



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**CÉLULAS MADRE: FUNDAMENTOS Y APLICACIÓN COMO TERAPIA  
CELULAR PARA DIVERSAS ENFERMEDADES, UNA REVISIÓN ENFOCADA  
EN EL USO DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA  
MÉDICA**

**AUTOR: CARLOS BASTIAS ASTUDILLO  
PROFESORA GUÍA: TM. Mg. SP. MÓNICA MALDONADO ROJAS**

**TALCA, CHILE**

**2021**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
3.1 Objetivo general.....	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>9</b>
4.1 Diseño de estudio.....	9
4.2 Diseño de inclusión.....	9
4.3 Aspectos éticos.....	9
<b>5. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
5.1 Células madre.....	10
5.1.1 Obtención de células madre.....	13
5.2 Células pluripotentes inducidas.....	15
5.2.1 Des-diferenciación de las células madre.....	19
5.3 Mecanismo de acción de células madre.....	21
5.4 Células madre de la médula ósea.....	25
5.4.1 Células madre hematopoyéticas (HSC).....	27
5.5 Recolección y procesamiento de HSC en medicina regenerativa.....	34
5.5.1 Recolección de HSC.....	35
5.5.2 Procesamiento de HSC.....	39
5.6 Terapia celular basada en el uso de HSC.....	43
5.6.1 Enfermedades autoinmunes.....	45
5.6.2 Inmunodeficiencias.....	49
5.6.3 Insuficiencia hereditaria de la médula ósea.....	53
5.6.4 Trastornos hereditarios de glóbulos rojos.....	56
5.7 Datos, controversias y regulación sobre el trasplante de HSC.....	60
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Jerarquía de desarrollo del compartimento de células madre.....	12
<b>Figura 2.</b> Descripción general de la tecnología iPSC.....	16
<b>Figura 3.</b> Interacción propuesta de las MSC con las células inmunitarias del huésped.....	23
<b>Figura 4.</b> Establecimiento de grupos definitivos de células madre hematopoyéticas (HSC) en embriones de ratón y humanos.....	28
<b>Figura 5.</b> Mapa de ruta revisada de la jerarquía hematopoyética.....	32
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática del proceso de trasplante autólogo de HSC y reconstitución inmune postrasplante en enfermedades autoinmunes.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las células madre de acuerdo con su origen, fuentes de obtención y potencial de diferenciación.....	14
<b>Tabla 2.</b> Resumen de los mecanismos de acción de las MSC.....	24
<b>Tabla 3.</b> Fuentes de HSC y sus características.....	40
<b>Tabla 4.</b> Estrategias, ventajas y desventajas del HSCT haploidéntico con depleción de células T y repletas de células T empleadas en enfermedades no malignas.....	52
<b>Tabla 5.</b> Resumen sobre los objetivos del HSCT y HSCT con terapia génica en las enfermedades revisadas.....	59

## LISTADO DE ABREVIATURAS

- Anticoagulante ácido-citrato-dextrosa (**ACD-A**)
- Asociación Estadounidense de Banco de Sangre (**AABB**)
- Anemia de Fanconi (**FA**)
- Anemia de Diamond-Blackfan (**DBA**)
- Antígeno leucocitario humano (**HLA**)
- Células madre (**CM**)
- Células madre adultas (**CMA**)
- Células madre embrionarias (**CME**)
- Células madre fetales (**CMF**)
- Células madre pluripotentes inducidas (**iPSC**)
- Células madre mesenquimales (**MSC**)
- Células madre hematopoyéticas (**HSC**)
- Células madre y progenitoras hematopoyéticas (**HSPC**)
- Células madre intestinales (**ISC**)
- Células diferenciadas derivadas de las iPSC (**iPSCs-Diff**)
- Células natural killer (**NK**)
- Células grasas desdiferenciadas (**DFAT**)
- Dimetilsulfóxido (**DMSO**)
- Especies reactivas de oxígeno (**ROS**)
- Enfermedad de injerto contra huésped (**EICH**)
- Enfermedades autoinmunes (**EA**)
- Factor estimulante de colonias de granulocitos (**G-CSF**)
- Factor 1 derivado de células estromales (**SDF-1**)
- Food and Drug Administration (**FDA**)
- Globulina antitimocítica (**ATG**)
- HSC a largo plazo (**LT-HSC**)
- HSC de plazo intermedio (**IT-HSC**)
- HSC a corto plazo (**ST-HSC**)
- Inmunodeficiencias primarias (**IDP**)
- Masa celular interna (**ICM**)
- Mieloma múltiple (**MM**)
- Progenitores multipotentes (**MPP**)
- Progenitores mieloides comunes (**CMP**)
- Recuento total de células nucleadas (**TNC**)
- Síndromes hereditarios de insuficiencia de la médula ósea (**IBMFS**)
- Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula (**EBMT**)
- Transición epitelial-mesenquimal (**EMT**)
- Trasplante de HSC (**HSCT**)
- Veneno de abeja (**BV**)
- Vesículas extracelulares (**VE**)

## 1. RESUMEN

Las células madre son las células no especializadas del cuerpo humano, capaces de autorrenovarse gracias a su capacidad de proliferación ilimitada y su conservación como células indiferenciadas, y generar diferentes tipos celulares. El uso de células madre en medicina regenerativa constituye un área ampliamente estudiada durante las últimas décadas. En este contexto, el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) se ha estudiado y ha demostrado ser una alternativa para tratar diversas enfermedades. El objetivo del HSCT es restituir a un paciente un sistema hematopoyético sano, y son varios los estudios que confirman la efectividad de esta terapia. Las células madre hematopoyéticas (HSC) se pueden recolectar desde la médula ósea, sangre periférica y del cordón umbilical al nacer. Para la recolección de los productos de HSC hay protocolos bien establecidos descritos en el Manual Técnico de la Asociación Estadounidense de Bancos de Sangre (AABB). Actualmente la recolección de HSC se realiza principalmente a partir de sangre periférica, para la cual se utilizan agentes movilizadores. Debido a la disponibilidad limitada de donantes alogénicos compatibles para el HSCT, más los efectos adversos como la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y posibles infecciones, la terapia génica combinada con un trasplante autólogo de HSC constituye una buena alternativa y actualmente está siendo ampliamente estudiada principalmente en enfermedades monogénicas que pueden tratarse con estos enfoques, pero al igual que el HSCT, tampoco está libre de efectos adversos. En esta revisión bibliográfica se analizó evidencia sobre el uso del HSCT y el trasplante autólogo de HSC genéticamente corregidas en enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, síndromes hereditarios de insuficiencia hereditaria de la médula ósea y trastornos hereditarios de glóbulos rojos con resultados favorables. De todas formas, el empleo de esta terapia sigue siendo estudiado para estandarizar y encontrar el mejor procedimiento que brinde el menor riesgo a la aparición de eventos adversos y más beneficios.

**Palabras clave:** Células madre, células madre hematopoyéticas (HSC), trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), terapia celular, terapia génica.

## 2. INTRODUCCIÓN

La necesidad de reemplazar o regenerar los tejidos dañados es cada vez mayor en la actualidad debido a enfermedades degenerativas, tumores, traumatismos y defectos congénitos relacionados con la edad y otras enfermedades. La primera opción en la terapia regenerativa es reconstruir los tejidos dañados mediante el uso de células diferenciadas obtenidas por biopsia, expandidas *in vitro* y sembradas en andamios apropiados, hechos de materiales artificiales y/o naturales (1).

Frente al desafío anterior, en comparación al uso de células diferenciadas, la aplicación de células madre (CM) se considera más ventajosa, porque las células madre se pueden obtener más fácilmente y en mayores cantidades, tienen una capacidad de proliferación mucho mayor, soportan más cambios, experimentan senescencia más tarde, se pueden diferenciar en una amplia gama de fenotipos celulares deseados, y también apoyan la vascularización de andamios (2).

Por su lado, las CM o células troncales (en inglés se pueden encontrar como *stem cells*) son aquellas células no especializadas del cuerpo humano (3). Estas son capaces de autorrenovarse gracias a su capacidad de proliferación ilimitada y su conservación como células indiferenciadas, y generar diferentes tipos celulares (óseas, sanguíneas, epidérmicas, neuronas, etc.) (4).

Actualmente, la principal aplicación clínica de las células madre, debido a su potencial de diferenciación, es en medicina regenerativa. Dentro de esta área se están desarrollando diversos trabajos de investigación que buscan reemplazar células dañadas por células funcionales que restituyan la función normal de los tejidos u órganos en enfermedades debilitantes, tales como: diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson y enfermedades de células sanguíneas (5).

Es así como las terapias basadas en CM tienen el potencial de proporcionar soluciones novedosas para el tratamiento de una variedad de enfermedades, pero los principales obstáculos para tales terapias residen en la diferenciación incontrolada y el injerto funcional de los tejidos implantados (6).

Además de la medicina regenerativa, en la cual se centra esta revisión, existen otros objetivos para las células madre. Tal como el modelado experimental de trastornos humanos usando células madre, que permite definir los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a las enfermedades y desarrollar terapias para tratarlas (7).

Debido a la importancia de las células madre en la actualidad, su amplio uso en investigación y principalmente su potencial en medicina regenerativa, en este trabajo se presenta información actualizada sobre los fundamentos y la aplicación de las células madre como terapia celular para diversas enfermedades, con un enfoque en el uso de células madre hematopoyéticas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Realizar una actualización sobre la utilización de células madre como terapia celular.

#### **Objetivos Específicos**

1. Comprender el origen, síntesis y desarrollo de las células madre.
2. Conocer el proceso de recolección de células madre hematopoyéticas.
3. Discutir la efectividad de la terapia celular con células madre hematopoyéticas.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Diseño de estudio**

Se realizó un estudio tipo revisión bibliográfica, desarrollado en base a investigaciones publicadas en las bases de datos Pubmed, Scielo, Science direct y la editorial Elsevier. Se utilizaron revistas indexadas de tal forma de asegurar que han cumplido con criterios de calidad lo que les ha permitido ingresar a bases de datos internacionales y/o nacionales. La búsqueda se realizó a través de palabras clave o combinaciones de palabras, con el propósito de revisar trabajos publicados relacionados con células madre y terapia celular.

### **4.2 Criterios de inclusión**

Se incluyeron de preferencia estudios publicados durante los últimos 5 años y algunos más antiguos que referencian desarrollo y evolución histórica de la temática, en los idiomas inglés y español, en revistas indexadas o de organizaciones internacionales reconocidas. Los artículos fueron excluidos por título, resumen o texto completo por irrelevancia para el tema investigado. Por último, para identificar más estudios que cumplieran con los criterios de inclusión, también se revisaron las referencias de los artículos seleccionados.

### **4.3 Aspectos éticos**

De acuerdo con la modalidad utilizada en el estudio, no se requiere una aprobación de un comité ético, dado que no se hizo uso de datos de pacientes ni animales, solo se llevó a cabo una revisión bibliográfica de artículos publicados y análisis de los mismos.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Células madre

Las células madre existen tanto desde el embrión como en adultos, es por esto por lo que se pueden clasificar dependiendo de su origen o procedencia. Generalmente se dividen en 2 categorías, las células madre adultas (CMA) y las células madre embrionarias (CME). Algunos investigadores también nombran a las células madre fetales (CMF). Recientemente se ha identificado un nuevo tipo, que corresponde a las células madre pluripotenciales inducidas (iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*) (1, 8). Las investigaciones con CME y CMF han estado sujetas a controversia debido a las dificultades políticas y éticas que conlleva su obtención.

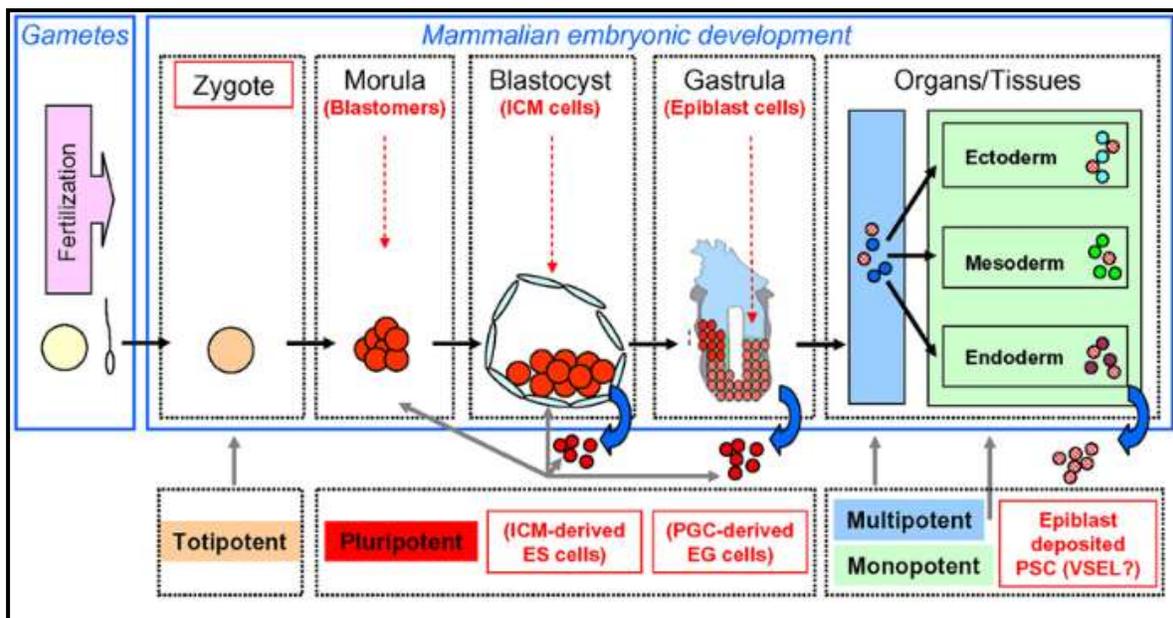
Las CMA se pueden clasificar como multipotenciales o unipotenciales, las cuales se encuentran en los tejidos adultos y cordón umbilical pudiéndolas obtener sin dañar al embrión. A partir de las CMA se obtienen células adultas dependiendo del tejido donde se encuentren, de manera que, su papel consiste en conservar y restaurar este tejido (9) por lo que también se les llama células madre órgano-específicas. Por otro lado, las CME pueden ser obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión solamente durante los primeros cuatro días después de la fertilización (10) y son capaces de producir cualquier célula del cuerpo. Más adelante en esta revisión se hablará más acerca de las iPSC.

Obedeciendo a su capacidad o potencial de diferenciación las células madre también pueden clasificarse en 4 grandes grupos, que podemos encontrar en las etapas del desarrollo embrionario mamífero (figura 1), están las células: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, y unipotentes (11). Primero están las células madre totipotentes (derivadas del cigoto), que pueden diferenciarse en tejidos embrionarios, así como extra-embrionarios, pudiendo generar un organismo vivo completamente funcional.

El ejemplo más conocido de una célula totipotente es un óvulo fecundado (formado cuando un espermatozoide y un óvulo se unen para formar un cigoto). Alrededor del cuarto día después de la fecundación, estas células comienzan a especializarse en células pluripotentes que son tipos de células flexibles, pero no pueden generar un organismo completo por sí solas (12).

Las células pluripotentes surgen alrededor del momento de la formación de la masa celular interna, cuando se establece el linaje trofoectodermo (11, 13). Estas tienen la capacidad de diferenciarse en cualquiera de los tejidos o tipo de célula correspondiente a los 3 linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), incluyendo las células sexuales o germinales. Las células pluripotentes corresponden a las células aisladas de la mórula, células de la masa celular interna de un blastocisto y epiblastos de la gástrula, que dan lugar a líneas de células madre embrionarias establecidas o células germinales embrionarias que son derivados *in vitro* de células germinales primordiales (12).

Las células madre multipotentes son capaces de generar células de su propia capa embrionaria. Estas pueden auto-renovarse y diferenciarse en un rango específico de tipos de células. Un ejemplo de este tipo de células son las células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*). Las MSC pueden diferenciarse en osteoblastos, miocitos, adipocitos y condrocitos (14). Por último, las células madre unipotentes a diferencia de los demás tipos de células madre, solo pueden especializarse a un linaje celular.



**Figura 1.** Jerarquía de desarrollo del compartimento de células madre. Conceptos: ICM-derived ES cells = células madre embrionarias (ES cells) derivadas de la masa celular interna (ICM); PGC-derived EG cells = células germinales embrionarias (EG cells) derivadas *in vitro* de células germinales primordiales (PGC); células madre pluripotentes (PSC). De acuerdo con Ratajczak et al., las VSEL (células madre muy pequeñas similares a embrionarias) son PSC derivadas de epiblasto que se depositan en órganos/tejidos en desarrollo como una población de células madre que da origen a células madre comprometidas con tejido monopotente. Tomado y adaptado de Ratajczak et al., 2008. (12)

### 5.1.1 Obtención de células madre

Las células madre se obtienen generalmente de cuatro fuentes básicas con el objetivo de usarlas en terapia celular e ingeniería de tejidos. Las fuentes principales son tejido embrionario, tejidos fetales, como el feto, placenta (es decir, amnios y corion), líquido amniótico y cordón umbilical (gelatina de Wharton, sangre), ubicaciones específicas en el organismo adulto, por ejemplo grasa, médula ósea, músculo esquelético, piel o sangre, y células somáticas diferenciadas después de haber sido reprogramadas genéticamente, es decir, iPSC (tabla 1) (1).

