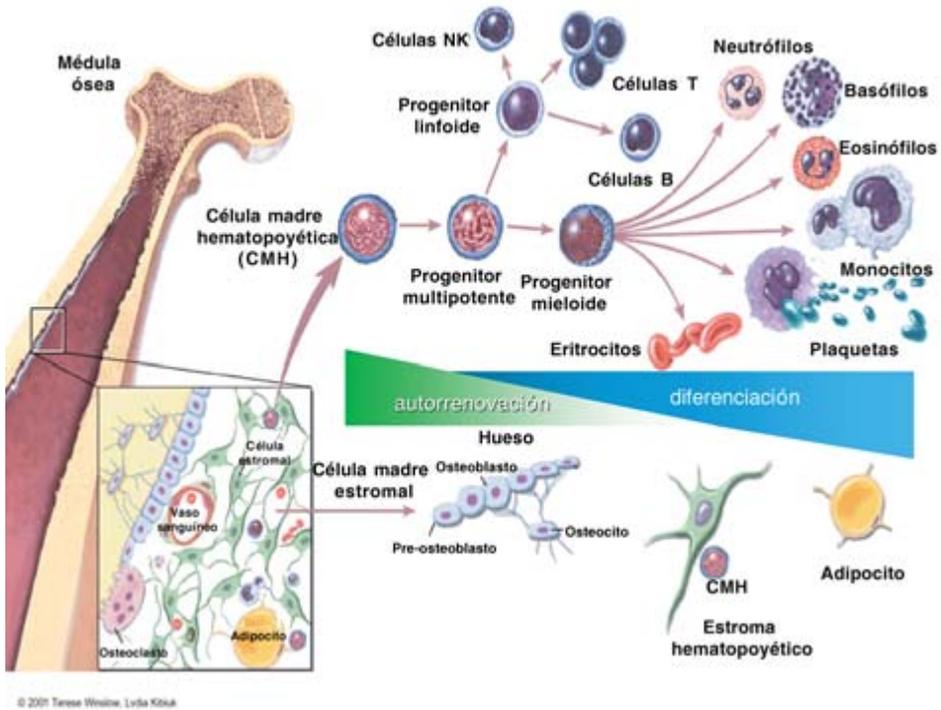


FIGURA 1. Esquema simplificado de la hematopoyesis. Una rara población de CMH genera de manera continua y regulada una progenie de células maduras, que pasan a la circulación sanguínea. La multipotencialidad se va perdiendo a medida que las células se van diferenciando en los distintos linajes. La MO también alberga otros tipos de progenitores, como los mesenquimales y los endoteliales. (Tomado de <http://stemcells.nih.gov>, modificado por la Dra. H. Eixarch).

TABLA 1

<i>Tipo celular</i> <i>Tipo celular</i>	<i>Vida media</i> <i>Vida media</i>	<i>Valores normales</i> <i>normales (por</i> <i>μL de sangre)</i>	<i>Cantidad total</i> <i>(en L de</i> <i>sangre)</i>	<i>Producción</i> <i>diaria</i>
Hemáties	120 días	4.5 x 10 <sup>6</sup>	22.5 x 10 <sup>12</sup>	1,8 x 10 <sup>11</sup>
Granulocitos	8-10 horas	7.5 x 10 <sup>3</sup>	37,5 x 10 <sup>9</sup>	9 x 10 <sup>10</sup>
Plaquetas	7-10 días	3 x 10 <sup>5</sup>	15 x 10 <sup>11</sup>	2,1 x 10 <sup>11</sup>

*Valores normales de los principales tipos de células sanguíneas y estimación de la producción diaria de éstas. Las cifras son aproximadas y están calculadas a partir de las medias para un adulto humano varón de 70 Kg de peso (5 L de sangre), y no se tiene en cuenta la producción de otros tipos celulares (monocitos o linfocitos), más minoritarios. Sólo la producción de los tres tipos celulares indicados supone generar aproximadamente 5 x 10<sup>11</sup> células cada día. Tampoco se tiene en cuenta posibles situaciones patológicas o de estrés, en las que esta producción basal puede estar muy aumentada.*

guínea proceden de unas pocas CMH. Si se tiene en cuenta que un ratón normal tiene unas 5000 CMH, y que cuando se analiza un preparación en fresco sólo un 1-3% de éstas se encuentran en una fase activa del ciclo celular (aunque se van alternado de manera continua), se puede comprobar que la hematopoyesis es un proceso que se produce de una forma relativamente oligoclonal.

Por otra parte, esta producción ha de estar muy finamente regulada, pues las necesidades de cada tipo celular pueden ir variando a cada momento; por ejemplo, tras una hemorragia aguda o durante un cuadro séptico. Esta regulación depende de factores exógenos, que incluyen mediadores solubles (factores de crecimiento hematopoyético, citocinas, factores inhibidores, etc), que serían liberados de forma endocrina o paracrina, o contactos directos célula-célula que tendrían lugar en el nicho hematopoyético, así como de sustancias neuroendocrinas liberadas por las terminaciones nerviosas que inervan la MO, y también de factores intrínsecos de las propias CMH, como la mayor o menor expresión de determinados factores de transcripción (PU-1, GATA-1, GATA-2 o SCL/TAL-1) o de modificaciones epigenéticas (1).

Aunque muchos libros de texto definen las CMH como pluripotenciales, en realidad, estrictamente hablando son multipotenciales, pues por el momento no se ha descrito que puedan generar cualquier tipo celular del organismo, sólo los de los distintos linajes hematopoyéticos, y quizás algún otro no hematopoyético, pero no todos.

Se ha descrito que muchas poblaciones de células madre en general, y de CMH en particular son altamente heterogéneas (2), lo que tendría un papel en hacerlas más o menos receptivas a influencias externas o del microambiente y ayudaría a explicar que, en un momento dado, sólo algunas de ellas respondan a determinados estímulos. Las principales vías de señalización que regulan la toma de decisiones celulares en relación a la diferenciación o la autorrenovación son las de Notch, Wnt y Hedhehog, entre otras. La proteína Bmi-1, codificada por un oncogén de la familia *polycomb*, también ha demostrado jugar un papel esencial en la autorenovación de las CMH (3).

