

31  
Def.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

CARACTERIZACION IN VITRO DE LOS  
PROGENITORES HEMATOPOYETICOS PRESENTES  
EN LA MEDULA OSEA DE PACIENTES CON  
SINDROME MIELODISPLASICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FLORES FIGUEROA EUGENIA

ASESOR DE TESIS: DR. HECTOR MAYANI

MEXICO, D.F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2589-40  
1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mi papá,**

**A mi mamá,**

**A mis hermanos,**

**A Vicente.**

## Agradecimientos

A Dios,

A toda mi familia, por su constante apoyo;

A Vicente, por estar siempre a mi lado, comprender mi carrera e impulsarme a seguir siempre adelante;

A todos mis profesores de Izatacala, a quienes siempre recordaré con mucho cariño, y con quienes formamos una gran familia;

A todos mis amigos con quienes viví experiencias inolvidables, y siempre estuvimos juntos tanto en las buenas como en los exámenes de bioquímica;

Muy especialmente a mi asesor Dr. Héctor Mayani, por permitirme conocer el sistema más bonito del organismo, por guiarme en el camino de la investigación y tenerme mucha paciencia;

A mis amigas del Laboratorio de Hematopoyesis Alejandra, Elizabeth, Laura y Margarita, de las que he aprendido muchas cosas y siempre me han apoyado;

A Nachito y Fernando,

A los doctores Susana Guerrero, Guillermo Gutiérrez y Enrique Gómez, por proporcionarme las muestras tanto de pacientes como de médula ósea normal, sin ustedes no hubiera sido posible realizar este trabajo;

A todos los integrantes de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, del Centro Médico Nacional Siglo XXI;

Con mucho cariño a mis amigos del PAEA: Mónica, Ana, Alejandra, Malinali Rocío, Elizabeth, Alfredo, Carlos, Iván, Israel y Luis

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>La Sangre</b> .....	1
<b>Hematopoyesis y órganos hematopoyéticos</b> .....	4
<b>Células hematopoyéticas</b> .....	5
<b>Microambiente hematopoyético</b> .....	13
<b>Componentes del microambiente hematopoyético medular</b> .....	14
<b>Estudio de la hematopoyesis in vitro</b> .....	17
<b>Síndromes Mielodisplásicos</b> .....	20
<b>ANTECEDENTES</b> .....	26
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	28
<b>OBJETIVOS</b> .....	29
<b>Diagrama de Flujo de la Metodología</b> .....	30
<b>METODOLOGIA</b> .....	31
<b>Obtención de células mononucleadas</b> .....	31
<b>Conteo de células</b> .....	32
<b>Cultivos semisólidos</b> .....	32
<b>Conteo de colonias</b> .....	33
<b>Cultivo líquido de médula ósea a largo plazo</b> .....	34
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	35
<b>Pacientes</b> .....	35
<b>Crecimiento de los progenitores hematopoyéticos en cultivo semisólido</b> .....	37
<b>Crecimiento de los progenitores hematopoyéticos en cultivos líquidos de Médula ósea a largo plazo</b> .....	47

<b>Fracción Adherente .....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>59</b>

# INTRODUCCION

## LA SANGRE

La sangre contiene una gran variedad de células, las cuales realizan diversas funciones. Las células de la sangre pueden ser clasificadas en tres grupos: las células rojas, las células blancas y las plaquetas (1,2) (figura 1).

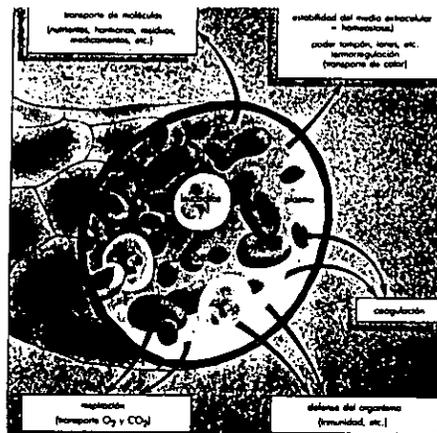


Figura 1

Las células rojas o **eritrocitos** intervienen en los mecanismos de intercambio de gases, transportando oxígeno a los tejidos y bióxido de carbono de los tejidos a los pulmones. Son las células más abundantes en la sangre, (en promedio un adulto de 70kg, posee cinco millones de eritrocitos por milímetro cúbico de sangre). La forma normal del eritrocito humano es la de un disco bicóncavo de 7.2  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente. Los eritrocitos tienen una vida media de  $\approx 120$  días (1,2).