Las células madre pluripotentes (CMP) incluyen células madre embrionarias (CME) que se derivan de la masa celular interna del blastocisto del embrión y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que se crean a partir de células de fácil acceso, como las de la sangre, la piel o la orina, a través de la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción en el cultivo, haciéndolas inmortales. A partir de la expansión celular realizada *in vitro*, se obtiene el linaje celular requerido, este cultivo celular luego tendrá que ser estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* (en ratones) para que luego estas células puedan ser usadas como terapia (15).

Por su parte las CMA que se obtienen son principalmente de la piel, cornea o retina, sangre y musculo esquelético. El potencial de estas células es unipotente por lo que en cultivo no se puede obtener otro linaje celular que no sea el propio de las células que se extrajeron. Entonces estas células son proliferadas en cultivo celular para que luego puedan ser estudiadas y posteriormente usadas en terapia (15).

**Tabla 1.** Clasificación de las células madre de acuerdo con su origen, fuentes de obtención y potencial de diferenciación. Tomado y adaptado de Bacakova et al., 2018. (1)

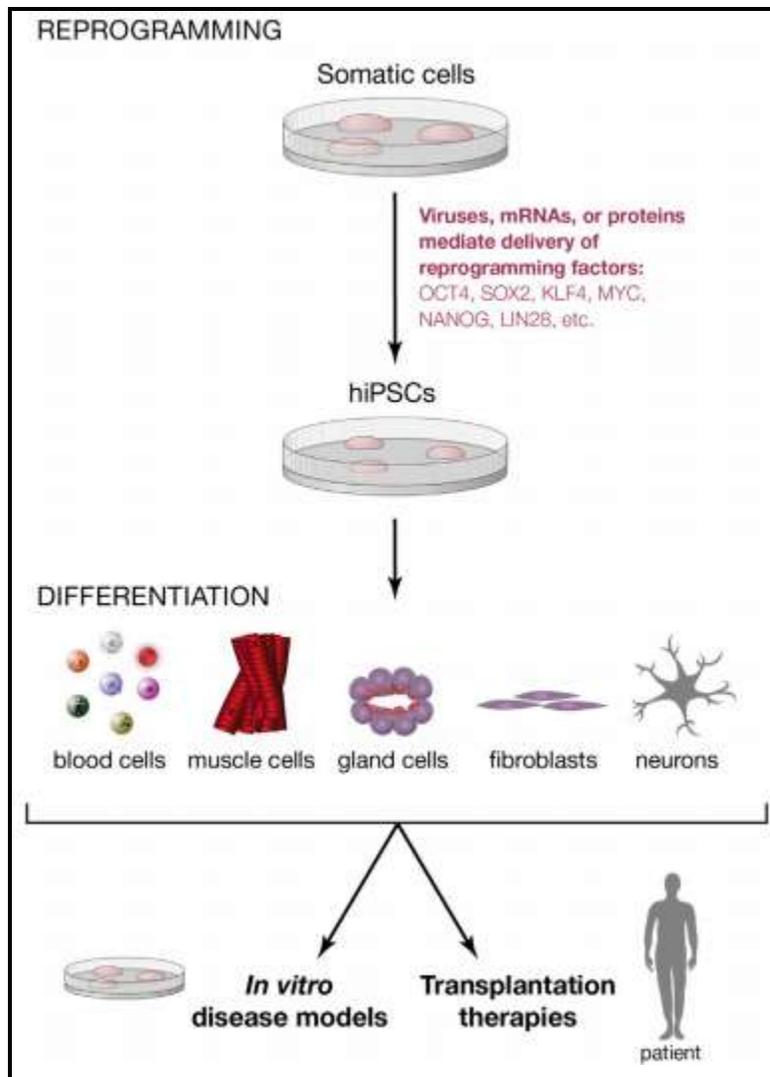
<b>Células madre</b>	<b>Fuente</b>		<b>Potencial</b>
<b>Embrionarias</b>	Cigoto		Totipotente
	Mórula, Blastocisto, Gástrula		Pluripotente
<b>Fetales</b>	Feto		Multipotente, Pluripotente
	Tejidos extra fetales	Placenta (amnios y corion)	Multipotente, Pluripotente
		Fluido amniótico	Multipotente, Pluripotente
		Gelatina de Wharton en cordón umbilical	Multipotente, Pluripotente
		Sangre del cordón umbilical	Multipotente
<b>Adultas</b>	Médula ósea		Multipotente, Pluripotente
	Otros tejidos y órganos (tejido adiposo, piel, músculo esquelético, corazón, hígado, tejido neural, sangre, etc.)		Multipotente, Pluripotente, Unipotente
<b>Inducidas</b>	Células somáticas diferenciadas		Pluripotente

## 5.2 Células pluripotentes inducidas

Los autores Takahashi y Yamanaka, en el año 2006, reportaron que un pequeño conjunto de factores de transcripción, al expresarse ectópicamente en una célula somática, pueden reprogramarla de nuevo en un estado pluripotente. Esto lo lograron al tomar un set de 24 genes candidatos, seleccionados principalmente por su alta y específica expresión en células pluripotentes, y expresarlos simultáneamente en células diferenciadas utilizando retrovirus integradores (16).

Para esto identificaron las células que indujeron la pluripotencia mediante un gen marcador seleccionable que no se expresa en las células somáticas, pero se activa preferentemente en las células pluripotentes. Luego, redujeron el cóctel de genes al conjunto mínimo de factores de reprogramación (Klf4, Sox2, Oct4 y Myc, también conocido como KSOM) mediante un proceso denominado proceso de eliminación. Finalmente, demostraron que las células pluripotentes inducidas resultantes tienen todas las características clave de sus homólogos de células madre embrionarias (CME), es decir, la capacidad de dar lugar a células diferenciadas (16).

De esta forma, las células del paciente se pueden reprogramar en iPSC utilizando protocolos de reprogramación optimizados que involucran moléculas pequeñas, microARN y combinaciones de factores de reprogramación. Las iPSC se pueden diferenciar en células somáticas que podrían usarse en terapias de trasplante o alternativamente para modelar enfermedades humanas (figura 2).



**Figura 2.** Descripción general de la tecnología iPSC. hiPSCs (*human induced Pluripotent Stem Cells*). Extraído de Hockemeyer et al., 2016. (17)

El progreso de las terapias basadas en iPSC consiste en que (por ejemplo, en un paciente con un desorden neurodegenerativo) las células iPS específicas del paciente, en este caso derivadas por co-expresión ectópica de factores de transcripción en células aisladas de una biopsia de piel, pueden usarse en una de dos vías. En los casos en los que se conoce la mutación que causa la enfermedad (por ejemplo, la enfermedad de Parkinson familiar), la selección de genes podría usarse para reparar la secuencia de ADN. Las iPSC específicas del paciente con corrección genética (reparadas) luego se someten a una diferenciación dirigida en el subtipo afectado generando células sanas *in vitro* que podrán ser trasplantadas al paciente (18).

Alternativamente, la diferenciación dirigida de las iPSC específicas del paciente en el subtipo afectado permitirá modelar la enfermedad del paciente *in vitro*, y se pueden seleccionar fármacos potenciales, lo que ayuda en el descubrimiento de nuevos compuestos terapéuticos. De esta forma, con el descubrimiento de la tecnología de reprogramación (tecnología CRISPR-Cas9) que permite el uso de iPSC específicas de una enfermedad en protocolos establecidos de diferenciación dirigida, se han eludido muchas limitaciones del modelado de enfermedades con CME, como la necesidad de edición de genes (18, 19).

Desde el aislamiento de las CME humanas, los esfuerzos se han centrado en el uso de la diferenciación dirigida para generar células madre y progenitoras hematopoyéticas con el potencial de injerto en ratones receptores humanizados como primer paso para la terapia celular para trastornos sanguíneos. A partir de iPSCs humanas en cultivo se ha logrado conferir injerto mieloide y eritroide a corto plazo en ratones inmunocomprometidos (20).

También en el estudio de Doulatov et al. (21), se usaron iPSCs humanas para modelar la aplasia eritroide congénita de la anemia de Diamond-Blackfan (DBA) utilizando iPSC de pacientes portadores de mutaciones en los genes de la proteína ribosómica RPS19 o RPL5. El injerto de progenitores derivados de iPSC DBA humanos para generar ratones quiméricos reveló una diferenciación eritroide marcadamente alterada, recapitulando el fenotipo de DBA humano. A partir de lo anterior se logró identificar al inductor de autofagia SMER28 como un candidato terapéutico que también es capaz de rescatar la eritropoyesis en ratones quiméricos.

Sin embargo, en el estudio de Abad et al. (22), se demostró que la inducción transitoria de los cuatro factores Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc en ratones da como resultado teratomas que emergen de múltiples órganos. Es por esto que sigue habiendo serios problemas de seguridad para la terapia iPSC, ya que un subconjunto de células indiferenciadas a menudo permanece dentro de la mezcla de células diferenciadas; estas pueden formar teratomas benignos o teratocarcinomas agresivos después de la inyección *in vivo* (23).

Se sostiene ampliamente que, en el transcurso de la diferenciación dirigida, las iPSC perderán gradualmente la expresión de los marcadores de pluripotencia. Sin embargo, esta información por sí sola es insuficiente para determinar si las iPSC están lo suficientemente diferenciadas como para que sean incapaces de formar un teratoma, un problema importante en cualquier posible terapia con iPSC (24). Por lo tanto, la eliminación completa de las iPSC en los productos celulares finales sin comprometer su viabilidad, eficacia y propiedades funcionales es necesaria para el éxito de cualquier terapia celular basada en iPSC.

En el estudio de Aeyung et al. (25), descubrieron que el veneno de abeja (BV, del inglés “*Bee Venom*”) inducía selectivamente la muerte celular en las iPSC, pero no en las células diferenciadas derivadas de las iPSC (iPSCs-Diff). El BV rápidamente alteró la integridad de la membrana celular y adherencias focales, seguido de inducción de apoptosis y necrosis en iPSC. El mecanismo consiste en que el BV rápidamente aumenta la concentración de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y las especies reactivas de oxígeno (ROS), alterando el potencial de la membrana mitocondrial, en consecuencia, produciendo la apoptosis de la célula.

Además, el tratamiento con BV antes del injerto *in ovo* previno eficazmente la formación de teratomas derivados de iPSC. Por el contrario, no se observó daño en el ADN en iPSCs-Diff después del tratamiento con BV, lo que demuestra aún más la seguridad de este para su uso con iPSCs-Diff. Esto demostraría que el BV tiene una potente actividad antiteratoma al eliminar las iPSC residuales y puede utilizarse para el desarrollo de terapias celulares basadas en iPSC eficaces y seguras (25).

### **5.2.1 Des-diferenciación de las células madre**

Actualmente se sabe que los adipocitos llenos de lípidos, que son el tipo de célula más abundante en cualquier tejido adiposo, se pueden reprogramar en células madre multipotentes llamadas células grasas desdiferenciadas (DFAT, del inglés *Dedifferentiated Fat cells*) mediante un método tradicional de cultivo de techo. Las células DFAT exhiben una robusta capacidad de proliferación y potenciales de diferenciación de múltiples linajes, teniendo ventajas únicas cuando se utilizan como fuente celular para el tratamiento de muchas enfermedades clínicas gracias a la abundancia de adipocitos maduros en el tejido adiposo que hace que las células DFAT sean fáciles de obtener (26).

Entonces, si bien podemos lograr (con tecnología de reprogramación) transformar una célula diferenciada a una célula pluripotente (iPSC), la dediferenciación de las células también se lleva a cabo fisiológicamente. Por ejemplo, un estudio realizado por Murata et al. (27), demostró que la ablación de las células madre intestinales LGR5+ (ISC, del inglés *Intestinal Stem Cells*) se asocia con una rápida restauración del compartimento ISC.

Esto debido a que observaron que, si bien, las ISC LGR5 + mantienen la autorrenovación del epitelio colónico y del intestino delgado, su ablación no compromete la integridad epitelial, ya que otras células de la cripta (ej., progenitores de enterocitos y secretores, y ocasionalmente células de Paneth) pronto reponen el compartimento LGR5+ al dediferenciarse y proveer nuevas ISC LGR5+ (28).

En este contexto, a través de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) las células epiteliales pierden su polaridad celular y su adhesión célula a célula, y adquieren características migratorias e invasivas para convertirse en células mesenquimales. Este proceso es una característica común entre el desarrollo embrionario y progresión del cáncer. La diferencia radica en que la EMT en el desarrollo se ha descrito como eventos de diferenciación, mientras que en la mayoría de los casos la EMT en cáncer se ha descrito como un evento de dediferenciación (29).

Se sugiere que la EMT provoca una desdiferenciación que permite la posterior diferenciación. En el desarrollo normal, los eventos de la EMT pueden causar una inversión parcial de la diferenciación para superar las barreras de diferenciación. Por otro lado, cuando la EMT se activa de forma aberrante en el cáncer, las células adquieren atributos de células madre que contribuyen a la capacidad de autorrenovación y son capaces de diferenciarse de todos los tipos de células representadas en el tumor. Las células madre cancerosas resultantes alcanzan las características del cáncer, incluida la inmortalidad replicativa, la resistencia a la muerte celular y la invasividad (29).

### **5.3 Mecanismo de acción de células madre**

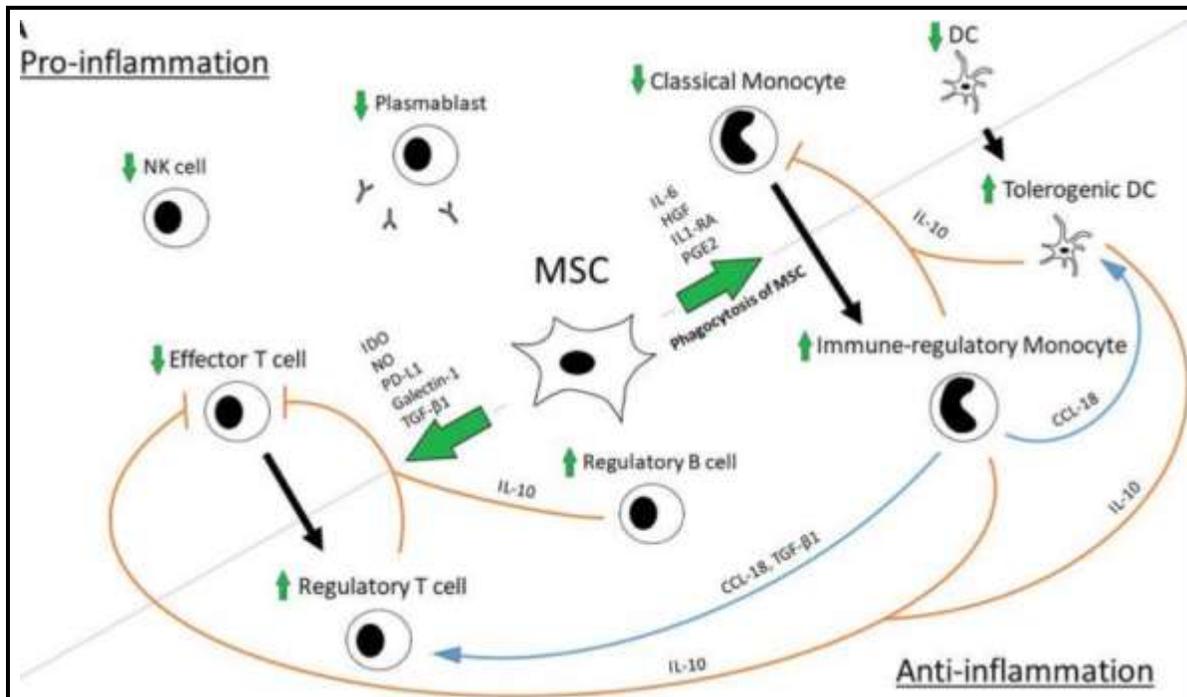
Las células madre multipotentes como las MSC (células madre mesenquimales) son considerablemente analizadas como una herramienta efectiva en terapia celular. Debido a la limitación clínica de usar CME y iPSC, las células madre mesenquimales (MSC) despiertan gran interés gracias a que están libres tanto de preocupaciones éticas como de la formación de teratoma (30). Las MSC se encuentran en casi todos los tejidos, pueden ser fácilmente aisladas de la médula ósea, tejido adiposo, del cordón umbilical, hígado fetal, músculo y pulmón, y ser exitosamente expandidas *in vitro* (31).