Recientemente también se ha demostrado la existencia de CMH con distintos patrones de repoblación *in vivo*. Estos patrones se mantendrían en la progenie de cada una de estas CMH, pero pueden ser modificados por factores externos (4). Un aspecto que debe estar finamente regulado es el mantenimiento de un número relativamente constante de CMH a lo largo de la vida. Hay evidencias que, en el ratón, este número está determinado genéticamente. De acuerdo con el conocimiento actual, las CMH experimentarían divisiones asimétricas, de manera que una de las células hijas conservaría la multipotencialidad, mientras que la otra entraría en procesos de diferenciación/amplificación, con lo que se tendería a mantener constante el número de CMH. En relación a este hecho, una característica que define las CMH es su capacidad autorregenerativa que debe mantenerse durante toda la vida del individuo. Así, se ha comprobado que las CMH expresan telomerasa, si bien la reposición de los telómeros con cada división celular no es del todo completa, por lo que con los años los telómeros de sus cromosomas se van acortando (5).

Durante el desarrollo embrionario humano la primeras CMH aparecen en el saco vitelino hacia las 2 semanas de vida, aunque las primeras que tienen capacidad de repoblación se originan en el interior del propio embrión, primero en la esplacnopleura paraaórtica y posteriormente en la región aorta-gonadal-mesonefros (AGM). A partir de la sexta semana el principal órgano hematopoyético es el hígado, y lo seguirá siendo hasta poco antes del parto, produciéndose la migración de las CMH hacia la MO (y ello explica que la sangre del cordón umbilical durante el periodo perinatal contenga progenitores hematopoyéticos), que será el lugar que albergará la hematopoyesis adulta definitiva.

Un tema muy controvertido es la plasticidad de las CMH, es decir, si éstas pueden transdiferenciarse a células maduras de otros linajes no hematopoyéticos. En los últimos diez años diversos estudios han descrito aparente transdiferenciación a diversos tejidos (músculo, hígado, miocardio, o sistema nervioso). Sin embargo, otros investigadores han puesto en duda el rigor de dichos estudios, y han demostrado que en algunos casos lo que se produce es fusión de células hematopoyéticas con células de otras estirpes, y no verdadera transdiferenciación. Lo que es seguro es que la transdiferenciación, si ocurre, no lo hace con una frecuencia elevada, al menos en circunstancias normales. Dado que ya existen otros capítulos en este monográfico que profundizan en esta cuestión, dejaremos este tema abierto.

## ALGUNOS APUNTES HISTÓRICOS SOBRE LAS CMH

La primera evidencia de la existencia de progenitores hematopoyéticos de vida media larga fue desvelada hace ya más de 60 años. En 1945, R.D. Owen observó que, en el ganado bovino, los hermanos no idénticos de una misma camada que habían compartido la misma placenta eran en realidad quimeras que compartían ambos tipos de células sanguíneas (las suyas y las de su hermano) de por vida. A partir de ello dedujo correctamente que debían existir células ancestrales a los hematíes de los animales adultos. Por pura casualidad, el siguiente avance en este terreno también derivó de otra observación en el ganado bovino. Billingham y Medawar practicaban injertos cutáneos entre hermanos idénticos y no idénticos, y se sorprendieron al comprobar que en la mayoría de casos éstos no eran rechazados. En su búsqueda de una explicación satisfactoria se encontraron con los estudios de Owen y demostraron, en una elegante serie de experimentos en el modelo murino, que la creación de quimerismos hematopoyéticos mixtos en ratones neonatos inducía tolerancia específica frente a las células del donante (6), resultados que se publicaron en 1953 y que le valieron a Peter Medawar el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1960.

Desafortunadamente, otras evidencias procedían de las víctimas de explosiones atómicas, como los habitantes de Hiroshima y Nagasaki en 1945. Si bien en un primer momento no se comprendió demasiado bien,

mirado retrospectivamente, las personas que fallecieron tras la exposición a una mínima dosis letal lo hicieron debido a una aplasia medular, transcurridos varios días desde la exposición, ya que la normal renovación de las células sanguíneas (principalmente leucocitos y plaquetas) había quedado interrumpida. Sin embargo, en experimentos realizados en ratones irradiados se observó que si se protegía el bazo con una pantalla de plomo se evitaba el síndrome hematológico (7), y también que podían rescatarse animales sometidos a una dosis letal de radiación infundiéndoles células del bazo o de la MO de un ratón no irradiado (8), hallazgos que sentaban las bases de los trasplantes hematopoyéticos, que desde los años 70-80 del pasado siglo se realizan de manera rutinaria en muchos de nuestros hospitales.

Con todas estas evidencias indirectas, a partir de los años 60 se inició la búsqueda prospectiva de las CMH. Se había observado que los progenitores de la MO podían formar colonias en el bazo de ratones sometidos a irradiación letal, de ahí su nombre CFU-S (*Colony Forming Unit-Spleen*). Till y McCulloch demostraron que las CFU-S eran en realidad clonales, es decir, que procedían de una única célula. También se producían colonias (CFU) de tamaños y morfologías diversas si los progenitores hematopoyéticos se cultivaban *in vitro* en determinados medios semi-sólidos (agar, metilcelulosa). Cada uno de estos tipos de CFU se llegó a identificar con un tipo de progenitor, más o menos inmaduro. Así, se describieron las CFU-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos), las CFU-E (unidades formadoras de colonias de eritrocitos), las CFU-Meg (unidades formadoras de colonias de megacariocitos) o las CFU-Mix (unidades formadoras de colonias mixtas), entre otras. Las colonias hematopoyéticas constituían otra demostración de la existencia de una jerarquía de progenitores con diferentes potencialidades, y de la naturaleza clonal de la hematopoyesis. Estos ensayos clonogénicos todavía se usan en investigación o para evaluar indirectamente la calidad de un producto celular (por ejemplo, una muestra de sangre de cordón umbilical, o de MO congelada) pero, aunque proporcionan una información funcional, actualmente no se consideran indicadores del contenido en CMH, sino de progenitores más o menos diferenciados. Otros ensayos clonogénicos que permitían analizar progenitores más inmaduros que las CFU son el LTC-IC (*long-term culture initiating cell*) (9) y los CAFC (*cobblestone area forming cell*) (10), o células formadoras de áreas