Dentro del grupo de las células blancas o **leucocitos** encontramos una amplia gama tanto de células como de funciones. Los cinco tipos de leucocitos representan dos familias. El carácter distintivo de una familia es el citoplasma granuloso; el de la otra, el citoplasma no granuloso. Por lo tanto los leucocitos se clasifican en granulocitos y no granulocitos. Existen tres tipos de granulocitos o leucocitos granulocitos: los eosinófilos, los basófilos y los neutrófilos (1,2).

Los **eosinófilos** constituyen del 1 al 3% de los leucocitos totales. Miden de 10 a 15µm de diámetro y su núcleo es bilobulado. Los eosinófilos son capaces de llevar a cabo la fagocitosis, son células importantes en las reacciones alérgicas y en la respuesta inmune contra parásitos.

Los **basófilos** constituyen el 0.5% de leucocitos en sangre, miden aproximadamente de 10 a 12µm de diámetro. Secretan histamina, la cual interviene en las reacciones alérgicas.

Los **neutrófilos** o polimorfonucleares, constituyen entre el 60 y 70% del total de leucocitos, siendo los más abundantes en la sangre. Los neutrófilos maduros miden de 10 a 12µm, su núcleo es multilobulado; intervienen en la defensa contra agentes infecciosos. Después de ser liberados de la médula ósea, los neutrófilos permanecen entre 6 y 12 horas en la circulación, antes de migrar a los tejidos, en donde llevan a cabo su función fagocítica (1,2).

Dentro de los leucocitos no granulados encontramos a los linfocitos y a los monocitos. Los **linfocitos**, después de los neutrófilos, son los leucocitos más abundantes de la sangre. Los linfocitos cooperan con los fagocitos en la defensa del organismo, contra infecciones y contra invasión externa, dándole especificidad a la respuesta inmune. Pueden clasificarse en T y en B. Ambos llevan a cabo funciones especializadas en la respuesta inmunológica. Los **linfocitos T** maduran en el timo y comprenden entre el 65-80% de la población de linfocitos circulantes, mientras que los **linfocitos B** maduran en la médula ósea y comprenden entre el 5-15% de los linfocitos circulantes (1,2).

Los **monocitos** constituyen del 3 al 8% de los leucocitos en sangre, tienen una gran capacidad de movimiento y migración. En los tejidos los monocitos se diferencian en macrófagos, cuya principal función es intervenir en la defensa contra agentes infecciosos, fagocitando y produciendo citocinas (1,2). Finalmente las plaquetas o **trombocitos**, los cuales son fragmentos de los megacariocitos; células poliploides que se localizan en la médula ósea y que dentro de su citoplasma producen a las plaquetas (3) y las liberan a la circulación. Las plaquetas miden entre 1 y 4µm, forman parte del mecanismo de coagulación.

Los valores normales de células sanguíneas se muestran en el siguiente cuadro:

### Valores Normales de las Células Sanguíneas

	Hombre	Ambos Sexos	Mujer
<b>Células blancas</b> <b>x10<sup>3</sup> /μl de sangre</b>		7.8 (4.4-11.3)	
<b>Células rojas</b> <b>x10<sup>6</sup> /μl de sangre</b>	5.21 (4.52-5.90)		4.60 (4.10-5.10)
<b>Hemoglobina</b> <b>g/dl de sangre</b>	15.7 (14.0-17.5)		13.8 (12.3-15.3)
<b>Cuenta plaquetaria</b> <b>x10<sup>3</sup> /μl de sangre</b>		311 (172-450)	

Referencias 1 y 2

## HEMATOPOYESIS Y ORGANOS HEMATOPOYETICOS

La producción de toda esta variedad de células se lleva a cabo gracias a un proceso denominado Hematopoyesis. La Hematopoyesis se inicia a partir de la tercera semana del desarrollo prenatal en el saco vitelino, específicamente en los islotes hematopoyéticos, los cuales derivan de las células mesenquimales. Las células mesenquimales se diferencian en racimos o colonias con células endoteliales en la periferia y células hematopoyéticas al centro, algunas de las cuales se diferencian rápidamente a la línea eritroide (4).