Gracias a sus potenciales inmunomodulatorios, inmunosupresivos y regenerativos, el efecto de las MSC en terapia celular se ha analizado en enfermedades inflamatorias, inmuno-mediadas, y degenerativas. Los mecanismos terapéuticos de las MSC son; migración, reparación y regeneración de tejido, inmunomodulación, efectos antiinflamatorios, actividad anti apoptótica, neoangiogénesis, activación de células madre residentes, y también efectos antimicrobiales (tabla 2).

El mecanismo de migración consiste secuencialmente en tres pasos primordiales. Primero, la quimio atracción de las MSC hacia los sitios de inflamación se logra mediante quimiotaxis hacia algunas quimiocinas y citocinas acumuladas allí, se incluyen; EGF, IGF, PDGF, VEGF, SDF-1, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8. La hipoxia y estimuladores como VCAM-1, MCP-1, MCP-3, G-CSF despiertan la movilización de las MSC. Segundo, la adhesión de las MSC a las células dañadas se logra mediante moléculas de adhesión como selectinas e integrinas. En tercer lugar, las MSC son infiltradas en los sitios de inflamación por algunas enzimas como las MMP y TIMP (32).

Las MSC también pueden alterar el microambiente tisular a través de la secreción de factores paracrinos. La señalización paracrina regula la proliferación, actividad antioxidante, diferenciación, envía señales a macrófagos y células endoteliales, y potencialmente también estimula las células madre residentes para ayudar en el proceso de reparación de tejidos (33, 34).

Citocinas y factores reguladores como IL-10, TGF- $\beta$ , PGE2,IDO, NO y FAS/FASL contribuyen en la característica inmunomoduladora de las MSC, al inhibir la proliferación y función de algunas células inmunes tales como linfocitos B y T, células dendríticas, células Natural Killer, monocitos, neutrófilos y macrófagos (figura 3).



**Figura 3.** Interacción propuesta de las MSC con las células inmunitarias del huésped. Tomada y adaptada de Weiss et al., 2019. (35)

En el caso de monocitos/macrófagos, la vía propuesta de antiinflamación mediada por MSC a través de la fagocitosis de MSC, propuesta por de Witte et al. (36) y Braza et al. (37), consiste en primero la administración de las MSC, las cuales son atrapadas en el sistema capilar de los pulmones donde son fagocitadas por monocitos/macrófagos clásicos. Esto cambia la naturaleza de los monocitos/macrófagos a un fenotipo inmuno regulador, generando una redistribución sistémica de monocitos/macrófagos inmuno-reguladores.

La infusión sistémica de las MSC se ha utilizado con éxito para mejorar una variedad de trastornos inmunitarios, incluida la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), enfermedades neurodegenerativas, mejora del injerto de células madre hematopoyéticas, LES, lesión tisular, diabetes, artritis reumatoide, autoinmunidad, pulmón, enfermedades del hígado y del corazón, enfermedad inflamatoria intestinal, sepsis y esclerosis sistémica (38).

**Tabla 2.** Resumen de los mecanismos de acción de las MSC. Información obtenida de Saeedi et al., 2019. (38)

<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Descripción</b>
Migración (homing)	“Homing” corresponde al proceso de migración selectiva de las MSC hacia el lugar de la lesión, junto con la entrega sostenida de señales tróficas.
Reparación y regeneración de tejido	La capacidad de las MSC de diferenciarse en varios linajes celulares, su capacidad de migración a tejidos dañados, angiogénesis, actividad anti apoptótica y su capacidad de secretar factores solubles bioactivos ayudan en el proceso de reparación y regeneración de tejido.
Inmunomodulación	Varias citocinas y factores reguladores se atribuyen a la característica inmunomoduladora de las MSC.
Efectos antiinflamatorios	Una reducción general de la inflamación tanto local como sistémica se lleva a cabo mediante una disminución equilibrada de las citocinas proinflamatorias y un aumento de las citocinas antiinflamatorias.
Actividad anti apoptótica	Las MSC pueden proteger las células lesionadas y preservar la función de los órganos al inhibir la muerte celular programada a través de la señalización paracrina. Los mediadores secretados por las MSC incluyen SDF-1, IGF-1, Nrf2, HIF, HO-1 y VEGF regulan negativamente las proteínas pro-apoptóticas.
Neoangiogénesis	Las MSC pueden promover la neovascularización en tejidos lesionados mediante la expresión de citocinas angiogénicas como VEGF, FGF1, 2, HGF, Ang-1, 2 y SDF-1.
Activación de células madre residentes	Los factores de crecimiento secretados por las MSC pueden estar implicados en la movilización de poblaciones de células madre residentes. Las MSC secretaron VEGF, HGF e IGF-1 para estimular la población endógena de la proliferación de células madre a través de interacciones paracrinas complejas y de célula a célula.
Efectos antimicrobiales	Las MSC están equipadas con un mecanismo intrínseco de destrucción de bacterias al secretar péptidos antimicrobianos como LL-37 y Lipocalin-2 en respuesta a la estimulación por patógenos.

#### 5.4 Células madre de la médula ósea

La médula ósea es un órgano dinámico compuesto por células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés “*Hematopoietic Stem Cells*”) y las MSC. Estas células, en asociación con la matriz extracelular, organizan un microambiente especializado que regula la formación de células hematopoyéticas maduras y su correcto funcionamiento (39).

Las MSC en la médula ósea, cumplen un rol fundamental apoyando la hematopoyesis. Estas dan lugar a varios linajes celulares; condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, miocitos y células endoteliales. Los osteoblastos desempeñan un papel importante en la construcción de nichos osteoblásticos/endóseos. Estos nichos osteoblásticos mantienen a las HSC en su fase quiescente. Junto con los osteoblastos, los osteoclastos (que derivan de células hematopoyéticas de la línea monocito-macrofago) tienen un papel vital en la remodelación ósea y la estructura del nicho (40).

Entonces, la función principal de las MSC es el apoyo, el mantenimiento y la regulación de las propiedades de las HSC. La interacción entre estos dos tipos de células da como resultado la prevención de la diferenciación de las HSC y la protección de la apoptosis, lo que promueve la autorrenovación y el mantenimiento de sus características. Sin embargo, en muchas neoplasias hematológicas, las MSC están desreguladas y pueden crear un microambiente inhibitorio capaz de inducir el inicio y/o progresión de la enfermedad (39).

Las MSC secretan factores solubles, incluidas las vesículas extracelulares (VE), que pueden influir en el microambiente de la médula ósea a través de mecanismos paracrinos. La secreción de VE de las MSC (MSC-VE) está influenciada por estímulos inflamatorios, estrés, altos niveles de calcio intracelular y pH ácido tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (41). En la hematopoyesis normal, las MSC-VE pueden contribuir a la activación de las HSC en estado quiescente después de diferentes estímulos como hemorragia, cambios en la concentración de oxígeno, quimioterapia e irradiación (42) permitiendo la movilización de las HSC hacia la sangre periférica.

En una neoplasia hematológica, como en el mieloma múltiple (MM), se ha demostrado que las MSC-VE de donantes sanos inhiben el crecimiento de células MM, mientras que sus homólogos de pacientes con MM promueven el crecimiento tumoral. Las MSC-VE de pacientes con MM expresan niveles altos de IL6, CCL2 y fibronectina y niveles bajos del supresor de tumores mir15a, que es capaz de inhibir el crecimiento de células en el MM pero también de inducir apoptosis, manteniendo la enfermedad en un estado estable (43).

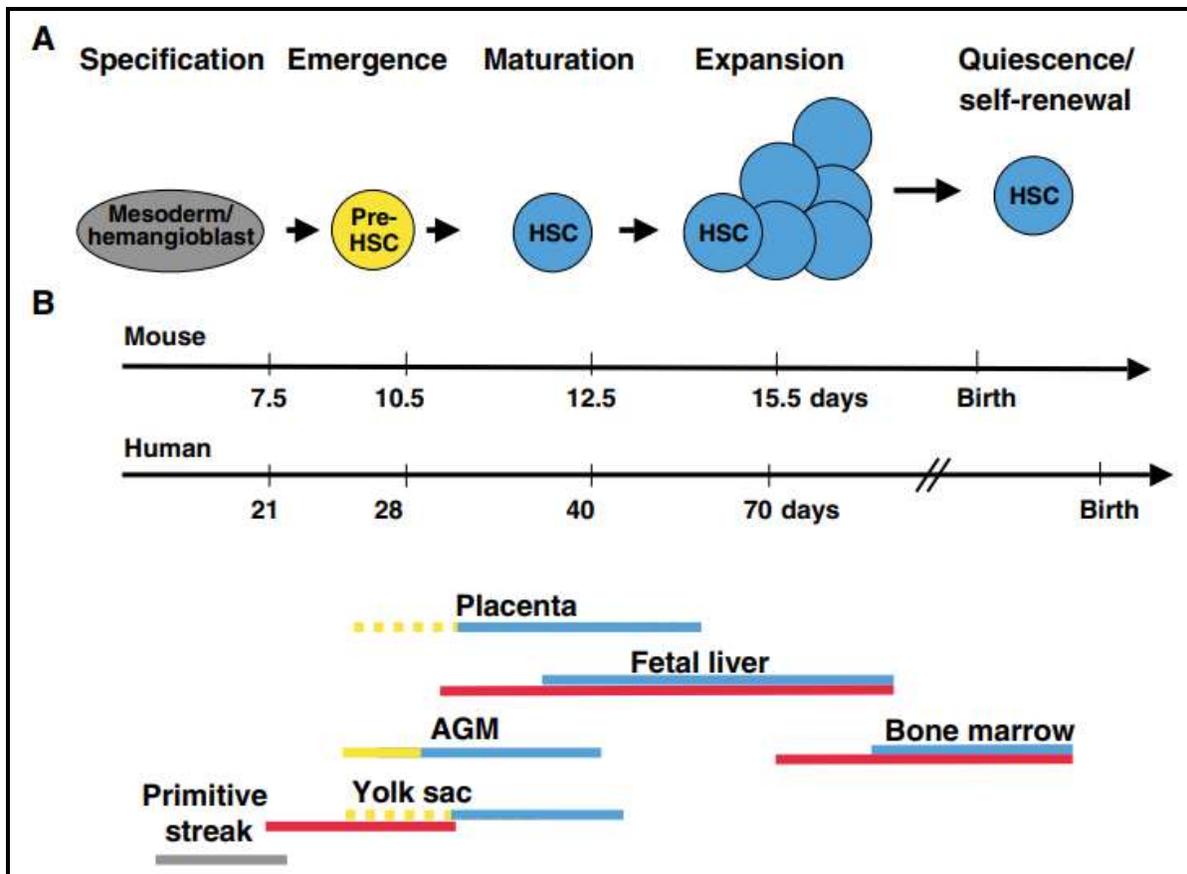
Más allá de las funciones potenciales en la fisiología y fisiopatología de la hematopoyesis, varios estudios también han investigado el uso de las MSC-EV como posibles alternativas a las MSC para mejorar tanto la expansión como el injerto de las HSC y para prevenir la enfermedad de injerto contra huésped después del trasplante de células madre hematopoyéticas (39).

### 5.4.1 Células madre hematopoyéticas

El sistema hematopoyético se compone de células especializadas incluyendo los glóbulos rojos que transportan oxígeno, megacariocitos productores de plaquetas, y células inmunitarias innatas y adaptativas que luchan contra patógenos (incluidos monocitos, neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B). La hematopoyesis (formación de sangre), a partir de células madre y progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea (y otros órganos hematopoyéticos, por ejemplo, el bazo), es esencial para mantener las funciones de la sangre y del sistema inmunológico (44).

El tipo de célula hematopoyética más primitiva son las HSC que pueden regenerar todos los linajes de la sangre adulta y del sistema inmunológico a largo plazo después del trasplante mediante una combinación de autorrenovación y diferenciación multipotente (45). En cuanto al origen de las HSC, durante la embriogénesis, el pool original de HSC es formado en un proceso de desarrollo complejo que involucra varios sitios (el saco vitelino, la región aortagónada-mesonefros, la placenta y el hígado fetal), después de lo cual las HSC colonizan la médula ósea al nacer (figura 4). Durante la vida posnatal, se establece un estado estable en el que el tamaño del grupo de HSC se mantiene mediante la regulación de la autorrenovación y diferenciación de las HSC (46).

Considerando que la sangre tiene una alta tasa de “rotación”, se estima que cada segundo se produce  $1 \times 10^6$  células sanguíneas en un organismo humano (47), para mantener este sistema de producción dinámica de sangre las HSC poseen mecanismos evolutivamente conservados para responder rápidamente a las demandas del organismo y protegerse del estrés ambiental, como el estrés oxidativo (48).



**Figura 4.** Establecimiento de grupos definitivos de células madre hematopoyéticas (HSC) en embriones de ratón y humanos. **(A)** El desarrollo hematopoyético comienza, como se especifica, del mesodermo de la estría primitiva (gris) en destinos hematopoyéticos y vasculares. Las HSC nacientes se someten a un proceso de maduración (azul) que les permite injertarse, sobrevivir y autorrenovarse en futuros nichos hematopoyéticos. Posteriormente, las HSC fetales se expanden rápidamente, después de lo cual se establece un estado estable en el que las HSC residen en un estado relativamente inactivo en la médula ósea. **(B)** Las edades en las que los sitios hematopoyéticos humanos y de ratón están activos. Barras grises, mesodermo; barras rojas, diferenciación hematopoyética activa; barras amarillas, génesis de HSC; barras azules, presencia de HSC funcionales de tipo adulto. Las barras amarillas rotas para el saco vitelino y la placenta indican que la génesis de HSC *de novo* no ha sido probada experimentalmente. AGM, Aorta-Gonada-Mesonefros. Extraído y adaptado de Mikkola et al., 2006. (46)

Entonces, si bien las HSC adultas están en gran parte latentes (quiescentes) en condiciones de estado estable, las HSC se activan y entran en el ciclo celular después de una lesión, estrés o trasplante, para reestablecer la homeostasis del sistema sanguíneo. Por lo que tendremos HSC latentes y cíclicas, y estas tienen distintas actividades metabólicas (49).

Las HSC latentes tienen baja actividad metabólica, considerando que su nicho dentro de la médula ósea es hipóxico, obtienen energía principalmente a través de glucólisis. Además, pueden recibir nutrientes de su entorno extracelular, reciclar proteínas citoplasmáticas y orgánulos a través de la autofagia. La autofagia juega un papel importante en la inactividad de las HSC, con la pérdida de la autofagia que resulta en un estado metabólico activado, se inhibe la autorrenovación y se promueve la diferenciación. Por otro lado, las HSC cíclicas tienen una alta actividad metabólica, que por el contrario realizan fosforilación oxidativa que se relaciona con la proliferación celular (49).

Para definir la relación de linaje entre las HSC y sus progenies, se propuso la jerarquía hematopoyética como una ruta ramificada en forma de árbol que describía el proceso de diferenciación de las HSC a los diferentes tipos de células sanguíneas. Como se indica en esta ruta, la diferenciación de HSC se produce a través de un proceso escalonado desde progenitores multipotente, a oligopotentes, a unipotentes y finalmente a la producción de células sanguíneas maduras (50).

Pero antes de hacer referencia al proceso de diferenciación de las HSC, en los últimos años, con el desarrollo de nuevas tecnologías, como los enfoques ómicos de resolución unicelular, estudios recientes *in vitro* e *in vivo* han sugerido que la heterogeneidad es una característica común de las HSC y sus progenies. Anteriormente, las HSC purificadas se consideraban homogéneas porque estas células comparten marcadores idénticos en la superficie celular, y funcionalmente, también se consideró que cada célula de esta población homogénea poseía idéntica capacidad de diferenciación (51).