en empedrado, por la disposición que adoptan las células de la colonia, que recuerda a la de los adoquines de las calles antiguas. En ambos ensayos se emplean cultivos a largo plazo, y requieren un soporte estromal. Con todo, ningún ensayo *in vitro* permite por el momento evaluar rigurosamente la funcionalidad de las CMH, los únicos que lo hacen son los que atienden a la propia definición de estas células, es decir, que demuestran su capacidad de repoblación *in vivo* y de diferenciación hacia los principales linajes hematopoyéticos, y a largo plazo (un mínimo de 4 meses en el ratón y varios años en un humano). Por otra parte, los ensayos de repoblación *in vivo* también tienen sus limitaciones, pues una vez se documenta que se ha producido repoblación, las CMH que la originaron ya han desaparecido. Además, en los ensayos de repoblación *in vivo* hay que tener en cuenta que las células que se trasplantan tienen que llegar a alcanzar los tejidos hematopoyéticos y anidar (o hacer *homing*) en los nichos adecuados, un factor que puede ser crítico cuando se trasplantan números muy reducidos de células (hay estudios en los que se trasplanta una sola célula). Una solución a estos problemas son los ensayos de repoblación competitiva, en que una población de células «problema» es trasplantada simultáneamente con otra población «control», de manera que unas puedan ser cuantificadas y diferenciadas de las otras en las muestras de tejidos hematopoyéticos de los animales receptores mediante algún marcador fenotípico. Así, se han definido las unidades de repoblación competitiva (o CRU), que equivaldría a una única célula que es capaz de producir linaje mieloide y linfoide a largo plazo cuando es trasplantada a un animal irradiado letalmente. En el caso de las CMH humanas, ante las dificultades para utilizar personas como herramienta experimental, se han desarrollado modelos de trasplante de células hematopoyéticas humanas en diversas cepas de ratones inmunodeficientes, como los NOD/scid u otros, en los que se pueden realizar estudios cuantitativos (11). Así, se ha llegado a definir la unidad de repoblación en ratones NOD/scid (o SRC) (11). Con todo, estas exigencias de los ensayos de repoblación *in vivo* imponen enormes restricciones y dificultades para el estudio de las CMH, y ello ha impulsado la búsqueda de métodos alternativos que permitan identificar CMH de una manera prospectiva. En este sentido, aunque por el momento no existe ninguna técnica que permita identificar CMH de forma inequívoca y apriorística, se han producido avances muy notables en este terreno, de manera que, utilizando distintos marcadores fenotípicos, en humanos se pueden conseguir po-

blaciones celulares que enriquecen la capacidad de repoblación en varios órdenes de magnitud, mientras que, en el ratón se pueden llegar a obtener poblaciones prácticamente puras de CMH, así como de la mayoría de los distintos tipos de progenitores hematopoyéticos más diferenciados.

En la MO, las CMH se localizan en unas zonas llamadas nichos, que juegan un importantísimo papel en su regulación. Estos nichos hematopoyéticos están divididos en tres partes: 1) una zona osteoblástica (cerca a los osteoblastos), 2) una zona medular de CMH quiescentes y proliferativas y, 3) una zona vascular (cerca de los sinusoides) que permite que salgan las células maduras a la circulación (12).

## HACIA UNA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CMH

Tras los primeros intentos de enriquecimiento basados en el tamaño y la densidad celular, la aparición de anticuerpos policlonales o monoclonales frente a distintos marcadores inmunofenotípicos, acoplados a nuevos y mejores fluorocromos y los avances en la citometría de flujo, que permiten análisis multiparamétricos a tiempo real y la separación de poblaciones celulares con fenotipos cada vez más complejos, han revolucionado el conocimiento sobre la hematopoyesis.

En 1984, Kurt Civin descubrió el antígeno My10 en la línea leucémica humana KG-1a. El marcador, que posteriormente se denominó CD34, se expresaba en la membrana del 1-4% de las células nucleadas de la MO humana, y se comprobó que dicha población contenía la práctica totalidad de la capacidad de repoblación hematopoyética, lo que indicaba que, al menos de forma mayoritaria, las CMH humanas expresaban dicho marcador. De hecho, se ha utilizado la selección positiva de células CD34<sup>+</sup> como un método para depleccionar o purgar *ex vivo* de células tumorales contaminantes en productos hematopoyéticos (MO, productos de aféresis) autólogos antes de ser trasplantados, bien sea como único método de purga o en combinación con la selección negativa (por ejemplo, de células B en algunos linfomas). Más tarde se descubrió que la mayoría de progenitores con capacidad de repoblación, además de ser CD34<sup>+</sup>, eran CD38<sup>-</sup>, lo que permite enriquecerlos al menos en una orden de magnitud más. El fenotipo que mejor define las CMH

humanas se describió recientemente la sangre de cordón umbilical como Lin<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-/low</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD90<sup>-</sup> (13).