Con la fusión de los islotes hematopoyéticos y el establecimiento de los vasos sanguíneos y la circulación, la hematopoyesis migra del saco vitelino al hígado fetal, probablemente por la circulación (5). La expansión de la hematopoyesis en el hígado fetal está asociada con la declinación de la misma en el saco vitelino.

La hematopoyesis hepática se inicia con la aparición de células blásticas indiferenciadas, las cuales se van diferenciando hacia la línea eritroide, granulocítica y megacariocítica. Esto ocurre a partir del tercer mes de gestación, durante este periodo el bazo también actúa como órgano hematopoyético (4). Desde el sexto mes de desarrollo y durante toda la etapa pos-natal, hasta la muerte del organismo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético, capaz de llevar a cabo la eritropoyesis, mielopoyesis y linfopoyesis (Figura 2) (4).

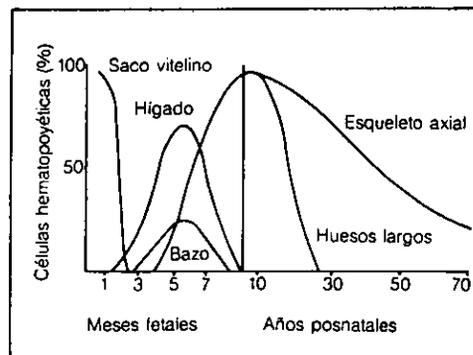


Figura 2

Dentro de la médula ósea encontramos fundamentalmente dos compartimentos constituidos por: las células hematopoyéticas (CH) y por el microambiente hematopoyético (MH).

## I. CELULAS HEMATOPOYETICAS

### Organización estructural del sistema hematopoyético

Gracias a los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, que se han realizado durante las últimas tres décadas, se ha desarrollado un modelo de la organización estructural del sistema hematopoyético en los mamíferos; el cual está constituido por cuatro compartimentos (6,7).

El primero está formado por las *células seminales hematopoyéticas (CSH)*, también denominadas células madre o células tallo; las cuales dan origen a *progenitores hematopoyéticos*, que constituyen el segundo compartimento, los progenitores hematopoyéticos dan lugar a *precursores reconocibles por su morfología* y estos al madurar dan origen finalmente a las *células sanguíneas (Figura 3)* (7,8,9).

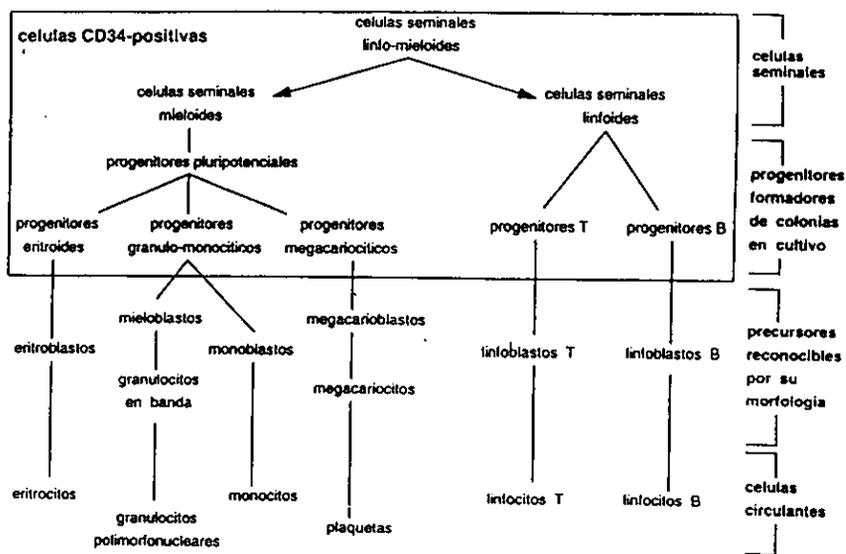


Figura 3

## **1.- Células Seminales Hematopoyéticas. CSH.**

Las CSH constituyen una población celular muy heterogénea, dentro de la cual existen células con la capacidad de originar células seminales tanto de tipo linfóide como mieloide. Las CSH no pueden distinguirse por su morfología, pero poseen características únicas que las diferencian de las células maduras. Funcionalmente se dice que una CSH es capaz de autorrenovarse y tiene la capacidad de regenerar permanentemente el sistema hematopoyético de un organismo cuyo sistema hematopoyético ha sido previamente nulificado (10,11,12).