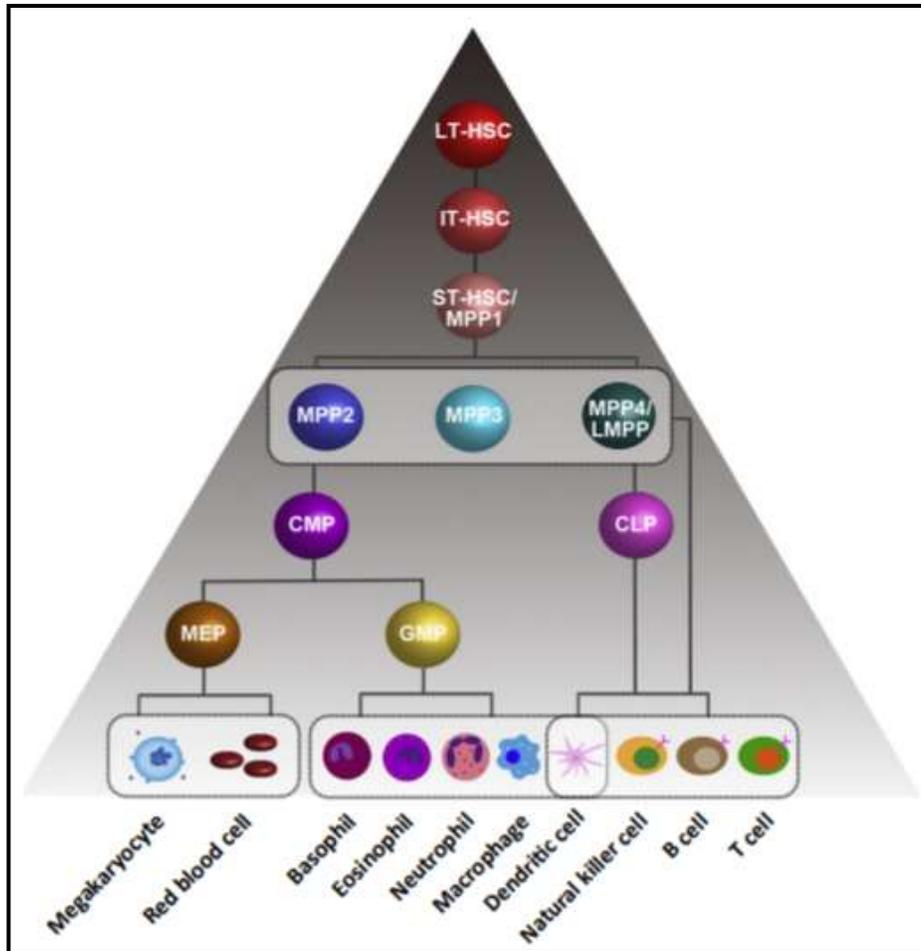
Con el análisis de perfil ómico unicelular, se revelan nuevos conocimientos sobre la hematopoyesis, especialmente al revelar la heterogeneidad de las HSC. Esta heterogeneidad de las HSC se refleja en el hecho de que cada HSC individual es diferente en términos de firma molecular, destino celular y resultado funcional. Este descubrimiento es suficiente para remodelar la comprensión del complejo proceso de diferenciación (52).

El análisis ómico unicelular consiste principalmente en la epigenómica y la transcriptómica, que pueden revelar información epigenética y el estado transcripcional en la resolución de una sola célula. Estas estrategias ahora se utilizan ampliamente para predecir la identidad celular, mapear el atlas celular, descubrir la heterogeneidad de una célula a otra y, en consecuencia, reconstruir el mapa de diferenciación (53, 54, 55, 56).

Actualmente las HSC se pueden clasificar en tres subpoblaciones. Primero están las HSC a largo plazo o LT-HSC (LT, siglas del inglés “*long term*”), estas son una población rara de HSC de médula ósea y poseen una capacidad de reconstitución permanente en receptores irradiados letalmente. En estado estacionario, las LT-HSC son quiescentes. Sin embargo, una vez expuestas a un estímulo de estrés, estas células se reactivan y entran en el ciclo celular. Luego las HSC de plazo intermedio o IT-HSC (IT, siglas del inglés “*intermediate term*”) se definieron por su capacidad de autorrenovación que se encuentra entre la de las ST-HSC y las LT-HSC, por lo que actúan como una población celular transitoria (57)

La tercera subpoblación son las ST-HSC (ST, siglas del inglés “*short term*”) que poseen la capacidad de reconstitución a corto plazo (8-12 semanas desde el trasplante) y pueden restaurar rápidamente el sistema hematopoyético después del trasplante. Además, las ST-HSC se diferencian en progenitores multipotentes (MPP), que tienen una mayor frecuencia de progresión del ciclo celular y una actividad de diferenciación más robusta, pero sin capacidad de autorrenovación detectable, en comparación con las HSC (57).

La población de MPP se puede resolver en MPP1, MPP2, MPP3 y MPP4. Estas subpoblaciones se diferencian en: su inmunofenotipo, abundancia en la médula ósea, estado del ciclo celular y capacidad de diferenciación. Las MPP1 tienen actividad similar a las ST-HSC (multipotente). Las células MPP2 y MPP3 dan lugar principalmente a progenitores mieloides comunes (CMP), mientras que las células MPP4/LMPP generan predominantemente linajes linfoides (figura 5).



**Figura 5.** Mapa de ruta revisada de la jerarquía hematopoyética. Abreviaturas: CLP, progenitor linfoide común; CMP, progenitor mieloide común; GMP, progenitor de granulocitos/macrófagos; IT-HSC, célula madre hematopoyética de término intermedio; LMPP, progenitor multipotente cebado por linfoides; LT-HSC, célula madre hematopoyética a largo plazo; MEP, progenitor de megacariocitos/eritrocitos; MPP, progenitor multipotente; ST-HSC, célula madre hematopoyética a corto plazo. Extraído y adaptado de Zhang et al., 2018. (57)

Los mecanismos relacionados a las HSC no difieren mucho de los de las MSC (como el “homing”, reparación y regeneración de tejidos, inmunomodulación, entre otros) pero se debe entender el proceso en el cual son liberadas a la circulación desde la medula ósea para cumplir sus funciones. Se cree que las HSC residen en dos nichos distintos en la medula ósea: el endóseo (superficie interna del hueso) y el sinusoidal (porción central vascularizada de la medula ósea). El anclaje de las HSC a la medula ósea está mediado por dos vías: VCAM1 y CXCR4; CXCL12 (58). Y a pesar de las señales continuas de retención, aproximadamente el 1% de las HSC ingresan a la circulación sanguínea todos los días (59).

Primero, los osteoblastos en el nicho endóseo producen una señal de retención de HSC (SDF-1) que, junto con el ambiente hipóxico del nicho, promueve el mantenimiento de HSC primitivas inactivas a largo plazo capaces de autorrenovación ilimitada (60). La salida del estado de reposo se acompaña de la migración de las HSC proliferativas hacia el nicho sinusoidal. Este nicho contiene endotelio vascular, células reticulares y megacariocitos, y proporciona un acceso más inmediato a la circulación sanguínea, así como un ambiente rico en oxígeno que favorece la proliferación/diferenciación de las HSC (61).

Los mecanismos subyacentes al tráfico de las HSC desde la circulación a los tejidos periféricos no mieloides aún no se comprenden completamente, pero está claro que las HSC (que van desde las células madre más primitivas hasta los progenitores comprometidos con el linaje) se encuentran en el hígado, los pulmones, el intestino y los riñones, y también está bien establecido que el daño tisular facilita la localización de las células madre hematopoyéticas en el lugar de la lesión (58).

## **5.5 Recolección y procesamiento de HSC para su uso en medicina regenerativa**

En medicina regenerativa, el trasplante de HSC representa una terapia curativa frente a múltiples enfermedades malignas y no malignas. Pero, primero que todo, la investigación sobre el uso de HSC en medicina regenerativa se afianzó en la década de 1950 con la demostración de que las células de la médula ósea inyectadas por vía intravenosa pueden rescatar a los ratones irradiados de la letalidad al restablecer la producción de células sanguíneas (62).

El objetivo del trasplante de HSC consiste en restituir a un paciente un sistema hematopoyético sano. Por lo general, esto se logra recolectando HSC alogénicas sanas, de un donante compatible con inmunidad adecuada y trasplantándolas al receptor, previo acondicionamiento de su médula ósea destruyendo la hematopoyesis endógena (con radiación y/o quimioterapia). El injerto exitoso de las células madre hematopoyéticas del donante conduce a la reconstitución del sistema hematopoyético a largo plazo y es clave para la capacidad curativa del trasplante de HSC (63).

También existe el trasplante de HSC autólogo, que implica el uso de las propias células madre hematopoyéticas del paciente y se utiliza clínicamente, en casos como tratamientos con altas dosis de radiación/quimioterapia para cáncer sólido, donde la terapia causa insuficiencia de la médula ósea. El trasplante de HSC autólogo se ha utilizado también en el contexto de la terapia génica, para tratar determinadas enfermedades congénitas de la sangre, como las inmunodeficiencias primarias, en las que se recogen las células madre hematopoyéticas del paciente, se "corrigen" transfiriendo los genes faltantes mediante transducción retroviral o lentiviral y luego se devuelven al paciente (63).

### 5.5.1 Recolección de HSC

Las HSC para uso clínico pueden ser recolectadas ya sea de la médula, de la sangre periférica después de la movilización o recolectada desde el cordón umbilical al nacer, y estas varían en las características celulares y la aplicación clínica (tabla 3). Los pacientes sometidos a recolección de HSC para un futuro trasplante autólogo son evaluados por su aptitud médica y capacidad para tolerar la extracción de médula ósea o el tratamiento de movilización. Los donantes alogénicos, una vez seleccionados, también requieren evaluaciones para garantizar la seguridad del proceso de donación para ellos, además de una evaluación para minimizar el riesgo de transmisión de agentes de enfermedades infecciosas (64).

El trasplante de HSC (HSCT, del inglés “*Hematopoietic Stem Cells Transplantation*”) comienza con un régimen de acondicionamiento para extirpar total o parcialmente la médula ósea del receptor, creando espacio para que las HSC se injerten y comiencen a producir todos los linajes de células sanguíneas. Por otro lado, la movilización es el proceso mediante el cual una gran cantidad de HSC se mueven desde la médula ósea hacia la sangre periférica (quimioterapia y factor estimulante de colonias de granulocitos como agentes movilizadores), lo que facilita la recolección de células madre de sangre periférica (65).

Entre los marcadores de HSC, CD34 es bien conocido por su expresión única en estas células. Por esta razón, se utiliza para enriquecer la médula ósea del donante con HSC antes del trasplante. Varios estudios que utilizan ratones knockout para CD34 indican que CD34 aumenta el tráfico y la migración de células hematopoyéticas; sin embargo, el mecanismo preciso aún no se comprende completamente (66).

Por su parte, la extracción de médula es un procedimiento quirúrgico invasivo que se realiza en condiciones estériles y, por lo general, bajo anestesia general. Debido al procedimiento necesario para obtener HSC desde la médula ósea, el donante además de someterse a exámenes de detección de anticuerpos, pruebas de enfermedades infecciosas y pruebas de compatibilidad HLA, también deben estar físicamente aptos para la donación y ser capaces de tolerar el tipo de anestesia necesaria para realizar la recolección con éxito (64).

Con respecto al proceso, se recomienda extraer como máximo 20 ml de médula ósea por kilogramo de peso del donante, y se ha documentado una mediana de volumen de recolección de 1040 ml (67). Luego de aplicada la anestesia, el donante se coloca en posición decúbito prono y las crestas ilíacas posteriores se preparan asépticamente y se cubren con barreras estériles. Se inserta una aguja de gran calibre con una jeringa adjunta enjuagada con anticoagulante en cada cresta ilíaca posterior y se aspiran aproximadamente 5 ml de médula (proceso repetido en diferentes sitios óseos hasta alcanzar el límite máximo de volumen seguro de donantes) (64).

La médula aspirada luego se recoge en una bolsa de recolección grande que contiene anticoagulante de heparina mezclado con anticoagulante ácido-citrato-dextrosa fórmula A (ACD-A), medio de cultivo de tejidos o tampón fisiológico (64). Los riesgos de la extracción de médula ósea incluyen reacciones a la anestesia, sangrado, transfusión, infección, dolor posoperatorio y daño muscular o nervioso (65).

La recolección de HSC desde la sangre periférica requiere la movilización previa utilizando agentes como G-CSF (también conocido como filgrastim) y/o plerixafor, previamente también se usaba la quimioterapia. El G-CSF (siglas del inglés “*granulocyte colony stimulating factor*”) es una citoquina que funciona como un agente de movilización bien estudiado y de uso común (68).

Esta citoquina activa la elastasa de neutrófilos y la catepsina G para escindir las moléculas de adhesión en la médula ósea, como la molécula de adhesión de células vasculares-1 y CXCR4, el receptor SDF-1 (siglas del inglés “*stromal cell-derived factor 1*”) en HSC, con lo cual las libera de la médula para moverse hacia el torrente sanguíneo (el mecanismo es probablemente más complejo y se postulan teorías adicionales). Entre los donantes alogénicos, la concentración de células CD34 + en la sangre periférica generalmente aumenta de 50 a 100 veces hasta un promedio de 84-119 células CD34 +/ $\mu$ L (65).

Al usar G-CSF por sí solo, se ha registrado que la mayoría de los donantes alogénicos movilizan HSC adecuadas, pero hay un número significativo de pacientes que no lo hacen, por lo que presenta la necesidad de otros agentes de movilización, tal como el plerixafor. Este compuesto de biciclám, actúa bloqueando CXCR4 produciendo un aumento medio de 7 veces en las células CD34 + circulantes en 4-6 horas por sí solo, y cuando se combina con G-CSF, el efecto de movilización es sinérgico (65).

El G-CSF se administra durante 4 a 5 días consecutivos en dosis de 5 a 15  $\mu$ g/kg/día y plerixafor se puede administrar al final de un ciclo de 4 a 5 días de G-CSF como una dosis única a 240  $\mu$ g/kg 4 a 6 horas antes de la recolección de aféresis. La administración de plerixafor dependerá del monitoreo de los recuentos de células CD34 + periféricas para administrar la dosis a demanda (68).

La quimioterapia, como estrategia de movilización aislada, ya no se usa ampliamente. Primero, solo es aplicable para colecciones autólogas; los efectos adversos inmediatos y a largo plazo la hacen inadecuada para donantes alogénicos. En segundo lugar, la quimioterapia no moviliza de manera confiable suficientes HSC para el trasplante, por lo que el uso de G-CSF solo o en combinación con otros agentes es una práctica estándar (65).

En cuanto al procedimiento de recolección de HSC a partir de sangre periférica, la mayoría de los centros limitan la recolección de aféresis al procesamiento de un máximo de 24 litros de sangre total durante 1 a 2 días. Lo importante es que se alcance el número objetivo de células CD34+ (siendo el mínimo de  $2 \times 10^6$  células CD34+/kg) (64).

La bolsa de recolección contiene ACD-A solo o combinado con heparina. Las desventajas del procedimiento se relacionan con: toxicidades asociadas a los agentes movilizadores y se manifiestan con dolor óseo, insomnio, síntomas similares a la gripe, y por la aféresis de recolección, donde se puede presentar toxicidad por el citrato, que se manifiesta en hipocalcemia y sangrado en el sitio del catéter venoso central (68).

Para la recolección de HSC de sangre de cordón umbilical, se puede recolectar antes del parto desde la placenta (en el útero) o después del alumbramiento de la placenta (ex útero), siendo la recolección en útero la más común. La sangre de cordón se recolecta a través de la canulación de la vena umbilical y permitiendo que la sangre placentaria escurra por gravedad en recipientes de recolección a los que se les ha agregado anticoagulante CPD (citrato-fosfato-dextrosa). El volumen recogido suele oscilar entre 50 y 200 ml (64).

El contenido de células CD34 + es menor en la recolección de sangre del cordón umbilical y más alto en concentrados de sangre periférica movilizados. Las 3 fuentes contienen células T que pueden inducir la EICH cuando se utilizan para un alotrasplante, siendo en los concentrados de sangre periférica el número más alto de células T. Dadas estas características, la compatibilidad de HLA es menos restrictiva para los trasplantes de sangre de cordón, siendo las tasas de EICH aguda y crónica las más bajas de las 3 fuentes de HSC. Sin embargo, las HSC de la sangre del cordón umbilical también muestran un injerto más lento debido al bajo número de CD34 + (tabla 3).

### **5.5.2 Procesamiento de HSC**

El producto de HSC obtenido debe ser testado y caracterizado para asegurar su seguridad, pureza y potencia. Las pruebas comúnmente usadas para realizar control de calidad son el recuento total de células nucleadas o TNC, viabilidad celular, recuento y viabilidad de células CD34+, prueba de esterilidad, y para productos alogénicos, contenido de células T. Algunos laboratorios incluyen un ensayo de formación de colonias, considerado como el “gold-standard” para medir la potencia progenitora del producto (64).

El procesamiento se refiere a todos los aspectos de la manipulación, criopreservación, envasado y etiquetado de productos de terapia celular, para garantizar la potencia y pureza del producto para trasplante y/o almacenamiento. Después de la recolección, los productos de HSC se transfieren desde la sala de operaciones o el centro de aféresis a la instalación de procesamiento, ya sea a temperatura ambiente o de 2 a 8 ° C, según el tipo de producto y la duración prevista de transporte y almacenamiento (64).