En el ratón, con mucho la especie en que los distintos progenitores hematopoyéticos están mejor caracterizados, y a pesar de que muchos de los marcadores que los identifican se han conservado bien a lo largo de la evolución, las cosas son algo distintas (por ejemplo, en el ratón las CMH son CD34<sup>-</sup>). Una característica que define a los progenitores inmaduros es que no expresan ninguno de los marcadores específicos de los distintos linajes maduros (CD3, CD4 o CD8 para células T, CD11b o Gr1 para células mieloides, B220 para células B, o el Ter-119 para células de la serie roja), es decir son Lin<sup>-</sup>. La denominada depleción Lin<sup>-</sup> utiliza una mezcla de anticuerpos frente a estos marcadores y permite eliminar la inmensa mayoría de células maduras y de precursores diferenciados, enriqueciendo unas 20 veces en capacidad de repoblación en comparación con la MO no fraccionada. Los marcadores c-Kit y Sca-1 suponen un paso más allá en la purificación de las CMH murinas. Las células Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup> (o simplemente KLS) están enriquecidas unas 1000 veces en capacidad de repoblación a largo plazo, en comparación con las de MO no fraccionada. Aún así, sólo una de cada 10 células KLS es una CMH. La tabla 2 es un listado de los principales marcadores que se utilizan en

TABLA 2. *Marcadores utilizados en el fenotipado de los diversos tipos de células hematopoyéticas murinas.*

<i>Marcadador</i>	<i>Función</i>
CD45	Antígeno panleucocitario (marca todas la células nucleadas de origen hematopoyético). Se trata de una tirosina fosfatasa.
Sca-1	<i>Stem cell antigen-1</i>
c-Kit	Receptor para el factor de células madre (SCF)
Flk-2	<i>Fetal liver kinase-2</i>
Tie-2	Receptor tirosina cinasa específico de endotelio
CD34	Sialomucina, ligando para L-selectina
CD41	Integrina $\alpha$ IIb
CD48	Ligando para el CD2
CD150	SlamF1 (molécula de la familia SLAM)
CD201	Receptor de proteína C endotelial (EPCR)
IL7R $\alpha$	Subunidad alfa del receptor de la IL-7
CD16/32	Receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de la IgG murina
Glicoforina A	Sialoglicoproteína específica de la serie roja (desde el proeritroblasto al hematíe maduro)

CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

TABLA 3. *Inmunofenotipo de los principales progenitores hematopoyéticos murinos. Modificado de Challen y Goodell (36).*

<i>Fenotipo</i>	<i>Tipo celular y referencia</i>
KLS	CMH y progenitores (30)
Flk-2 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> KLS	CMH (re población a largo plazo) (31)
CD150 <sup>+</sup> CD48 <sup>-</sup> CD41 <sup>-</sup> KLS	CMH (re población a largo plazo) (32)
Flk-2 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> KLS	célula repobladora a corto plazo (33)
IL7 $\alpha$ <sup>+</sup> KLS	progenitor linfoide común (CLP) (34)
Lin <sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup> Sca-1 <sup>-</sup>	progenitores mieloides (35)
Lin <sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit <sup>+</sup> Sca-1 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16/32 <sup>-</sup>	progenitor mieloides común (CMP) (35)
Lin <sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>-</sup> c-Kit <sup>+</sup> Sca-1 <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD16/32 <sup>-</sup>	megacariocito-eritrocito (MEP) (35)
Lin <sup>-</sup> IL7R $\alpha$ <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup> Sca-1 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16/32 <sup>+</sup>	progenitores de granulocitos y macrófagos (35)
CD3	células T
CD14	monocitos
CD15	granulocitos
CD33	
CD41	serie plaquetar
B220	células B
Ter-119	serie roja
Glicoforina A	serie roja

la identificación de progenitores hematopoyéticos murinos, mientras que la tabla 3 describe los fenotipos más aceptados de los distintos tipos de éstos.

En 1996, Goodell y colaboradores describieron en la MO una subpoblación celular muy minoritaria (representaría entre el 0.01 y el 0.07% del total de las células nucleadas), que en presencia de Hoechst 33342 (Ho342), un fluorocromo que se une al DNA, se tiñen menos que las demás, pudiéndose ser identificadas y aisladas por citometría de flujo, pues forman una exigua cola adyacente a la población mayoritaria de células en fase G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> del ciclo celular (figura 2), por lo que se denominó *Side Population* o células SP. Posteriormente estas células se han encontrado en la mayoría de los tejidos de muchas especies de mamíferos estudiadas. En la MO murina, es un marcador de células altamente inmaduras, que permite enriquecer 1000 veces la capacidad de repoblación hematopoyética. En humanos no se ha conseguido demostrar este enriquecimiento (14). La molécula responsable del fenotipo SP es el trans-

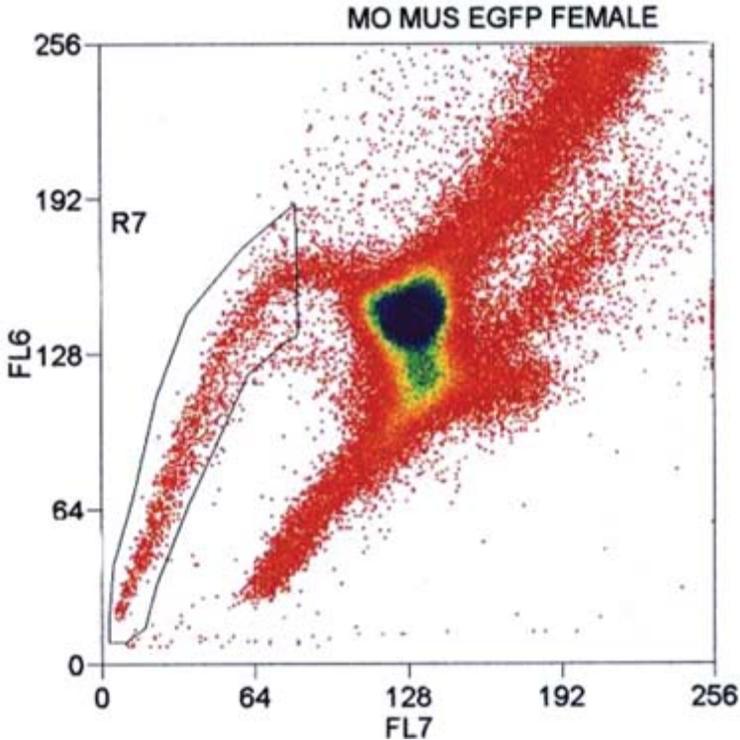


FIGURA 2. Histograma de citometría de flujo correspondiente al análisis de células de *MO murina* marcadas con Hoechst 33342. Este fluorocromo se une al DNA y, al excitarse con un láser ultravioleta, tiene una emisión dual, en el rojo y el azul (la señal en cada uno de los canales se representa en los ejes de abscisas y ordenadas). Nótese la distribución de la población celular de la ventana poligonal (de ahí el nombre de side population, o población lateral), menos fluorescente debido a que pueden extruir el fluorocromo por la acción del transportador de membrana ABCG2. (Cortesía del Dr. Jordi Pétriz).