Las CSH no producen colonias en cultivos semisólidos, pero en cultivos líquidos a largo plazo, dan origen a progenitores más maduros capaces de producir colonias en cultivos (10,11,12). Más del 95% de las CSH están en estado quiescente, es decir en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, por lo que son resistentes a los efectos del 5-fluorouracilo (13). Estas células además, tienen la capacidad de retener bajos niveles de rodamina, y no se adhieren a las cajas de cultivo (10). Las CSH, también pueden distinguirse por su inmunofenotipo, ya que expresan los antígenos CD34 y Thy-1; y no expresa los antígenos de células maduras (Lin-), como por ejemplo CD3, CD4, CD8 ni CD19, y tampoco expresan el antígeno de histocompatibilidad HLA-DR. Las CSH expresan en su superficie los receptores: c-kit, IL-1R, IL-6R y gp130 (14,15,16,17).

## **2.-Progenitores formadores de colonias en cultivo (PFC).**

Los progenitores hematopoyéticos se derivan de las células seminales hematopoyéticas; estos progenitores tienen la capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos. Cuando los progenitores provienen de una CSH mieloide, estos progenitores formarán colonias eritroides, granulocíticas, monocíticas y megacariocíticas; por su parte las CSH linfoides dan lugar a colonias linfoides tanto B como T. Los PFC poseen una alta capacidad de proliferación, sin embargo no son capaces de mantener la hematopoyesis *in vitro* ni *in vivo* a largo plazo (7).

Los progenitores que dan origen a las colonias en cultivo pueden ser multipotenciales, como es el caso de las unidades formadoras de colonias mixtas (UFC-MIX), los cuales forman colonias que contienen células tanto mieloides como eritroides.

Existen también progenitores bipotenciales, como las unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas (UFC-GM), las cuales originan colonias compuestas por granulocitos y por monocitos; y finalmente, los progenitores monopotenciales como las unidades formadoras de colonias de granulocitos (UFC-G), de monocitos (UFC-M); y dentro de la línea eritroide encontramos progenitores monopotenciales inmaduros como las unidades formadoras de brote eritroide (UFB-E) y progenitores unipotenciales más maduros como las unidades formadoras de colonias eritroides (UFC-E).

Los progenitores formadores de colonias en cultivos, también pueden ser reconocidos por su inmunofenotipo. Los progenitores multipotenciales presentan el siguiente inmunofenotipo CD34+ CD45RA<sup>lo</sup> CD71<sup>lo</sup> ; los progenitores mieloides expresan los antígenos CD34 y CD45RA y no expresan el antígeno CD71 ; y los progenitores eritroides inmaduros (BFU-E) expresan los antígenos CD34 y CD71 y no expresan el CD45RA (25).

### **3.-Precursores reconocibles por su morfología.**

Los precursores reconocibles por su morfología, reciben ese nombre ya que bajo microscopía óptica pueden ser identificados. Incluyen los distintos tipos de blastos, de todas las líneas hematopoyéticas. Estos precursores dan origen a las células sanguíneas maduras (7). En términos generales, las células más inmaduras o jóvenes suelen ser grandes y se vuelven progresivamente más pequeñas al adquirir la madurez (con excepción del megacariocito).

Los núcleos de células más jóvenes en la secuencia de maduración son grandes y voluminosos en relación al citoplasma. Al madurar las células, el núcleo disminuye de tamaño.

El citoplasma de las células primitivas es esencialmente azul y contiene grandes cantidades de ARN (ácido ribonucleico), que tiene afinidad para el colorante azul de metileno; al madurar la célula va adquiriendo una tonalidad rojiza en su citoplasma. Los filamentos de cromatina nuclear de células jóvenes contienen ADN (ácido desoxiribonucleico) que tiene afinidad para el colorante ácido eosinófilo. Al madurar el núcleo se tiñe más intensamente y su color cambia del rojo pálido al azul oscuro. En células no diferenciadas o blastos, los filamentos de cromatina nuclear son visibles. La cromatina es de tinte y consistencia uniforme. Una de las características de inmadurez es la presencia de nucleólos en el núcleo (2,26).