**Tabla 3.** Fuentes de HSC y sus características. Extraído y adaptado de Sandhya et al., 2017. (68)

	Sangre periférica	Médula ósea	Sangre de cordón
<b>Características del donante</b>			
Tipo de donante de trasplante	Donante haploidéntico, donante hermano compatible, donante no emparentado compatible	Donante haploidéntico, donante hermano compatible, donante no emparentado compatible	Donante no emparentado compatible
Riesgos en la recolección	Eventos adversos graves relacionados con aféresis ~ 1/1000	Riesgo quirúrgico (eventos adversos graves) ~ 1/100	Ausente después de la entrega / no reportado
<b>Características del injerto</b>			
Contenido relativo de CD34	50x	10x	1x
Contenido relativo de células T	100x	10x	1x (células T vírgenes)
Dosis celular mínima para el injerto	Autólogas: $2 \times 10^6$ células CD34+/kg Alogénico: $4 \times 10^6$ células CD34+/kg	Lo mismo que para los injertos de sangre periférica	Cordón único: $2,5 \times 10^7$ CNT/kg. Cordón doble: $1,7 \times 10^7$ CNT/kg/unidad de cordón
Volumen de recolección	~300 mL	~1000 mL	~100 mL
Criterios de coincidencia de HLA	6/6 (donante hermano compatible) 7/8 (donante haploidéntico) 8/8-12/12 (donante no emparentado compatible)	Similar a los criterios para sangre periférica	4-6/6
<b>Características del receptor</b>			
Tipo de enfermedad	Fuente preferida para enfermedad maligna	Fuente preferida para enfermedad no maligna	Usada para cualquiera
Velocidad de injerto	Más rápida	Moderada	Más lenta
Efecto antitumoral	Más alto	Más bajo	Más alto
Riesgo agudo / crónico de EICH	Más alto	Moderado	Más bajo

CNT indica células nucleadas totales; EICH, enfermedad de injerto contra huésped. Los criterios de compatibilidad de HLA varían según el tipo de donante. La compatibilidad de sangre del cordón requiere tipificación HLA Clase I de resolución baja-intermedia y una resolución más alta para tipificación Clase II (DRB1).

El procesamiento basado en centrifugado se usa comúnmente para la reducción de glóbulos rojos y plasma (que puede ser necesario para prevenir la hemólisis en aloinjertos con incompatibilidad ABO). La reducción de glóbulos rojos con productos de HSC emplea agentes de sedimentación como almidón de hidroxietilo y centrifugación para sedimentar los glóbulos rojos, o colgar las bolsas permite la sedimentación por gravedad. El procedimiento debe sopesarse frente a la posible pérdida de número y viabilidad de HSC, y también al aumento del riesgo de contaminación durante la manipulación (64).

Las HSC frescas, una vez recolectadas, solo son viables durante 48 a 72 horas, lo que limita su alcance geográfico. La criopreservación de las HSC permite extender el alcance y viabilidad, así como realizar pruebas y controles de calidad más rigurosos mejorando la seguridad de la terapia con HSC. Para esto se utilizan soluciones con aditivos llamados crioprotectores, que ayudan a las células a sobrevivir al estrés de la congelación y descongelación (69).

El dimetilsulfóxido (DMSO) es el crioprotector más utilizado para la criopreservación celular de las HSC (69). Las simulaciones de dinámica molecular sugieren que el mecanismo de acción del DMSO es la formación de poros transitorios, lo que genera una mejora significativa en la permeabilidad de las membranas a las moléculas hidrófilas, potenciando su actividad crioprotectora (70).

Posterior a la criopreservación, las HSC son descongeladas en el momento y lugar donde se realizará la transfusión, debido a que es necesario minimizar el tiempo en el que las HSC son expuestas al DMSO, previo a la transfusión (64). La toxicidad del DMSO resulta en un amplio rango de efectos adversos (va desde eventos leves como náuseas y vómitos, hasta paro cardíaco, dificultad respiratoria o convulsiones epilépticas) (71).

Algunos protocolos señalan un lavado de las HSC post descongelación para eliminar glóbulos rojos lisados, la hemoglobina y el DMSO, pero esto no se realiza de forma rutinaria porque parte de las HSC obtenidas se puede perder con la manipulación. Algunos laboratorios realizan dos pasos de centrifugación, eliminando el sobrenadante del primer centrifugado y centrifugando esa porción por segunda vez antes de combinar los dos sedimentos celulares; esto optimiza la recuperación celular (64).

Hay procesos especializados que permiten optimizar la pureza y potencia de mejor manera. Estos métodos comprenden la elutriación centrífuga a contraflujo, sistemas de selección de celular y expansión celular. Este último método es utilizado ampliamente en productos de HSC recolectados de cordón umbilical, en donde el objetivo es incrementar el contenido de HSC y mejorar la disponibilidad de unidades para trasplante (64).

La elutriación centrífuga a contraflujo consiste en la separación de las células en función del tamaño y la densidad, cambiando gradualmente el equilibrio de la velocidad del fluido hacia adentro, denominado "contraflujo" (que impulsa las células hacia el eje de rotación), y la fuerza centrífuga hacia afuera (que aleja las células del eje de rotación). Esto produce una gradación uniforme de las células, primero se eluyen las células más pequeñas y luego las más grandes, permitiendo separar células con tamaño y densidad específicos (72).

Los sistemas de selección celular funcionan como método de enriquecimiento *ex vivo* para reducir el contenido de células T efectoras del injerto, y brinda la oportunidad de utilizar un mayor número de HSC CD34+ sin aumentar la incidencia y/o la gravedad de la EICH, que es una de las principales complicaciones del trasplante alogénico de HSC. Los sistemas inmunomagnéticos de selección de células como CliniMACS (Miltenyi Biotec Bergisch) incorporan tecnologías basadas en anticuerpos monoclonales para elegir como blanco los antígenos de la superficie celular (73).

Para la selección de células CD34+, se mezcla con el producto de HSC, un reactivo con anticuerpos monoclonales CD34, marcados magnéticamente. Las células objetivo que son reconocidas por este anticuerpo son marcadas magnéticamente y retenidas a medida que la suspensión celular pasa a través de una columna en la que se genera el campo magnético, permitiendo separar las células CD34+ de las demás células. Al contrario, en el procedimiento de selección negativa, la población celular no deseada (principalmente CD3+/CD19+) es activamente removida del producto de HSC, y uno de sus principales beneficios es la posibilidad de retener poblaciones celulares como células natural killer que podrían proveer un efecto antitumoral (64).

## **5.6 Terapia celular basada en el uso de HSC**

El trasplante de HSC fue desarrollado inicialmente con el objetivo de rescatar la insuficiencia de medula ósea después de una alta dosis accidental de radiación (74). Actualmente hay una gran cantidad de estudios clínicos sobre terapias con HSC, principalmente con fines regenerativos, para tratar diversas enfermedades como: leucemias, linfomas, insuficiencia cardíaca, trastornos neurales, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, trastornos metabólicos o genéticos, entre otras (75).

La experiencia clínica acumulada a lo largo de los años sobre el trasplante de HSC ha proporcionado una plataforma para desarrollar procedimientos de ingeniería más complejos con el objetivo de corregir genéticamente los trastornos congénitos y adquiridos (76). La terapia celular, por definición, se refiere a utilizar células para regenerar la función de cierto tipo de células o tejidos que no funcionan o no lo hacen correctamente (77) lo cual se puede lograr a través de ingeniería genética como se revisó anteriormente.

Sobre la base de las propiedades de autorrenovación y multipotentes de las HSC primitivas, estas células raras de la médula ósea se consideraron un objetivo ideal para corregir defectos genéticos característicos de las enfermedades hematopoyéticas hereditarias. Como sabemos las HSC son responsables de la generación a largo plazo de linfocitos T y B de sangre periférica, células natural killer, monocitos, granulocitos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, eritrocitos y plaquetas. Por tanto, cualquier enfermedad monogénica asociada a defectos en las células sanguíneas podría potencialmente tratarse mediante la corrección genética de las HSC.

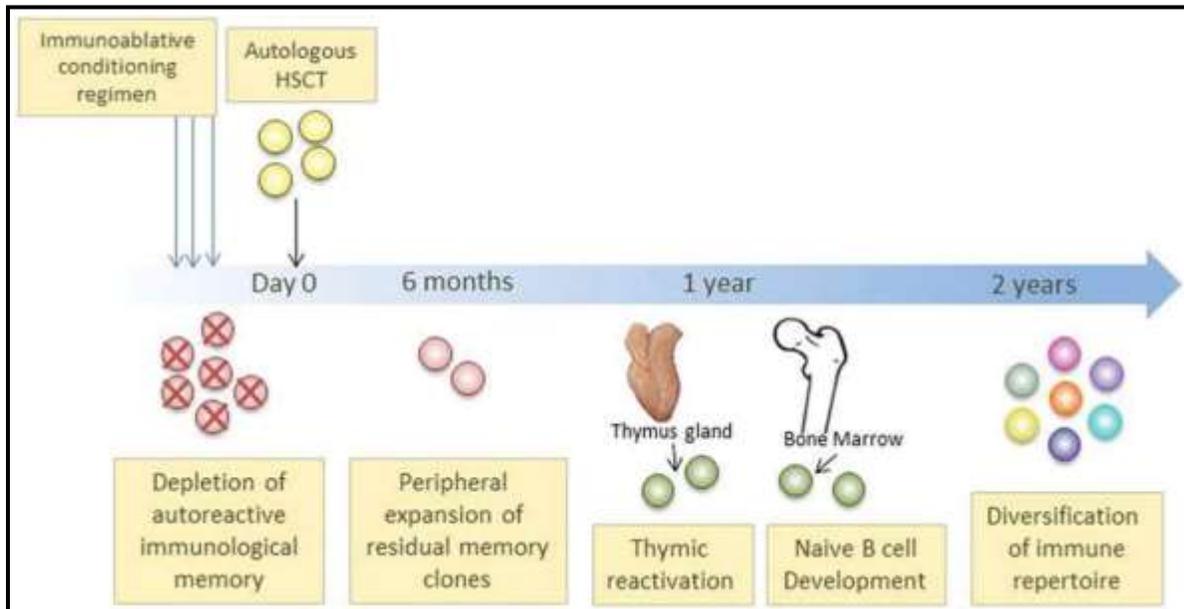
Antes de aplicar una terapia celular se deben abordar los siguientes desafíos: 1) explicar y controlar los mecanismos de diferenciación y desarrollo hacia un tipo celular específico necesario para tratar la enfermedad, 2) obtener un número suficiente del tipo celular deseado para el trasplante, 3) superar el rechazo inmunológico y 4) demostrar que las células trasplantadas cumplen sus funciones normales *in vivo* después de los trasplantes (71). A continuación, se presentan algunas enfermedades en las que esta terapia se emplea con resultados comprobados (tabla 5).

### 5.6.1 Enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes (EA) se han convertido en un campo importante para el desarrollo del trasplante de HSC. Actualmente, de acuerdo con la Sociedad Europea de Trasplante de Sangre y Médula (EBMT), las indicaciones de trasplante para enfermedades autoinmunes tienen un total de 2809 casos registrados. De los casos registrados, 1415 corresponden a casos de esclerosis múltiple, 771 a enfermedades del tejido conectivo, 190 a artritis reumatoide, 200 a enfermedad inflamatoria intestinal, 56 a enfermedades hematológicas, 48 a vasculitis, 109 a enfermedades neurológicas autoinmunes y 20 a diabetes insulino dependiente (78).

Las EA se caracterizan por una activación aberrante del sistema inmunológico, lo que conduce a la incapacidad de controlar la autorreactividad y mantener la tolerancia. La razón fundamental detrás del uso del enfoque basado en HSC, por ejemplo, en diabetes insulino dependiente, radica en sus propiedades inmunorreguladoras, que pueden facilitar la recuperación de la tolerancia periférica hacia las células  $\beta$  pancreáticas y prevenir la infiltración de células T en los órganos diana (79).

El trasplante autólogo de HSC en EAs se trata de un procedimiento intensivo "único", que típicamente combina quimioterapia citotóxica de dosis alta con seroterapia de depleción linfocítica (más comúnmente globulina antitimocítica, ATG) seguida de la infusión de HSC con el objetivo de una amplia inmunoblación, proporcionando una rápida "reducción" inicial de la carga inflamatoria, seguido de la regeneración de los sistemas inmunológico y hematopoyético (figura 6).



**Figura 6.** Representación esquemática del proceso de trasplante autólogo de HSC y reconstitución inmune postrasplante en enfermedades autoinmunes. Extraído y adaptado de Snowden et al., 2019. (78)

La ATG es un anticuerpo policlonal que sirve para acondicionar el sistema inmune previo al HSCT. Sus efectos son: la depleción de células T en sangre y tejidos linfoides periféricos a través de lisis dependiente del complemento; modulación de moléculas clave de la superficie celular que median las interacciones leucocitos/endotelio; inducción de apoptosis en linajes de células B; interferencia con las propiedades funcionales de las células dendríticas; e inducción de células T reguladoras y T natural killer (80).

Entonces, la terapia de reconstitución inmune a partir del HSCT autólogo ejerce sus efectos a través de: 1) eliminación de poblaciones de linfocitos (81, 82), 2) inducción de un estado linfopénico (82, 83) y 3) desarrollo posterior de un sistema inmunológico tolerante que carece de la expansión clonal de células T y B funcionalmente patógenas (83, 84).

En el estudio de Cull et al. (85), se vio que el HSCT después del acondicionamiento con ciclofosfamida/ATG en una cohorte de pacientes con esclerosis múltiple progresiva, da como resultado cambios significativos en los subconjuntos de linfocitos tras la reconstitución inmunitaria. En particular la ablación y la posterior recuperación de la producción tímica, tienen el potencial de restablecer el repertorio inmunológico de una respuesta autorreactiva a una más tolerante. Y esto es más probable que sea efectivo en las primeras etapas de la enfermedad.

Darlington et al. (86), en su estudio a una cohorte de pacientes con esclerosis múltiple agresiva, demostró que la capacidad disminuida de las células T periféricas para montar respuestas de IL-17, está asociada con la supresión dramática y sostenida de la actividad de la enfermedad después de la ablación inmune de alta intensidad y el HSCT autólogo en la esclerosis múltiple. Distintos métodos fueron utilizados, tales como citometría de flujo, prueba de círculo de escisión del receptor de células T, mediciones de citometría de flujo de CD31 + emigrantes tímicos recientes, y se realizaron ensayos funcionales para rastrear las respuestas de células T específicas de antígeno autorreactivo del sistema nervioso central y la capacidad relativa para generar respuestas de células T Th1, Th17 o Th1/17.

En su estudio, las respuestas Th1 de las células T reconstituidas (post-HSCT) parecían restaurarse a los niveles iniciales, el repertorio de células T desarrollado exhibió una capacidad significativamente disminuida para montar respuestas Th17, así como las respuestas doble positivas Th1/17. En este contexto, se ha demostrado que la IL-17 contribuye directamente a la interrupción de las uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y se descubrió que las células Th17 migran de manera muy eficiente a través de la barrera hematoencefálica, donde promueven un mayor reclutamiento de linfocitos CD4 + (86).

En otro estudio más reciente, probaron la hipótesis de que las células natural killer (NK) desempeñaban un papel regulador en la reconstitución del sistema inmunológico post-HSCT. Primero se demostró que las células NK se reconstituyen rápidamente después del HSCT autólogo, mientras que las células T CD4 + permanecieron por debajo del nivel basal durante hasta 21 meses. Las células NK se correlacionaron inversamente con el cambio en las células Th17, y el agotamiento de las células NK de las muestras de HSCT autólogo resultó en una mayor proporción de células Th17. Estos resultados indican que las células NK se reconstituyen rápidamente, posiblemente debido a la ablación incompleta o la presencia de células NK en el injerto y suprimen la reaparición de células Th17 (87).

Entonces cuando se trata la EA grave, el acondicionamiento previo del HSCT se dirige al sistema inmunológico y a las células autorreactivas dentro del sistema inmunológico. Un problema reportado de esta interacción con el sistema inmunológico adaptativo y la posibilidad de una predisposición genética para que un paciente desarrolle más de una EA es que puede hacer que los pacientes con EA primaria tengan un mayor riesgo de desarrollar una EA secundaria después del HSCT (88).

Con una mayor actividad de trasplante para pacientes con EA grave, se han notificado varios casos de EA secundaria. El diagnóstico primario de lupus eritematoso sistémico como indicación de HSCT apareció como un factor de riesgo significativo de EA secundaria tras un HSCT autólogo. De acuerdo al estudio de Daikeler et al. (88) los pacientes con esta enfermedad, de menor edad en el momento del HSCT o que reciben acondicionamiento de depleción de linfocitos T (ATG, alemtuzumab, selección de CD34 +) necesitan una estrecha vigilancia de la EA secundaria después del HSCT autólogo.

También en el estudio de Yanir et al. (89), realizado a una cohorte de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica se registran casos de EA después del HSCT. Se concluye que dadas las tasas más altas de EA después del trasplante, una dosis total más baja de alemtuzumab con una administración más temprana podría producir mejores resultados. No se confirma si la EA está relacionada con la enfermedad o el condicionamiento, por lo que realizar un seguimiento a largo plazo de los pacientes después del HSCT con una monitorización estrecha con análisis frecuentes de la población de linfocitos y una alta sospecha clínica de EA emergente es necesaria.