portador de membrana ABCG2, un miembro de la familia ABC (*ATP-binding cassette*), que se encargaría de extruir agentes genotóxicos en células o tejidos que estén expuestos a éstos y que deban ser protegidos (CMH, placenta, riñón, intestino, epitelio biliar, células germinales). Su sobreexpresión en tumores también confiere resistencia a agentes quimioterápicos. El marcaje con Ho342 puede acoplarse al de diversos marcadores inmunofenotípicos, lo que permite análisis multiparamétricos mediante citometría de flujo que pueden afinar más aún en la caracterización y aislamiento de las células hematopoyéticas más inmaduras (15).

## TRASPLANTES HEMATOPOYÉTICOS

Los supervivientes a largo plazo de trasplantes hematopoyéticos alógenicos han constituido durante casi medio siglo la prueba más palpable de la existencia de CMH adultas, y concretamente el hecho de encontrar en su sangre células de vida media corta (como los granulocitos) derivadas del donante, décadas después del trasplante.

Existen dos tipos de trasplantes, autólogos y alogénicos, en función de si las células trasplantadas proceden del mismo individuo o de otro distinto. A éstos habría que añadir los xenogénicos, si las células trasplantadas proceden de otra especie distinta, aunque éstos sólo se han realizado de forma experimental. Durante muchos años la MO constituyó la única fuente de células hematopoyéticas para el trasplante, pero a raíz de la observación pionera de la existencia de CMH en sangre periférica de ratones por Goodman y Hodgson (16), y tras comprobarse que las CHM podían ser movilizadas de la MO a la sangre periférica mediante quimioterapia y/o factores de crecimiento como G-CSF, a partir de los años 90 se popularizaron los trasplantes de progenitores hematopoyéticos movilizados a sangre periférica, de forma que en la actualidad los trasplantes de células movilizadas de sangre periférica han desplazado en gran medida a los de MO.

Una tercera fuente de progenitores que se ha revelado con un enorme potencial es la sangre de cordón umbilical (SCU). En 1989 el grupo de Broxmeyer describió la existencia de CHM en la SCU en cantidades suficientes para utilizarlas en trasplantes (17). Muy poco después se realizó el primer trasplante exitoso utilizando esta fuente en un niño con anemia de Fanconi (18). Las principales ventajas de la SCU son su disponibilidad y una menor aloreactividad en comparación con otras fuentes (MO o sangre periférica) debido que las células inmunitarias que contiene son las de un recién nacido, lo que se traduce en una menor incidencia de EICH, y en que puedan utilizarse unidades de SCU menos histocompatibles que en el caso de las otras fuentes. Sus mayores desventajas son su escaso volumen (y por tanto el relativo bajo número de progenitores que contiene), lo que limita su aplicabilidad en adultos y se traduce en más largos periodos de aplasia tras el trasplante, y la defectuosa reconstitución inmunológica en adultos, que pone a los receptores en un elevado riesgo de infecciones graves. A pesar de todo, los trasplantes de SCU

se aplican cada vez más y existe una red internacional cada vez mayor de bancos públicos (NETCORD, <https://www.netcord.org>) y también privados de SCU que en conjunto ya almacenan cientos de miles de unidades.

Las principales aplicaciones de los trasplantes son las hemopatías malignas (leucemias, linfomas), aunque también se han utilizado en algunos tumores sólidos, y en un buen número enfermedades hereditarias que afectan a células hematopoyéticas (Tabla 4).

TABLA 4. *Lista de las principales enfermedades en las que el trasplante hematopoyético tiene algún valor terapéutico.*

---

**Leucemias**

- Leucemia linfoblástica aguda (LLA)
- Leucemia mieloide aguda (LMA)
- Leucemia linfática crónica (LLC)
- Leucemia mieloide crónica (LMC)
- Leucemia mielomonocítica (LMM)

**Linfomas**

- Enfermedad de Hodgkin
- Linfomas no-Hodgkin

**Mieloma múltiple**

**Síndromes mielodisplásicos (SMD)**

**Tumores sólidos**

- Sarcoma de Ewing
- Neuroblastoma
- Carcinoma de células renales
- Tumores cerebrales

**Enfermedades por depósito**

- Adrenoleucodistrofia
- Síndrome de Hurler
- Enfermedad de Krabbe
- Leucodistrofia metacromática
- Síndrome de Maroteaux-Lamy

**Anemia aplásica**

**Inmunodeficiencias primarias**

- Inmunodeficiencia severa combinada
- Síndrome de Wiskott-Aldrich
- Enfermedad granulomatosa crónica

**Otras enfermedades hereditarias**

- Anemia falciforme
  - Anemia de Fanconi
  - Osteopetrosis
  - Talasemia
-

En el caso de las hemopatías malignas, la base racional del trasplante hematopoyético depende de si es autólogo o alogénico. En el primer caso se persigue la eliminación de los clones malignos mediante quimioterapia (con o sin radioterapia) a dosis elevadas (mieloablativas). En estos pacientes el trasplante debe realizarse para rescatar su hematopoyesis de una aplasia potencialmente mortal, y no se busca un efecto del injerto contra el tumor. Tras los trasplantes autólogos el implante suele ser rápido y no suelen producirse complicaciones inmunológicas, si bien tienen como inconveniente una mayor tasa de recaídas de la enfermedad de base. En los trasplantes alogénicos, además de eliminar el máximo número de células malignas mediante la quimioterapia (con o sin radioterapia) también es decisiva la aloreactividad, es decir, la respuesta por parte de las células inmunitarias del donante frente a las malignas del receptor, el llamado efecto «injerto contra leucemia o contra tumor», que en muchos casos llega a erradicar las células malignas y se asocia a una menor tasa de recaídas que en los trasplantes autólogos. Sin embargo, la otra cara de la aloreactividad, muchas veces insoluble del efecto antileucémico, es la respuesta inmunitaria frente a antígenos presentes en otros tejidos del receptor (hígado, tubo digestivo, piel), lo que clínicamente se traduce en la llamada enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), una grave complicación que puede llegar a ser invalidante y mortal. Otra limitación de los trasplantes alogénicos es la necesidad de encontrar donantes histocompatibles adecuados, sólo disponibles en aproximadamente un tercio de los casos.