## **Linea Eritroide**

### **Proeritroblasto**

También denominado pronormoblasto. Las células primitivas de la serie eritrocítica son semejantes a las demás células no diferenciadas o blastos. En las formas más jóvenes, el citoplasma se tiñe de azul claro. Mide entre 15-25 $\mu$ m, tiene una relación núcleo citoplasma alta. El núcleo puede presentar entre 2 y 3 nucleolos, la cromatina es fina y reticular.

### **Eritroblasto basófilo**

Se distingue del proeritroblasto debido a que presenta una cromatina más madura mostrando focos de condensación y puede o no presentar nucleolos. Mide alrededor de 15 $\mu$ m, presenta una relación núcleo citoplasma alta, de 7-3. Presenta un citoplasma de color basófilo.

### **Eritroblasto policromatófilo**

Son más pequeños que los basófilos, tienen más citoplasma y presentan tintes rojos y azules mixtos. La cromatina nuclear es gruesa e irregularmente condensada; ya no se distinguen nucleolos. Tiene una relación núcleo citoplasma de 1-1.

### Eritroblasto ortocromático

Presenta un citoplasma predominantemente eosinófilo, mide entre 12-15 $\mu$ m. El núcleo es pequeño central con una cromatina sumamente condensada.

### Reticulocitos

Esta célula no se puede distinguir del eritrocito en una tinción regular. Mide de 10-12 $\mu$ m. No presentan núcleo, suelen ser más grandes que las células más maduras. Cuando se tiñe con azul de cresilo brillante se puede observar un retículo granulofilamentoso. Los reticulocitos maduran para dar origen a los eritrocitos.

### **Linea Granulocítica**

#### Mieloblasto

El diámetro de los mieloblastos varía de 15 a 20 $\mu$ m. Estas células contienen moderada cantidad de citoplasma no granuloso y de color azulado, que se tiñe irregularmente y es más pálido en las proximidades del núcleo que en la periferia. Con frecuencia se observan prolongaciones citoplásmicas. El núcleo es redondo y se tiñe predominantemente de rojo. La red de cromatina es delicada, bien definida y uniformemente teñida. Suelen observarse dos o más nucleolos.

#### Promielocito

El mieloblasto se convierte en promielocito cuando forma gránulos netamente visibles. Al principio los gránulos son oscuros y se tiñen predominantemente en azul o azul morado. Los gránulos son visibles cuando están situados por encima o por debajo del núcleo que es más pálido y de tinte más rojizo.

El núcleo es redondo y relativamente más grande; suelen poder distinguirse nucleólos. El citoplasma es azul, con una zona relativamente pálida adyacente al núcleo. Los bordes del citoplasma son lisos. Su tamaño puede ser variable, en promedio mide entre 25 y 30 $\mu$ m. El promielocito se convierte en mielocito cuando los gránulos se diferencian en grado tal que pueden clasificarse en elementos basófilos, eosinófilos y neutrófilos.

### Mielocito

Los mielocitos presentan gránulos secundarios que de acuerdo con su color, distinguen a los tres tipos de granulocitos. Mide entre 20 y 18 $\mu$ m. Tiene una relación núcleo citoplasma de 1-1. Su cromatina está en proceso de condensación, por lo que los gruesos filamentos de cromatina se tiñen irregularmente. Los nucleólos no se distinguen claramente. El núcleo puede ser redondo, ovalado o achatado por un lado.

### Metamielocito

Es una célula que presenta un núcleo hendido, arriñonado, localizado hacia un lado de la célula. Mide aproximadamente 15 $\mu$ m; presenta una relación núcleo citoplasma de 6-4. La estructura de la cromatina muestra francas zonas de condensación. Presenta gránulos secundarios.

### Banda

A medida que van madurando los metamielocitos la concavidad del núcleo se hace más pronunciada. Los extremos del núcleo son aproximadamente paralelos dándole al núcleo un aspecto de herradura. Su tamaño es menor que el de los metamielocitos (entre 12-15 $\mu$ ). El núcleo presenta alteraciones degenerativas y generalmente se observa una masa oscura, picnótica en ambos polos donde se formará el lóbulo. Las Bandas dan origen a los polimorfonucleares basófilos, neutrófilos y eosinófilos.