Con respecto a la terapia genética, se han demostrado en modelos animales los beneficios de inducir tolerancia a largo plazo mediante el HSCT con células “modificadas genéticamente” (90). En un estudio clínico de fase I / II, se demostró la supervivencia libre de progresión y la reversión de la discapacidad neurológica a los 3 años del trasplante de HSC autólogas en pacientes con esclerosis múltiple remitente recidivante (91). Como resultado, el HSCT se destaca por encima de otras inmunoterapias, dado su potencial para proporcionar tolerancia de por vida una vez que las HSC que poseen genes modificados se implantan con éxito en el huésped.

### **5.6.2 Inmunodeficiencias**

La mayoría de las inmunodeficiencias primarias (IDP) se deben a defectos genéticos intrínsecos a las células hematopoyéticas. Por lo tanto, la sustitución de células mutantes por HSC de donantes sanos representa un enfoque terapéutico racional. Los avances en la selección de donantes, la manipulación del injerto, el acondicionamiento y el tratamiento de las complicaciones significan que la supervivencia para muchas afecciones es ahora de alrededor del 90% (92).

El amplio espectro de fenotipos clínicos e inmunológicos asociados con las IDP dificulta la definición de un régimen de trasplante universal. Los puntos a tener en cuenta frente al HSCT son el trasplante temprano en el curso de la enfermedad, específicamente en las IDP es importante antes de que se produzcan complicaciones infecciosas e inflamatorias importantes, segundo es la manipulación del injerto (donante HLA compatible y la depleción de linfocitos T) y por último el monitoreo de complicaciones posteriores al trasplante con el fin de obtener mejores resultados de supervivencia (92).

En el estudio de Okamoto et al. (93), se analizaron los repertorios de receptores de células T secuencialmente en cuatro pacientes con inmunodeficiencia combinada grave antes y después del HSCT. Se observó que los repertorios de receptores de células T eran extremadamente anormales antes del HSCT mientras que después del trasplante hubo una mejora progresiva en la diversidad de receptores de células T. Estos resultados indican que la expansión temprana de la diversidad de receptores de células T puede reflejar la expansión transitoria de las células T maduras preexistentes de la sangre del donante, independientemente de la maduración de las células T *de novo* a través del timo.

La reconstitución de células T después del HSCT se produce a través de dos mecanismos distintos, la vía dependiente del timo y la independiente del timo. La vía de reconstitución de células T dependiente del timo generalmente requiere meses después del HSCT en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave porque el aumento de células T vírgenes requiere la normalización del tamaño y función del timo. Por el contrario, la vía independiente del timo depende sólo de la expansión transitoria de las células T maduras derivadas del donante (93).

En el estudio de Lewin et al. (94), las comparaciones entre los receptores de aloinjertos con células T empobrecidas y sin modificar demostraron un aumento más significativo en los niveles de círculos de escisión de reordenamiento del receptor de células T después de los aloinjertos sin modificar, pero solo en los primeros 9 meses después del trasplante. En una serie dominada por receptores adultos de aloinjertos con depleción de células T, la mayoría de los cuales también recibieron irradiación corporal total y ATG, se produjo neogénesis activa de células T. Los círculos de escisión de reordenamiento del receptor de células T recuperaron al menos los niveles apropiados para la edad en el segundo año después del trasplante.

Sabemos que la reducción de las células T tiene como objetivo reducir la morbilidad y la mortalidad asociadas con la EICH. Sin embargo, la recuperación inmunitaria retardada y el riesgo de fallo del injerto siguen siendo problemas potenciales. Alternativamente, un injerto haploidéntico no manipulado podría representar una opción en determinadas condiciones potencialmente mortales. Sin embargo, los enfoques de HSCT repletos de células T empleados hasta ahora tienen limitaciones no despreciables, ya que los datos preliminares muestran un control limitado de la alorreactividad en pacientes menores de 10 años (tabla 4).

La terapia génica se considera una buena alternativa para muchos de estos pacientes ya que la posibilidad de encontrar un donante compatible para pacientes con IDP grave es limitada, debido a la necesidad de realizar el trasplante durante los primeros meses de vida. Ensayos clínicos en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa han demostrado el beneficio de la terapia génica en las IDP, usando vectores gamma-retrovirales para facilitar la inserción del gen terapéutico en las células madre hematopoyéticas de los pacientes. Desafortunadamente, dos años después del inicio del ensayo, se observaron por primera vez eventos adversos graves que consistían en leucemias linfocíticas en dos pacientes debido a eventos de oncogénesis insercional (96).

**Tabla 4.** Estrategias, ventajas y desventajas del HSCT haploidéntico con depleción de células T y repletas de células T empleadas en enfermedades no malignas. Extraído y adaptado de Bertaina et al. (2017). (95)

	<b>Manipulación de injerto</b>	<b>Células infundidas</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>HSCT con depleción de células T</b>	Selección positiva de CD34+	HSC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfoque bien establecido</li> <li>• Riesgo insignificante de EICH</li> <li>• Sin necesidad de profilaxis postrasplante de EICH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperación retrasada de las células T</li> <li>• 6-8 semanas para obtener una recuperación madura de NK</li> <li>• Altas tasas de complicaciones infecciosas y TRM</li> </ul>
	Selección negativa de CD3+/CD19+	HSC, NK	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperación temprana de células NK</li> <li>• Bajo riesgo de enfermedad linfoproliferativa relacionada con el VEB postrasplante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor número de células T residuales en comparación con la selección positiva de células CD34 +</li> <li>• Necesidad de profilaxis postrasplante de EICH</li> </ul>
	Selección negativa de TCRαβ+/CD19+	HSC, NK, γδT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recuperación temprana de células γδT y NK</li> <li>• Efecto no patógeno de las células NK y las células γδT</li> <li>• Excelente plataforma para inmunoterapias celulares postrasplante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pocos estudios informados hasta ahora</li> <li>• Necesidad de personal calificado e instalaciones equipadas para la manipulación de injertos.</li> </ul>
<b>HSCT repleto de células T</b>	<b>Células infundidas</b>	<b>Profilaxis para EICH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presuntos costos más bajos</li> <li>• No es necesario manipular el injerto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pocos estudios informados hasta ahora</li> <li>• Control inadecuado de la alorreactividad en niños menores de 10 años</li> </ul>
	HSC, B, γδT, DC, M, Tαβ, NK	Ciclofosfamida post-trasplante (agotamiento selectivo de células T alorreactivas)		
	HSC, B, γδT, DC, M, Tαβ, NK (HSCT cebado con G-CSF)	Profilaxis multiagente (inhibición no selectiva de células T)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presuntos costos más bajos</li> <li>• No es necesario manipular el injerto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pocos estudios informados hasta ahora, limitados a pacientes con anemia aplásica severa</li> <li>• Mayor riesgo de EICH aguda y crónica</li> <li>• Necesidad de profilaxis prolongada para la EICH</li> </ul>

Abreviaturas: HSC, células madre hematopoyéticas; NK, células natural killer; EICH, enfermedad de injerto contra huésped; TRM, mortalidad relacionada con el trasplante; VEB, virus de Epstein-Barr; TCRαβ, cadenas α y β del receptor de células T; γδT, células T gamma delta; DC, células dendríticas; M, células M; Tαβ, células T alfa beta; G-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos.

En ambos casos, las integraciones retrovirales en la proximidad del protooncogén LMO2 promovieron la transactivación de este gen a través del potenciador de repetición terminal larga del provirus retroviral. Pero con el desarrollo de vectores lentivirales y retrovirales auto inactivados, más de 100 pacientes con IDP han sido tratados con estos nuevos vectores. No se han observado eventos adversos graves, pero sí resultados clínicos excelentes en estos pacientes, lo que sugiere que la terapia génica pronto constituirá una alternativa terapéutica al HSCT para los pacientes con IDP (97).

### **5.6.3 Insuficiencia hereditaria de la médula ósea**

Los síndromes hereditarios de insuficiencia de la médula ósea (IBMFS, siglas en inglés “inherited bone marrow failure síndromes”) son un grupo heterogéneo de trastornos sanguíneos raros debidos al deterioro de la hematopoyesis, con diferentes presentaciones clínicas y mecanismos patogénicos. El HSCT alogénico es una opción para estos trastornos congénitos. Sin embargo, debe entenderse bien que solo mejorará el defecto hematopoyético y no curará las malformaciones congénitas ni reducirá el riesgo de tumores sólidos (98).

La anemia de Fanconi (FA) es el más común, con una incidencia estimada de 1/200.000. Es un trastorno en la reparación del daño al ADN que conduce a un aumento de la rotura cromosómica, generando una disminución importante en la producción de las células sanguíneas. La presentación es variable con anomalías somáticas en el 70% de los pacientes, insuficiencia medular y un riesgo muy elevado de neoplasias malignas (síndrome mielodisplásico, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, cánceres ginecológicos) a una edad temprana (98).

Las indicaciones para el trasplante incluyen insuficiencia medular y mielodisplasia / leucemia. Los pacientes con FA tienen una mayor sensibilidad a los regímenes de acondicionamiento convencionales debido al defecto de reparación del ADN innato subyacente (99). Basado en resultados prometedores de Aker et al. (100), se planteó que el uso de fludarabina era un agente relativamente seguro en pacientes con FA y suficientemente inmunosupresor para permitir una alta probabilidad de injerto sin la coadministración de irradiación.

La fludarabina es un análogo de nucleósido que también tiene un efecto sinérgico con los alquilantes al inhibir la reparación del ADN (101) y más importante, no causa entrecruzamiento del ADN (96). Para la FA, se utiliza un acondicionamiento de intensidad reducida con fludarabina y dosis reducida de ciclofosfamida (98).

*FANCA* es el gen FA mutado con más frecuencia (alrededor del 65% de los pacientes con FA en todo el mundo tienen mutaciones en este gen). Todas las proteínas FA cooperan en una vía común involucrada en la detección y reparación de enlaces cruzados entre cadenas de ADN. La interrupción de esta vía clave conduce a las anomalías congénitas y predisposición al cáncer. La inclusión de fludarabina en los regímenes de acondicionamiento de pacientes trasplantados con FA mejora notablemente el resultado de esta terapia (96).

Los resultados actuales del trasplante por insuficiencia de médula ósea en niños con FA muestran tasas de supervivencia según el tipo de donante que oscilan entre el 50% y más del 90%. Los factores que influyen en el resultado incluyen la edad en el momento del trasplante, la disponibilidad de hermanos donantes y el uso de fludarabina en el régimen de acondicionamiento. Un estudio de la EBMT del período 2000-2009 informó una supervivencia promedio de 78% y 65% a los 5 años después del trasplante para donante hermano compatible y donante no emparentado compatible, respectivamente (98).

Sin embargo, el HSCT en la FA todavía produce efectos secundarios, como una mayor incidencia de carcinomas de células escamosas, el condicionamiento genotóxico y EICH (102). Por esto, la terapia génica se considera una alternativa al HSCT para los pacientes con FA. En el estudio de Río et al. (103), demuestra que pacientes con FA subtipo A, con la transducción de células CD34+ movilizadas con G-CSF/plerixafor con un vector lentiviral FANCA terapéutico corrige el fenotipo de células progenitoras hematopoyéticas cultivadas *in vivo*. Los datos obtenidos en este estudio mostraron que las células CD34+ transducidas de pacientes con FA eran capaces de repoblar la hematopoyesis de ratones inmunodeficientes.

Más ensayos clínicos de terapia génica son necesarios para abordar cuestiones importantes con respecto a la transducción óptima y la ventaja proliferativa de las HSC de FA con corrección genética. Es también importante determinar el mejor régimen de acondicionamiento en la terapia génica de FA, idealmente utilizando regímenes no genotóxicos o mínimamente genotóxicos (103).

#### 5.6.4 Trastornos hereditarios de glóbulos rojos

Los trastornos hereditarios de los glóbulos rojos incluyen hemoglobinopatías como  $\beta$ -talasemia y anemia de células falciformes, enfermedades metabólicas eritroides como deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de piruvato quinasa, y trastornos de la membrana eritroide como anemia diseritropoyética congénita. Los síntomas comunes incluyen anemia y complicaciones concomitantes como ictericia, sobrecarga de hierro, hematopoyesis extramedular y cálculos biliares, entre otros (96).

Aproximadamente el 5% de la población mundial tiene un rasgo de trastorno de la hemoglobina, por lo que las hemoglobinopatías son las enfermedades monogénicas más frecuentes en todo el mundo, teniendo un impacto significativo en la calidad de vida, aumento de la morbilidad infantil y mortalidad prematura (104). De acuerdo con Khemani et al. (105), actualmente, el HSCT es el único tratamiento con intención curativa. Los resultados de HSCT son buenos, especialmente cuando se realiza en pacientes jóvenes con donantes hermanos compatibles (106).

De acuerdo con el estudio de Gluckman et al. (106), sobre los resultados del HSCT de hermanos HLA compatibles en pacientes con anemia falciforme, la supervivencia libre de eventos a 5 años y la global fueron 91,4% y 92,9%, respectivamente. En este estudio se incluyeron 1000 receptores de trasplantes de hermanos HLA idénticos entre 1986 y 2013, reportados a la EBMT, Eurocord y al Centro Internacional de Investigación de Trasplantes de Sangre y Médula. La supervivencia libre de eventos fue menor a medida que aumentaba la edad en el momento del trasplante y mayor para los trasplantes realizados después de 2006, 23 pacientes experimentaron fallo del injerto y 70 murieron, siendo la causa más común de muerte, la infección.

Los HSCT de donantes no emparentados compatibles conllevan riesgos inaceptables de morbilidad y mortalidad, dados los altos estándares de atención actual. Por esto, el HSCT autólogo corregido genéticamente es una alternativa terapéutica potencial, que conlleva menores riesgos relacionados con el trasplante y, en teoría, está disponible para todos los pacientes (107).

La  $\beta$ -talasemia es causada por mutaciones que reducen o anulan la síntesis de cadenas de  $\beta$ -globina, lo que ocasiona eritropoyesis ineficaz, hemólisis intramedular y anemia hemolítica. En los protocolos utilizados actualmente, las poblaciones de células CD34+ movilizadas son transducidas por vectores lentivirales y readministradas a los pacientes mediante infusión intravenosa o intraósea. La eficacia potencial de las HSC transducidas con vectores lentivirales de  $\beta$ -globina para corregir el fenotipo de  $\beta$ -talasemia se demostró en modelos murinos de la enfermedad (107).

En el estudio de Markt et al. (108), se utilizó un vector lentiviral auto-inactivante de tercera generación que codifica el gen de la beta globina humana llamado GLOBE. El estudio incluyó una cohorte de 7 pacientes (3 adultos de 31 a 35 años y 4 pacientes pediátricos de 6 a 13 años). Las células CD34+ movilizadas se transdujeron con el vector GLOBE y se administraron mediante inyección intraósea en las crestas ilíacas postero-superiores después del acondicionamiento mieloablativo con treosulfán y tiotepa, favoreciendo el injerto eficiente de células corregidas con toxicidad extramedular reducida.

De acuerdo con el reporte del seguimiento de los pacientes, el procedimiento fue bien tolerado, sin eventos adversos relacionados con el producto, sin evidencia de lentivirus competente para la replicación ni de proliferación clonal anormal en los análisis regulares de sangre periférica y médula ósea. Los tres pacientes adultos tuvieron una reducción de la necesidad de transfusión, pero todavía dependen de esta en el último seguimiento (22, 18 y 16 meses respectivamente). Entre los 4 pacientes pediátricos, 3 interrumpieron la transfusión poco después de la terapia génica y son independientes de esta en el último seguimiento (13, 10 y 8 meses respectivamente). Un paciente pediátrico todavía recibe transfusiones de sangre con regularidad (108).

Estos datos preliminares sugieren que el protocolo clínico aplicado para la terapia génica con el vector lentiviral GLOBE es bien tolerado y conduce a una necesidad de transfusión significativamente reducida. De todas formas, en el estudio de Markt et al. (108) los análisis de seguimiento siguen en curso y a la espera de la presentación de los resultados clínicos actualizados.

Como se deduce de los ensayos recientes de terapia génica realizados con vectores retrovirales y lentivirales auto inactivados, la eficacia clínica y la seguridad asociadas al uso de estos nuevos vectores es evidente. En base a los avances logrados en el campo de la terapia génica hematopoyética no cabe duda de que esta nueva modalidad terapéutica constituirá parte del arsenal terapéutico para el tratamiento de enfermedades complejas y potencialmente mortales.

**Tabla 5.** Resumen sobre los objetivos del HSCT y HSCT con terapia génica en las enfermedades revisadas. Elaboración propia de Bastias, C., (2021).