Una modalidad de trasplante alogénico que reduce la mieloablación con la idea de reducir la toxicidad asociada a ésta son los llamados minialoinjertos (o simplemente minialos) (19). Ideados por Rainer Storb y su grupo de Seattle, utilizan un acondicionamiento de intensidad más reducida cuyo objetivo es facilitar un mínimo injerto de las células trasplantadas en una fase inicial (es decir crear un quimerismo mixto) para, en una segunda fase, conseguir el quimerismo completo mediante infusiones de linfocitos del donante (DLI). De esta forma se sigue aprovechando el efecto inmunológico frente al tumor. Al ser mucho mejor tolerados, los minialos han permitido trasplantar a personas de mayor edad o con patologías de base.

## EL PROBLEMA DE LA MIELOABLACIÓN

Uno de los principales inconvenientes que presentan los trasplantes hematopoyéticos es que no basta con infundir las células a trasplantar como si se tratara de una simple transfusión. Para que las células trasplantadas tengan alguna oportunidad de injertar y repoblar, hay que eliminar, total o parcialmente, las células hematopoyéticas endógenas para «crear espacio» en la MO, para lo cual antes del trasplante hay que someter al receptor a un tratamiento mieloablativo llamado acondicionamiento. Por desgracia, estos tratamientos se basan en el empleo de radiación y/o agentes quimioterápicos y se asocian a una elevada morbilidad que resulta asumible para tratar una leucemia mortal, pero quizás no ser tan aceptable en muchos pacientes con enfermedades hereditarias, especialmente cuando existen terapias alternativas menos tóxicas, como los tratamientos substitutivos (aunque sean caros y haya que administrarlos de por vida). La introducción de nuevas pautas de acondicionamiento menos tóxicas y mejor toleradas por los pacientes facilitaría enormemente la aplicación de los trasplantes hematopoyéticos a muchas enfermedades hereditarias. En el caso de la TG, el problema de la mieloablación es especialmente limitante, como se comentará en el siguiente apartado.

## TERAPIA GÉNICA

Una de las aplicaciones más novedosas de las CMH es la TG. Los motivos que hacen de estas células una de las diana preferidas para la modificación genética incluyen en primer lugar la idea de que su corrección afectará a toda su progenie, que incluye nuevas CMH que se irán regenerando a lo largo de toda la vida del individuo. Así, cualquier enfermedad que afecte a alguna de las series hematopoyéticas, incluidas las que constituyen el sistema inmunitario, son teóricamente abordables mediante TG en CMH. Además, a esto hay que añadir su relativa facilidad de obtención, de manipulación *ex vivo*, y el hecho de que sean trasplantables. Otra de sus grandes ventajas es que, en las condiciones en las que se realizan estos tratamientos, las CMH transducidas no suelen desencadenar respuestas inmunes frente al producto transgén, como ocurre con la mayoría de otros tipos celulares. Como inconveniente, sin

embargo, hay que destacar la necesidad de someter al receptor a un tratamiento parcial o totalmente mieloablativo.

Con todos estos antecedentes probablemente no ha sido casual que los dos primeros ensayos de TG que pueden considerarse exitosos hayan estado basados en CMH. Tras una década de fracasos (en general con todas las modalidades de TG), en 2000 se publicaron los resultados del primer ensayo con resultados positivos. Los pacientes eran niños con inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X (SCID-X1), una rara y grave enfermedad debida a mutaciones en el gen de la subunidad gamma común ( $\gamma_c$ ) de una serie de receptores para interleucinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21). Algunas de éstas son factores de crecimiento para células del sistema inmunitario, de forma que los pacientes sufren una ausencia casi total de células T, B y NK funcionales, lo que resulta en infecciones graves y frecuentes que suelen ser fatales durante los primeros meses de vida.

Los investigadores introdujeron una copia sana del gen  $\alpha_c$  utilizando un vector retrovítico en las células CD34<sup>+</sup> de la MO de los propios pacientes, que se reinfundieron en ausencia de tratamiento mieloablativo (en este caso innecesario por la inmunosupresión de base y la enorme ventaja selectiva de las células corregidas). Pocos meses después de la infusión de las células corregidas genéticamente, los recuentos de células T alcanzaron cifras normales y la función inmunitaria mejoró significativamente en prácticamente todos los niños tratados. Estos resultados fueron confirmados independientemente por investigadores británicos usando un protocolo análogo en otros seis pacientes. La clave del éxito radicaba en el hecho que las células genéticamente modificadas, ya capaces de responder a los factores de crecimiento adecuados, podían proliferar y diferenciarse y tenían una ventaja selectiva para repoblar los nichos virtualmente vacíos de células T y B, mientras que las células no corregidas seguían desapareciendo por apoptosis, lo que da como resultado una repoblación completa por células corregidas genéticamente (20).

El segundo éxito reconocido de la TG para enfermedades monogénicas se produjo en pacientes con SCID-ADA (21). El enzima ADA cataliza la desaminación de la desoxiadenosina a adenosina, resultando su ausencia en un acúmulo de metabolitos altamente tóxicos para las

células T. Como ocurre en la SCID-X1, el trasplante de MO de un hermano compatible, si está disponible, constituye una buena alternativa terapéutica. Si no hay donante adecuado, los pacientes pueden ser tratados con ADA bovino pegilado, como tratamiento substitutivo.

El primer ensayo clínico de TG se había realizado en 1990 en niños con esta misma enfermedad. Consistió en la modificación genética de células T enfermas, que fueron reinfundidas a los pacientes. Doce años más tarde, los pacientes tratados, a los que se les mantuvo la terapia con PEG-ADA, expresaban el enzima, pero a unos niveles subterapéuticos. Este ensayo clínico se consideró fallido, probablemente porque la terapia substitutiva con ADA recombinante estaba anulando la ventaja selectiva para las células modificadas genéticamente. En el nuevo ensayo, realizado en Italia y cuyos resultados se publicaron en 2002, los investigadores utilizaron una mieloablación a dosis bajas, y retiraron el tratamiento substitutivo con ADA pegilado, lo que favoreció la repoblación selectiva por parte de las células modificadas genéticamente. El éxito conseguido es tal que hoy día podría considerarse la TG el tratamiento de elección para los pacientes con esta enfermedad.

Estos primeros éxitos aportaron renovadas esperanzas a esta joven disciplina. El hecho que dos tipos de SCID fueran las primeras enfermedades en ser curadas mediante TG no fue una sorpresa. Ya se ha comentado la poderosa ventaja selectiva que opera en las células genéticamente corregidas para proliferar o escapar de la apoptosis, y por tanto para repoblar *in vivo*. Por desgracia, no se espera que resulte tan fácil para la mayoría de enfermedades candidatas a ser corregidas usando genes que no proporcionan ninguna ventaja selectiva a las células modificadas (que son la inmensa mayoría). Una prometedora línea de investigación consiste en el empleo de genes seleccionables que, una vez introducidos junto al gen terapéutico permiten seleccionar *in vivo* las células transducidas usando agentes farmacológicos (22).

## INSERCIONES RETROVIRALES Y RIESGO ONCOGÉNICO

Por definición, todas las inserciones en el genoma son mutagénicas. Sin embargo, el riesgo de oncogénesis por inserción tras los procedimientos de transferencia génica estándar usando vectores integrativos en

los modelos preclínicos se consideraba extraordinariamente remoto. Por ello, el hallazgo que cuatro de los once niños tratados en el ensayo clínico francés para SCID-X1 antes mencionado y uno tratado con el protocolo inglés desarrollaran leucemias, varios años después de recibir la TG, sorprendió a toda la comunidad médica y científica, especialmente cuando se descubrió la existencia de una zona «caliente» para las inserciones retrovirales y crítica para la transformación leucémica en el locus del protoncogén LMO2 (23).

Previamente no se habían descrito efectos adversos similares en los cerca de 200 pacientes tratados en ensayos clínicos análogos que también usaban vectores integrativos, incluyendo la SCID-ADA o, exceptuando casos puntuales, en los miles de animales experimentales sometidos a procedimientos de transferencia génica integrativa (aunque quizás estos no habían sido estudiados con el suficiente detalle). Esto planteó la pregunta crucial de si la TG basada en este tipo de vectores era más peligrosa de lo que se pensaba, o de si estos casos estaban más relacionados con factores dependientes del contexto (por ejemplo, asociados a la propia enfermedad o al propio transgén terapéutico), y por lo tanto no podían ser extrapolables a otras situaciones. Es significativo que ninguno de los pacientes con SCID-ADA tratados ha desarrollado este tipo de complicación, a pesar de que los vectores utilizados son muy similares.

Buscando en una base de datos de varios miles de cánceres hematológicos murinos inducidos por inserciones retrovirales experimentales (<http://RTCGD.ncifcrf.gov>), Dave et al. encontraron dos casos asociados a inserciones cercanas al locus LMO2 y dos con inserciones en el locus IL2RG (el del gen terapéutico en esta enfermedad) (24). Una de ellas contenía una inserción en cada uno de ambos *loci*. Las probabilidades de que esos dos eventos se produjeran en la misma célula son tan remotas que el hallazgo sugiere que la expresión no regulada del transgén  $\alpha$  dirigida por el LTR retroviral (que contiene la secuencia promotora y el *enhancer*) se convirtió en un inesperado cofactor para la transformación leucémica. Un estudio posterior realizado para analizar prospectivamente la capacidad oncogénica tanto de la subunidad  $\alpha$  como del LMO2, utilizando vectores retrovirales codificando para ambos transgenes de manera independiente reveló que ambos tenían potencial oncogénico, si bien para que éste se hiciera evidente era necesario un periodo suficientemente largo de observación (mínimo 5-6 meses),

más de los que se habían utilizado en los estudios preclínicos previos al ensayo clínico por parte del grupo francés (25).

Estos casos de leucemia descritos por los investigadores franceses generaron una respuesta desmedida por parte de los medios de comunicación y la sociedad, así como escepticismo por parte de la comunidad científica, y se llegaron a paralizar todos los ensayos clínicos basados en vectores integrativos. Sin embargo, en estos momentos muchos países han levantado el veto a los vectores integrativos, que se han rediseñado y optimizado para minimizar sus potenciales riesgos.

## INDUCCIÓN DE TOLERANCIA A TRAVÉS DEL QUIMERISMO

Los estudios pioneros de Billingham y Medawar sobre la inducción de tolerancia a través de la creación de quimerismos hematopoyéticos han sido retomados por algunos investigadores. La idea es que la creación de estos quimerismos mixtos vía trasplante de CMH daría lugar a un estado de tolerancia que podría ser útil en receptores de trasplantes de órganos, pues les haría innecesario el tratamiento inmunosupresor, muchas veces de por vida, que estos pacientes requieren para no rechazar sus injertos. En este caso las CMH deben proceder del mismo donante del órgano que se trasplanta, pues la tolerancia es específica de donante. La disponibilidad de donantes ya supone una enorme limitación, y la otra es la enorme toxicidad asociada a los trasplantes hematopoyéticos alogénicos, tanto por la mieloablación como por la posibilidad de una EICH. Posibles vías de abordaje frente a estos inconvenientes, son el uso de minialos, ya comentados, la búsqueda de pautas de acondicionamiento mínimamente ablativas y de inmunosupresión que permitan la creación de quimerismos mixtos estables (26), así como otras estrategias como el empleo de dosis muy elevadas de progenitores inmaduros, un tema revisado recientemente por I. Weissman y colaboradores (27).