	<b>HSCT</b>	<b>HSCT + terapia génica</b>
<b>Enfermedades autoinmunes</b>	Eliminar la población de linfocitos autorreactivos, inducir un estado linfopénico para el posterior desarrollo de un sistema inmunológico tolerante que carece de la expansión clonal de células T y B funcionalmente patógenas.	Inducir un sistema inmunológico tolerante de por vida al conferir la corrección fenotípica en la producción de células del sistema inmune.
<b>Inmunodeficiencias</b>	Recuperación temprana y rápida del sistema inmunitario gracias a la expansión transitoria de las células T maduras derivadas del producto de HSC del donante.	Recuperar la función y número de células del sistema inmune mediante el trasplante autólogo de HSC genéticamente corregidas.
<b>IBMFS (FA)</b>	Mejorar la deficiencia hematopoyética al reestablecer y aumentar la producción de células sanguíneas.	Recuperar la correcta hematopoyesis mediante el trasplante autólogo de HSC genéticamente corregidas.
<b>Trastornos de los glóbulos rojos (<math>\beta</math>-talasemia)</b>	Mejorar la eritropoyesis al generar la producción de células sanguíneas a partir de HSC obtenidas del donante.	Corregir el fenotipo del trastorno de los glóbulos rojos del paciente, haciéndolo independiente de transfusiones.

Con respecto al trasplante de HSC alogénicas de donantes sanos, la proporción de pacientes con donantes compatibles con HLA es limitada. Además, esta intervención terapéutica tiene asociados efectos secundarios importantes relacionados principalmente con EICH, infecciones y fallo del injerto. Frente a esto, el desarrollo de la terapia génica representa una buena alternativa, más aún con el uso de vectores auto-inactivados como el GLOBE para evitar la replicación y/o proliferación clonal anormal.

Con respecto a la terapia génica, los vectores de primera generación contenían potentes potenciadores en sus repeticiones terminales largas, de modo que la integración del transgén cerca de los genes asociados al cáncer dio como resultado una transcripción génica no deseada y mutagénesis por inserción en todos los ensayos en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X, Síndrome de Wiskott-Aldrich y enfermedad granulomatosa crónica (109).

Estos eventos adversos graves llevaron al desarrollo de la nueva generación de vectores gamma-retrovirales y lentivirales más seguros y autoinactivantes que carecen de potenciadores potentes en las repeticiones terminales largas. Estos vectores contienen un casete transgénico cuya expresión es impulsada por promotores ubicuos internos o fosfoglicerato quinasa o promotores específicos de tejido. Son más difíciles de producir, pero tienen dos ventajas: la capacidad de transducir células que no se dividen y menos propensión a integrarse cerca de los sitios de inicio de genes transcritos activamente (109)

## **5.7 Datos, controversias y regulación sobre el trasplante de HSC**

Todos los pacientes que se consideran para un HSCT deben someterse a una evaluación previa federal, por ejemplo con la FDA (de sus siglas en inglés, “*Food and Drug Administration*”), y otras agencias reguladoras (por ejemplo, la Fundación para la Acreditación de la Terapia Celular). El propósito de esta evaluación es asegurar que el candidato a HSCT sea lo suficientemente "apto" para tolerar el HSCT y determinar si el beneficio potencial del HSCT supera los riesgos potenciales, incluida la muerte y los efectos secundarios debilitantes a corto y largo plazo (110).

La FDA tiene la autoridad para regular los productos de células madre en los Estados Unidos. Los únicos productos a base de células madre que están aprobados por la FDA para su uso en los Estados Unidos consisten en HSC derivadas de la sangre del cordón. Los posibles problemas de seguridad para los tratamientos no probados incluyen: reacciones en el lugar de administración, la capacidad de las células para moverse de los lugares de colocación y cambiar a tipos celulares inapropiados o multiplicarse, falla de las células para funcionar como se esperaba y el crecimiento de tumores (111).

El HSCT se ha realizado especialmente en países desarrollados, dados los costos y recursos necesarios. Varios factores socioeconómicos están asociados con las tasas de trasplante, incluido el ingreso nacional bruto y el gasto sanitario *per cápita*, la densidad de médicos, el índice de desarrollo humano, nivel de educación, número de establecimientos de salud pública, superficie del país, densidad de población, densidad de población de la ciudad capital y porcentaje de población que vive en zonas rurales. En Chile se han informado tasas bajas de trasplantes a pesar de tener mejores índices económicos comparado con los demás países latinoamericanos (112).

Para establecer un programa de HSCT en un país en desarrollo, se deben tener en cuenta varias cuestiones problemáticas, siendo las principales las dificultades financieras, logísticas y sociales y la disponibilidad de personal calificado. Estos programas deberían centrarse en la creación de experiencia local, seleccionar prácticas rentables, y proporcionar una buena selección de pacientes, formación continua del personal y cooperación entre países, así como hermanamiento con otras instituciones de países desarrollados (113).

## 6. CONCLUSIONES

Existe mucha información disponible, tanto antigua como actual, con respecto al uso de células madre en terapia celular. Desde que el trasplante de HSC fue desarrollado inicialmente en 1957 se ha generado un gran interés en el medio científico, especialmente en el área medicina regenerativa. En la actualidad, ese interés sigue creciendo y con la ayuda de avances tecnológicos (por ej. tecnología de reprogramación genética) nos permite comprender los mecanismos de ciertas enfermedades, así como la búsqueda de una terapia efectiva y/o incluso una cura permanente.

Para el procedimiento de recolección de HSC se han establecido protocolos correspondientes a seguir y requerimientos de calidad para obtener un buen producto de HSC. Existen 3 fuentes para obtener HSC para trasplante, desde médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical. Actualmente, la recolección de HSC desde sangre periférica es la más utilizada por los centros de sangre que la realizan, utilizando movilizadores tales como G-CSF, perixaflor y quimioterapia (esta última se ha ido dejando de utilizar debido a los efectos adversos).

La aplicación del trasplante de HSC funciona y ha sido estudiada como terapia en una amplia gama de enfermedades, desde enfermedades autoinmunes, trastornos genéticos, metabólicos, inmunodeficiencias, reparación de tejidos, entre otras. El objetivo principal del HSCT es restituir a un paciente un sistema hematopoyético sano, y son varios los estudios que confirman la efectividad de esta terapia.

Aun los principales problemas para el HSCT son la disponibilidad limitada de encontrar un donante alogénico compatible, la aparición de eventos adversos como la EICH y posibles infecciones. Frente a esto la terapia génica presenta una ventaja gracias a que mediante el HSCT autólogo más la corrección genética de las células mutantes se puede lograr tratar enfermedades monogénicas que han sido estudiadas y tratadas con el HSCT (inmunodeficiencias, IBMFS y trastornos de los glóbulos rojos, entre otras).

Igualmente, la terapia génica no está exenta de eventos adversos, tales como la proliferación clonal anormal de un grupo específico de células, la activación de protooncogenes, entre otras. Frente a esto, la utilización de vectores auto-inactivados reduce el riesgo de que se generen estos eventos adversos en los pacientes, además de la determinación de mejores regímenes de acondicionamiento adecuados para estas terapias. Estas opciones dependen de la fisiopatología de la enfermedad y requieren un trabajo preclínico significativo y estudios de toxicología en modelos animales específicos de la enfermedad. Varios ensayos clínicos están en curso buscando evidenciar el tratamiento seguro con terapia génica y HSCT.

El empleo de esta terapia probablemente siga avanzando en otras patologías, cuando se haya completado la realización de los ensayos clínicos necesarios, que permiten conocer con exactitud la total seguridad y eficacia de ésta en humanos. Además, las investigaciones apuntan a seguir profundizando en los mecanismos de acción de las células madre, en consensuar resultados investigativos y seguir estableciendo recomendaciones clínicas basadas en las evidencias científicas.

## 7. REFERENCIAS

1. Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., et al. (2018). *Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review*. *Biotechnology advances*, 36(4), 1111–1126. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>
2. Shafieian, R., Matin, M. M., Rahpeyma, A., Fazel, A., Sedigh, H. S., Nabavi, A. S., Hassanzadeh, H., & Ebrahimzadeh-Bideskan, A. (2017). *Effects of Human Adipose-derived Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Healing Response of Canine Alveolar Surgical Bone Defects*. *The archives of bone and joint surgery*, 5(6), 406–418.
3. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., et al. (2019). *Stem cells: past, present, and future*. *Stem Cell Res Ther* 10, 68. doi:10.1186/s13287-019-1165-5
4. Pimentel-Parra, G. A., Murcia-Ordoñez, B. (2017). *Células madre, una nueva alternativa médica*. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(1), 28–33. doi:10.1016/j.rprh.2017.10.013
5. Mata-Miranda M., Vázquez-Zapién G. J., Sánchez-Monroy V. (2013). *Generalidades y aplicaciones de las células madre*. *Perinatol. Reprod. Hum.* 27( 3 ): 194-199. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-53372013000300009&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000300009&lng=es).
6. Liu, Z., Tang, M., Zhao, J., Chai, R., & Kang, J. (2018). *Looking into the Future: Toward Advanced 3D Biomaterials for Stem-Cell-Based Regenerative Medicine*. *Advanced Materials*, 30(17), 1705388. doi:10.1002/adma.201705388
7. Avior, Y., Sagi, I., & Benvenisty, N. (2016). *Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 170–182. doi:10.1038/nrm.2015.27
8. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2013). *Induced pluripotent stem cells in medicine and biology*. *Development*, 140(12), 2457–2461. doi:10.1242/dev.092551
9. Sara-Bayat G. (2015). *Aplicaciones farmacológicas de las células madre* [Tesis de grado]. Madrid, Espana: ~ Universidad Complutense. Disponible en <https://eprints.ucm.es/48547/>

10. Valero-Palencia, P., Naillet, A., Chacín, M., Añez, R., Toledo, A., Pacheco, M., ... & Bermúdez, V. (2011). *Células madre: fundamentos y experiencias de terapia celular*. *Diabetes internacional*, 3(1), 8. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/249011579\\_Celulas\\_madre\\_fundamentos\\_y\\_experiencias\\_de\\_terapia\\_celular](https://www.researchgate.net/publication/249011579_Celulas_madre_fundamentos_y_experiencias_de_terapia_celular)
11. Motwani, B. K., Singh, M., Kaur, G., Singh, S., & Gangde, P. O. (2016). *Stem cells: A new paradigm in dentistry*. *Stem Cells*, 2(1), 140. Disponible en: [http://www.joadms.org/download/article/90/12042016\\_51/1459954496.pdf](http://www.joadms.org/download/article/90/12042016_51/1459954496.pdf)
12. Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E. K., Wysoczynski, M., Ratajczak, J., & Kucia, M. (2008). *Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance*. *Experimental hematology*, 36(6), 742–751. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.03.010>
13. Baker, C. L., & Pera, M. F. (2018). *Capturing Totipotent Stem Cells*. *Cell Stem Cell*, 22(1), 25–34. doi:10.1016/j.stem.2017.12.011
14. Mirzaei, H., Sahebkar, A., Sichani, L. S., Moridikia, A., Nazari, S., et al. (2018). *Therapeutic application of multipotent stem cells*. *Journal of cellular physiology*, 233(4), 2815–2823. <https://doi.org/10.1002/jcp.25990>
15. Blau, H. M., & Daley, G. Q. (2019). *Stem Cells in the Treatment of Disease*. *New England Journal of Medicine*, 380(18), 1748–1760. doi:10.1056/nejmra1716145
16. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*. *Cell*, 126(4), 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
17. Hockemeyer, D., & Jaenisch, R. (2016). *Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing*. *Cell Stem Cell*, 18(5), 573–586. doi:10.1016/j.stem.2016.04.013
18. Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). *The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy*. *Nature*, 481(7381), 295–305. doi:10.1038/nature10761
19. Rowe, R.G., Daley, G.Q. (2019). *Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery*. *Nat Rev Genet* 20, 377–388. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0100-z>
20. Doulatov, S., Vo, L. T., Chou, S. S., Kim, P. G., Arora, N., et al. (2013). *Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via*

- respecification of lineage-restricted precursors*. *Cell stem cell*, 13(4), 459–470.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.002>
21. Doulatov, S., Vo, L. T., Macari, E. R., Wahlster, L., Kinney, M. A., et al. (2017). *Drug discovery for Diamond-Blackfan anemia using reprogrammed hematopoietic progenitors*. *Science translational medicine*, 9(376), eaah5645.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah5645>
22. Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., et al. (2013). *Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features*. *Nature*, 502(7471), 340–345. <https://doi.org/10.1038/nature12586>
23. Lee, A., Tang, C., Rao, M. et al. *Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies*. *Nat Med* 19, 998–1004 (2013). <https://doi.org/10.1038/nm.3267>.
24. Mitchell, A., Wanczyk, H., Jensen, T., & Finck, C. (2019). *Assessment of iPSC teratogenicity throughout directed differentiation toward an alveolar-like phenotype*. *Differentiation; research in biological diversity*, 105, 45–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.01.003>
25. Kim, A., Lee, S. Y., Kim, B. Y., & Chung, S. K. (2020). *Elimination of Teratogenic Human Induced Pluripotent Stem Cells by Bee Venom via Calcium-Calpain Pathway*. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3265.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21093265>
26. Shah, M., George, R. L., Evancho-Chapman, M. M., & Zhang, G. (2016). *Current challenges in dedifferentiated fat cells research*. *Organogenesis*, 12(3), 119–127.  
doi:10.1080/15476278.2016.1197461
27. Murata, K., Jadhav, U., Madha, S., van Es, J., Dean, J., Cavazza, A., Wuchterpfenning, K., Michor, F., Clevers, H., Shivdasani, R. A. (2020). *Ascl2-Dependent Cell Dedifferentiation Drives Regeneration of Ablated Intestinal Stem Cells*. *Cell Stem Cell*.  
doi:10.1016/j.stem.2019.12.011
28. Wang, H., & Unternaehrer, J. (2018). *Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: at the crossroads of differentiation and de-differentiation*. *Developmental Dynamics*. doi:10.1002/dvdy.24678

29. Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). *Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy*. *Acta pharmacologica Sinica*, 34(6), 747–754. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>
30. Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. *Cell stem cell*, 2(4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>
31. Kusadasi, N., & Groeneveld, A. B. (2013). *A perspective on mesenchymal stromal cell transplantation in the treatment of sepsis*. *Shock (Augusta, Ga.)*, 40(5), 352–357. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000039>
32. Chen C (2014). *From mesenchymal stem cell therapy to discovery of drug therapy for systemic sclerosis*. University of Southern California, ProQuest Dissertations Publishing. 3628136.
33. Halabian, R., Roudkenar, M. H., Jahanian-Najafabadi, A., Hosseini, K. M., & Tehrani, H. A. (2014). *Co-culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing lipocalin 2 with HK-2 and HEK293 cells protects the kidney cells against cisplatin-induced injury*. *Cell Biology International*, 39(2), 152–163. doi:10.1002/cbin.10344
34. Van Poll, D., Parekkadan, B., Borel Rinkes, I. H. M., Tilles, A. W., & Yarmush, M. L. (2008). *Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs*. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(1), 42–50. doi:10.1007/s12195-008-0001-2
35. Weiss, A., & Dahlke, M. H. (2019). *Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs*. *Frontiers in immunology*, 10, 1191. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>
36. de Witte, S., Luk, F., Sierra Parraga, J. M., Gargasha, M., Merino, A., Korevaar, S. S., Shankar, A. S., O'Flynn, L., Elliman, S. J., Roy, D., Betjes, M., Newsome, P. N., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2018). *Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells*. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 36(4), 602–615. <https://doi.org/10.1002/stem.2779>
37. Braza, F., Dirou, S., Forest, V., Sauzeau, V., Hassoun, D., Chesné, J., Cheminant-Muller, M. A., Sagan, C., Magnan, A., & Lemarchand, P. (2016). *Mesenchymal Stem Cells Induce*

- Suppressive Macrophages Through Phagocytosis in a Mouse Model of Asthma*. Stem cells (Dayton, Ohio), 34(7), 1836–1845. <https://doi.org/10.1002/stem.2344>
38. Saeedi, P., Halabian, R., & Imani Fooladi, A. A. (2019). *A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies*. Stem cell investigation, 6, 34. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.08.11>
39. Batsali, A. K., Georgopoulou, A., Mavroudi, I., Matheakakis, A., Pontikoglou, C. G., & Papadaki, H. A. (2020). *The Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) in Normal and Abnormal Hematopoiesis and Their Therapeutic Potential*. Journal of clinical medicine, 9(3), 856. <https://doi.org/10.3390/jcm9030856>
40. Saki, N., Abroun, S., Farshdousti Hagh, M., & Asgharei, F. (2011). *Neoplastic bone marrow niche: hematopoietic and mesenchymal stem cells*. Cell journal, 13(3), 131–136.
41. Lee, C., Mitsialis, S. A., Aslam, M., Vitali, S. H., Vergadi, E., Konstantinou, G., Sdrimas, K., Fernandez-Gonzalez, A., & Kourembanas, S. (2012). *Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Circulation, 126(22), 2601–2611. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114173>
42. Butler, J. T., Abdelhamed, S., & Kurre, P. (2018). *Extracellular vesicles in the hematopoietic microenvironment*. Haematologica, 103(3), 382–394. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.183335>
43. Roccaro, A. M., Sacco, A., Maiso, P., Azab, A. K., Tai, Y. T., et al. (2013). *BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression*. The Journal of clinical investigation, 123(4), 1542–1555. <https://doi.org/10.1172/JCI66517>
44. Eaves C. J. (2015). *Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality*. Blood, 125(17), 2605–2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>
45. Yamamoto, R., Wilkinson, A. C., Nakauchi, H. (2018). *Changing concepts in hematopoietic stem cells*. Science, 362(6417), 895–896. doi:10.1126/science.aat7873
46. Mikkola, H. K. A. (2006). *The journey of developing hematopoietic stem cells*. Development, 133(19), 3733–3744. doi:10.1242/dev.02568