En nuestro laboratorio, comprobamos que el trasplante de células hematopoyéticas que expresaban la proteína verde fluorescente como marcador a ratones mínimamente acondicionados (con 3 Gy de irradiación corporal total —ICT—) resultaba en la expresión del transgén a largo plazo (22 semanas), lo que sugería que se estaba induciendo tolerancia frente a la EGFP (28).

Tras estas observaciones, en colaboración con investigadores de la Unidad de Neuroinmunología Clínica de nuestra institución, investigamos si dicha estrategia para inducir tolerancia podría ser aplicable a situaciones de mayor relevancia clínica como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), el modelo animal de esclerosis múltiple. La EAE se induce experimentalmente inmunizando animales susceptibles con autoantígenos de la vaina de mielina, lo que desencadena una enfermedad mediada por células T muy similar a la esclerosis múltiple. Observamos que, de manera preventiva, el quimerismo e incluso el microquimerismo molecular se asociaban a una protección muy robusta frente a la enfermedad inducida. En cuanto a la aplicación de modo terapéutico, es decir, en animales con la enfermedad establecida, comprobamos que no era indispensable crear quimerismo molecular con células que expresan el autoantígeno para inducir tolerancia. Tras la infusión de células de MO transducidas a receptores con EAE establecida sometidos a mieloablación parcial, éstos experimentaban mejorías clínicas muy significativas, incluso remisiones completas, a pesar de que las células trasplantadas no injertaban (eran rechazadas porque la inducción de la enfermedad experimental pasa por la generación de una respuesta inmune frente al autoantígeno expresado en las células transducidas). Observamos que los esplenocitos de los animales tratados producían más IL-5 e IL-10 tras exposición al autoantígeno que los de los controles, lo que nos sugería que la tolerancia que se inducía estaba mediada por células T reguladoras, probablemente del tipo inducible o Tr1. Además, tras comprobar que el injerto de las células hematopoyéticas transducidas no era necesario para obtener un beneficio terapéutico, infundimos las células de MO transducidas a ratones con EAE en ausencia de mieloablación y obtuvimos resultados similares (29). Esta no necesidad de mieloablación reduce notablemente la toxicidad del procedimiento y lo acerca mucho más a una potencial aplicabilidad clínica.

## REFERENCIAS

1. Bonifer C (2005) Epigenetic plasticity of hematopoietic cells. *Cell Cycle* **4**, 211-214.
2. Graf T, and Stadtfeld M (2008) Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 480-483.

3. Lessard J, and Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* **423**, 255-260.
4. Dykstra B, Kent D, Bowie M *et al.* (2007) Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* **1**, 218-229.
5. Zimmermann S, and Martens UM (2008) Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells. *Cell Tissue Res* **331**, 79-90.
6. Billingham RE, Brent L, and Medawar PB (1953) Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature* **172**, 603-606.
7. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK *et al.* (1950) The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med* **35**, 746-770.
8. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK *et al.* (1951) Recovery from radiation injury. *Science* **113**, 510-511.
9. Eaves CJ, Cashman JD, Sutherland HJ *et al.* (1991) Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* **628**, 298-306.
10. Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS *et al.* (1989) An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* **74**, 2755-2763.
11. Greiner DL, Hesselton RA, and Shultz LD (1998) SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* **16**, 166-177.
12. Adams GB, and Scadden DT (2006) The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* **7**, 333-337.
13. Majeti R, Park CY, and Weissman IL (2007) Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* **1**, 635-645.
14. Pearce DJ, and Bonnet D (2007) The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **35**, 1437-1446.
15. Weksberg DC, Chambers SM, Boles NC *et al.* (2008) CD150<sup>+</sup> side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells. *Blood* **111**, 2444-2451.
16. Goodman JW, and Hodgson GS (1962) Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* **19**, 702-714.
17. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G *et al.* (1989) Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3828-3832.
18. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD *et al.* (1989) Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* **321**, 1174-1178.
19. Carella AM, Champlin R, Slavin S *et al.* (2000) Mini-allografts: ongoing trials in humans (editorial) *Bone Marrow Transplant* **25**, 345-350.
20. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G *et al.* (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669-672.

21. Aiuti A, Slavin S, Aker M *et al.* (2002) Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* **296**, 2410-2413.
22. Neff T, Beard BC, and Kiem HP (2006) Survival of the fittest: in vivo selection and stem cell gene therapy. *Blood* **107**, 1751-1760.
23. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M *et al.* (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **348**, 255-256.
24. Dave UP, Jenkins NA, and Copeland NG (2004) Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science* **303**, 333.
25. Woods NB, Bottero V, Schmidt M *et al.* (2006) Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* **440**, 1123.
26. Sykes M (2009) Hematopoietic cell transplantation for tolerance induction: animal models to clinical trials. *Transplantation* **87**, 309-316.
27. Weissman IL, and Shizuru JA (2008) The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* **112**, 3543-3553.
28. Puig T, Kadar E, Limon A *et al.* (2002) Myeloablation enhances engraftment of transduced murine hematopoietic cells, but does not influence long-term expression of the transgene. *Gene Ther* **9**, 1472-1479.
29. Eixarch H, Espejo C, Gomez A *et al.* (2009) Tolerance Induction in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Using Non-myeloablative Hematopoietic Gene Therapy With Autoantigen. *Mol Ther.* (in press)
30. Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K *et al.* (1992) In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* **80**, 3044-3050.
31. Kiel MJ, Radice GL, and Morrison SJ (2007) Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell* **1**, 204-217.
32. Goodell MA, Brose K, Paradis G *et al.* (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**, 1797-1806.
33. Yang L, Bryder D, Adolfsson J *et al.* (2005) Identification of Lin (-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* **105**, 2717-2723.
34. Kondo M, Weissman IL, and Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672.
35. Akashi K, Traver D, Miyamoto T *et al.* (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197.
36. Challen GA, Boles N, Lin KK *et al.* (2009) Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A* **75**, 14-24.