47. Bryder, D., Rossi, D. J., & Weissman, I. L. (2006). *Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell*. *The American journal of pathology*, 169(2), 338–346. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312>
48. Szade, K., Gulati, G. S., Chan, C., Kao, K. S., Miyanishi, M., Marjon, K. D., Sinha, R., George, B. M., Chen, J. Y., & Weissman, I. L. (2018). *Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche*. *Antioxidants & redox signaling*, 29(2), 191–204. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7419>
49. Wilkinson, A.C., Yamazaki, S. (2018). *The hematopoietic stem cell diet*. *Int J Hematol* 107, 634–641. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2451-1>
50. Morrison, S J; Uchida, N; Weissman, I L (1995). *The Biology of Hematopoietic Stem Cells.*, 11(1), 35–71. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000343
51. Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., et al. (2016). *Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny*. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6269), aab2116. <https://doi.org/10.1126/science.aab2116>
52. Crisan, Mihaela; Dzierzak, Elaine (2016). *The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity*. *Development*, 143(24), 4571–4581. doi:10.1242/dev.114231
53. Buenrostro, J. D., Corces, M. R., Lareau, C. A., Wu, B., Schep, A. N., Aryee, M. J., Majeti, R., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2018). *Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation*. *Cell*, 173(6), 1535–1548.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.074>
54. Han, X., Wang, R., Zhou, Y., Fei, L., Sun, H., et al. (2018). *Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq*. *Cell*, 172(5), 1091–1107.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.001>
55. Macaulay, I. C., Svensson, V., Labalette, C., Ferreira, L., Hamey, F., Voet, T., Teichmann, S. A., & Cvejic, A. (2016). *Single-Cell RNA-Sequencing Reveals a Continuous Spectrum of Differentiation in Hematopoietic Cells*. *Cell reports*, 14(4), 966–977. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.082>
56. Paul, F., Arkin, Y., Giladi, A., Jaitin, D. A., Kenigsberg, E., et al. (2016). *Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors*. *Cell*, 164(1-2), 325. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.046>

57. Zhang, Y., Gao, S., Xia, J., & Liu, F. (2018). *Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap*. Trends in Cell Biology. doi:10.1016/j.tcb.2018.06.001
58. Mazo, I. B., Massberg, S., & von Andrian, U. H. (2011). *Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking*. Trends in immunology, 32(10), 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.011>
59. Bhattacharya, D., Czechowicz, A., Ooi, A. G., Rossi, D. J., Bryder, D., & Weissman, I. L. (2009). *Niche recycling through division-independent egress of hematopoietic stem cells*. The Journal of experimental medicine, 206(12), 2837–2850. <https://doi.org/10.1084/jem.20090778>
60. Calvi, L., Link, D. (2015). *The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease*. Blood 2015; 126 (22): 2443–2451. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-533588>
61. Trumpp, A., Essers, M., Wilson, A. (2010). *Awakening dormant haematopoietic stem cells*. Nat Rev Immunol 10, 201–209. <https://doi.org/10.1038/nri2726>
62. Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Marks, E. K., & Eldredge, J. H. (1951). *Recovery from radiation injury*. Science (New York, N.Y.), 113(2940), 510–511. <https://doi.org/10.1126/science.113.2940.510>
63. Morgan, R. A., Gray, D., Lomova, A., & Kohn, D. B. (2017). *Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned*. Cell stem cell, 21(5), 574–590. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.10.010>
64. Acker, J., Alquist, C., Andrzejewski Jr, C., Arkins, W., Bailey, D., et al. (2020). *AABB Technical Manual*. (20<sup>th</sup> Edition). Editor, Claudia S. Cohn.
65. Allen, Elizabeth S.; Conry-Cantilena, Cathy (2019). *Mobilization and collection of cells in the hematologic compartment for cellular therapies: Stem cell collection with G-CSF/plerixafor, collecting lymphocytes/monocytes*. Seminars in Hematology, 56(4), 248–256. doi:10.1053/j.seminhematol.2019.11.003
66. AbuSamra, D. B., Aleisa, F. A., Al-Amoodi, A. S., Jalal Ahmed, H. M., Chin, C. J., Abuelela, A. F., Bergam, P., Sougrat, R., & Merzaban, J. S. (2017). *Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44*. Blood advances, 1(27), 2799–2816. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017004317>

67. Pulsipher, M. A., Chitphakdithai, P., Logan, B. R., Navarro, W. H., Levine, J. E., Miller, J. P., Shaw, B. E., O'Donnell, P. V., Majhail, N. S., & Confer, D. L. (2014). *Lower risk for serious adverse events and no increased risk for cancer after PBSC vs BM donation*. *Blood*, 123(23), 3655–3663. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-542464>
68. Panch, S. R., Szymanski, J., Savani, B. N., & Stroncek, D. F. (2017). *Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, (), S1083879117304500–. doi:10.1016/j.bbmt.2017.05.003
69. Hornberger, K., Yu, G., McKenna, D., & Hubel, A. (2019). *Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Assays, Cryoprotectant Agents, and Technology to Improve Outcomes*. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, (), 1–9. doi:10.1159/000496068
70. Gurtovenko, A. A., & Anwar, J. (2007). *Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(35), 10453–10460. doi:10.1021/jp073113e
71. Cox, M. A., Kastrup, J., & Hrubisko, M. (2012). *Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide*. *Cell Tissue Bank*, 13(2), 203–215. doi:10.1007/s10561-011-9248-2
72. Liu, Y., Nan, B., Niu, J., Kapler, G. M., & Gao, S. (2021). *An Optimized and Versatile Counter-Flow Centrifugal Elutriation Workflow to Obtain Synchronized Eukaryotic Cells*. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 664418. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664418>
73. Kilic, P., Bay, M., Yildirim, Y., Coskun, O., Seker, S., et al. (2019). *A CD34+ Cell Enrichment Protocol of Hematopoietic Stem Cells in a Well-Established Quality Management System*. *Cells Tissues Organs*, (), 1–6. doi:10.1159/000501167
74. D. W. H. Barnes, C. E. Ford, P. L. T. Ilbery, P. C. Koller, J. F. Loutit (1957). *Tissue transplantation in the radiation chimera*. *J. Cell. Physiol. Suppl.* 50, 123–138
75. Chivu-Economescu, M., & Rubach, M. (2017). *Hematopoietic stem cells therapies*. *Current stem cell research & therapy*, 12(2), 124-133.

76. Chabannon, C., Kuball, J., Bondanza, A., Dazzi, F., Pedrazzoli, P., et al. (2018). *Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies*. *Science Translational Medicine*, 10(436), eaap9630–. doi:10.1126/scitranslmed.aap9630
77. Golchin, A., & Farahany, T. Z. (2019). *Biological Products: Cellular Therapy and FDA Approved Products*. *Stem cell reviews and reports*, 15(2), 166–175. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9866-1>
78. Snowden, J. A., Badoglio, M., & Alexander, T. (2019). *The rise of autologous HCT for autoimmune diseases: what is behind it and what does it mean for the future of treatment? An update on behalf of the EBMT Autoimmune Diseases Working Party*. *Expert review of clinical immunology*, 15(10), 981–985. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2019.1656526>
79. Ben Nasr, M., Bassi, R., Usuelli, V., Valderrama-Vasquez, A., Tezza, S., D'Addio, F., & Fiorina, P. (2016). *The use of hematopoietic stem cells in autoimmune diseases*. *Regenerative Medicine*, 11(4) 395-405. doi:10.2217/rme-2015-0057
80. Mohty, M (2007). *Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond.*, 21(7), 1387–1394. doi:10.1038/sj.leu.2404683
81. Karnell, F.G., Lin, D., Motley, S., Duhon, T., Lim, N., Campbell, D.J., Turka, L.A., Maecker, H.T. and Harris, K.M. (2017). *Reconstitution of immune cell populations in multiple sclerosis patients after autologous stem cell transplantation*. *Clin Exp Immunol*, 189: 268-278. <https://doi.org/10.1111/cei.12985>
82. Arruda, L., de Azevedo, J., de Oliveira, G., Scortegagna, G., Rodrigues, E., et al. (2016). *Immunological correlates of favorable long-term clinical outcome in multiple sclerosis patients after autologous hematopoietic stem cell transplantation*. *Clinical Immunology*, ( ), S1521661616300985–. doi:10.1016/j.clim.2016.06.005
83. Darlington, P.J., Touil, T., Doucet, J.-S., Gaucher, D., Zeidan, J., et al. (2013). *Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation*. *Ann Neurol*, 73: 341-354. <https://doi.org/10.1002/ana.23784>
84. Delemarre E., van den Broek T., Mijneer G., Meerding J., Wehrens E., Olek S., et al. (2016). *Autologous stem cell transplantation aids autoimmune patients by functional*

- renewal and TCR diversification of regulatory T cells.* *Blood* 127(1):91–101.  
doi:10.1182/blood-2015-06-649145
85. Cull, G., Hall, D., Fabis-Pedrini, M.J., Carroll, W.M., Forster, L., et al. (2017). *Lymphocyte reconstitution following autologous stem cell transplantation for progressive MS.* *Multiple Sclerosis Journal – Experimental, Translational and Clinical*, 3(1), 205521731770016–. doi:10.1177/2055217317700167
86. Darlington, P.J., Touil, T., Doucet, J.-S., Gaucher, D., Zeidan, J., Gauchat, D., et al. (2013). *Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation.* *Ann Neurol*, 73: 341-354.  
<https://doi.org/10.1002/ana.23784>
87. Darlington, P.J., Stopnicki, B., Touil, T., Doucet, J.S., Fawaz, L., et al. (2018). *Natural Killer Cells Regulate Th17 Cells After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Relapsing Remitting Multiple Sclerosis.* *Frontiers in Immunology*, 9(), 834–. doi:10.3389/fimmu.2018.00834
88. Daikeler, T., Labopin, M., Di Gioia, M., Abinun, M., Alexander, T., et al. (2011). *Secondary autoimmune diseases occurring after HSCT for an autoimmune disease: a retrospective study of the EBMT Autoimmune Disease Working Party.* *Blood*, 118(6), 1693–1698. doi:10.1182/blood-2011-02-336156
89. Yanir, A.D., Hanson, I.C., Shearer, W.T., Noroski, L.M.; Forbes, L.R., et al. (2018). *High Incidence of Autoimmune Disease Post HSCT for Chronic Granulomatous Disease.* *Biology of Blood and Marrow Transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 24(8), 1643–1650.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.03.029>
90. Scott, N. M., Ng, R. L., Gorman, S., Norval, M., Waithman, J., & Hart, P. H. (2014). *Prostaglandin E2 imprints a long-lasting effect on dendritic cell progenitors in the bone marrow.* *Journal of leukocyte biology*, 95(2), 225–232.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0513294>
91. Burt, R. K., Loh, Y., Cohen, B., Stefosky, D., Balabanov, R., et al. (2009). *Autologous non-myeloablative haemopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase I/II study.* *The Lancet Neurology*, 8(3), 244-253.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70017-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70017-1)

92. Slatter, M. A., & Gennery, A. R. (2018). *Hematopoietic cell transplantation in primary immunodeficiency - conventional and emerging indications*. Expert review of clinical immunology, 14(2), 103–114. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2018.1424627>
93. Okamoto, H., Arii, C., Shibata, F., Toma, T., Wada, T., et al. (2007). *Clonotypic analysis of T cell reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency*. Clinical & Experimental Immunology, 148: 450-460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03378.x>
94. Lewin, S., Heller, G., Zhang, L., Rodrigues, E., Skulsky, E., et al. (2002). *Direct evidence for new T-cell generation by patients after either T-cell-depleted or unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantations*. Blood; 100 (6): 2235–2242. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V100.6.2235>
95. Bertaina, A., Pitisci, A., Sinibaldi, M., Algeri, M. (2017). *T Cell-Depleted and T Cell-Replete HLA-Haploidentical Stem Cell Transplantation for Non-malignant Disorders*. Current Hematologic Malignancy Reports, 12(1), 68–78. doi:10.1007/s11899-017-0364-3
96. Bueren, J. A., Quintana-Bustamante, O., Almarza, E., Navarro, S., Río, P., Segovia, J. C., & Guenechea, G. (2020). *Advances in the gene therapy of monogenic blood cell diseases*. Clinical genetics, 97(1), 89–102. <https://doi.org/10.1111/cge.13593>
97. Thrasher, A. J., & Williams, D. A. (2017). *Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency*. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 25(5), 1132–1141. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.018>
98. Díaz de Heredia C., Bierings M., Dalle JH., Fioredda F., Strahm B. (2019) *Fanconi's Anemia and Other Hereditary Bone Marrow Failure Syndromes*. In: Carreras E., Dufour C., Mohty M., Kröger N. (eds) The EBMT Handbook. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5\\_78](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02278-5_78)
99. Doval, D., Choudhary, D., Sharma, S.K. et al. (2020). *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Fanconi Anemia: A Single Center Experience from India*. Indian J Hematol Blood Transfus 36, 565–568. <https://doi.org/10.1007/s12288-020-01254-3>
100. Aker, M., Varadi, G., Slavin, S., & Nagler, A. (1999). *Fludarabine-based protocol for human umbilical cord blood transplantation in children with Fanconi anemia*. Journal

- of pediatric hematology/oncology, 21(3), 237–239. <https://doi.org/10.1097/00043426-199905000-00013>
101. Gyurkocza, B., & Sandmaier, B. M. (2014). *Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all*. *Blood*, 124(3), 344–353. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-514778>
102. Alter, B. P., Giri, N., Savage, S. A., & Rosenberg, P. S. (2018). *Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up*. *Haematologica*, 103(1), 30–39. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.178111>
103. Río, P., Navarro, S., Guenechea, G., Sánchez-Domínguez, R., Lamana, M. L., et al. (2017). *Engraftment and in vivo proliferation advantage of gene-corrected mobilized CD34+ cells from Fanconi anemia patients*. *Blood*, 130(13), 1535–1542. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-774174>
104. Modell, B., & Darlison, M. (2008). *Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators*. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(6), 480–487. <https://doi.org/10.2471/blt.06.036673>
105. Khemani, K., Ross, D., Sinha, C., Haight, A., Bakshi, N., & Krishnamurti, L. (2018). *Experiences and Decision Making in Hematopoietic Stem Cell Transplant in Sickle Cell Disease: Patients' and Caregivers' Perspectives*. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 24(5), 1041–1048. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.018>
106. Gluckman, E., Cappelli, B., Bernaudin, F., Labopin, M., Volt, F., et al. (2017). *Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 129(11), 1548–1556.
107. Cavazzana, M., & Mavilio, F. (2018). *Gene Therapy for Hemoglobinopathies*. *Human gene therapy*, 29(10), 1106–1113. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.122>
108. Markt, S., Cicalese, M. P., Giglio, F., Scaramuzza, S., Calbi, V., Casiraghi, M., et al. (2017). *Gene therapy for Beta thalassemia: preliminary results from the PHASE I/II Tiget-Bthal trial of autologous hematopoietic stem cells genetically modified with GLOBE lentiviral vector*. *Blood*, 130(Supplement 1), 355–355.

109. Staal, FJT., Aiuti, A., Cavazzana, M. (2019). *Autologous Stem-Cell-Based Gene Therapy for Inherited Disorders: State of the Art and Perspectives*. *Front. Pediatr.* 7:443. doi: 10.3389/fped.2019.00443
110. Eichelberger C., Brown V.I. (2018) *HSCT Recipient Pretransplantation Evaluation*. In: Brown V. (eds) *Hematopoietic Stem Cell Transplantation for the Pediatric Hematologist/Oncologist*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-63146-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63146-2_6)
111. Marks, P. W., Witten, C. M., & Califf, R. M. (2017). *Clarifying Stem-Cell Therapy's Benefits and Risks*. *The New England journal of medicine*, 376(11), 1007–1009. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1613723>
112. Jaimovich, G., Martinez Rolon, J., Baldomero, H. et al. (2017). *Latin America: the next region for haematopoietic transplant progress*. *Bone Marrow Transplant* 52, 671–677. <https://doi.org/10.1038/bmt.2016.361>
113. Nassar A., Srivastava A., Hashmi S.K., Aljurf M. (2018). *Establishing an HSCT Program with Limited Resources*. In: Gluckman É., Niederwieser D., Aljurf M. (eds) *Establishing a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-59358-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-59358-6_18)