## **Linea monocítica**

### Monoblastos y Promonocitos

Es difícil poder distinguir a estos tipos celulares. La identificación de células mononucleares jóvenes se basa en los núcleos hendidos y plegados y la asociación con monocitos más maduros. Son células de alrededor 20-25 $\mu$ m, su núcleo es redondo, central y presentan nucleolos. Los promonocitos dan origen a los monocitos que se diferencian en los tejidos en macrófagos.

## **Linea Megacariocítica**

### Megacarioblasto

Son grandes células irregulares con uno o varios núcleos redondos u ovalados. Citoplasma azul, desprovisto de gránulos. Puede haber pseudópodos obtusos con diversos tintes azulados y que contienen múltiples gránulos cromófobos. Presenta nucleolos y cromatina fina.

### Promegacariocito

Se distinguen de los megacarioblastos por la presencia de gránulos azulados en el citoplasma adyacente al núcleo.

### Megacariocito

Son células de gran tamaño entre 60 y 70 $\mu$ m tienen un citoplasma muy abundante. En los estados más avanzados de maduración; los megacariocitos presentan lentos movimientos amiboides. Extienden partes de su citoplasma a través de la membrana basal y entre las células endoteliales de los sinusoides de la médula ósea, en donde al formarse las plaquetas éstas son arrastradas a la circulación.

## **Linea linfocítica**

### Prolinfocito y Linfoblasto

La diferencia entre linfocitos maduros y prolinfocitos se basa en pequeños cambios en la estructura de la cromatina nuclear. Los linfoblastos tienen un núcleo eosinófilo, relativamente grande, presentan una cromatina nuclear fina con presencia de nucleólos y un citoplasma basófilo sin la presencia de gránulos. Miden entre 12-15 $\mu$ m. El prolinfocito muestra una cromatina irregular que evidencia zonas de condensación. El prolinfocito da origen a los linfocitos.

#### **4. Células sanguíneas maduras.**

Como ya se mencionó anteriormente, las células sanguíneas maduras incluyen a los eritrocitos, a los leucocitos y a las plaquetas, los cuales tienen un tiempo de vida en la circulación limitado, que va desde 100 días como los eritrocitos, hasta unas cuantas horas como algunos leucocitos; por lo que continuamente deben ser remplazados por células maduras producidas gracias al mecanismo de hematopoyesis (1,2,7).

## II: MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado que se lleva a cabo únicamente en ciertos órganos, denominados órganos hematopoyéticos (saco vitelino, bazo, hígado, médula ósea). En ellos las células hematopoyéticas se desarrollan en un ambiente específico denominado Microambiente Hematopoyético (MH).

El MH es una estructura tridimensional compleja altamente organizada que regula la localización y fisiología de las células hematopoyéticas y consiste en una red local de **células del estroma, células accesorias** y sus productos (**matriz extracelular y citocinas**) (18,27).

Las células del MH pueden regular la hematopoyesis tanto negativa como positivamente a través de diversos mecanismos que incluyen:

- contacto directo entre células hematopoyéticas y células del estroma
- interacción entre las células hematopoyéticas y las moléculas de la matriz extracelular
- producción y secreción de citocinas tanto solubles como unidas a células del estroma (18).

## COMPONENTES DEL MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO MEDULAR

### Células del Estroma

El termino célula del estroma se utiliza para describir una gran variedad de células, que tienen la capacidad de adherirse *in vitro* y expresan el antígeno de histocompatibilidad tipo I (19). Estas células son residentes permanentes de la médula ósea, las cuales además de ser un soporte físico; sintetizan y secretan citocinas y moléculas que forman parte de la matriz extracelular; necesarias para regular la autorenovación, diferenciación, maduración y migración de las células hematopoyéticas (18). Las células del estroma incluyen: células reticulares, macrófagos, células endoteliales, adipocitos (18) y osteoblastos (20).

### Células Accesorias

El término célula accesoria se utiliza para describir a células que se encuentran en la cavidad medular de manera transitoria, pero que regulan la hematopoyesis a través de la producción de citocinas. Dentro de las células accesorias encontramos a los monocitos, linfocitos y células NK (natural killer, por sus siglas en inglés). Estas células producen citocinas tanto inhibitoras como estimuladoras; las cuales son liberadas dentro de la médula ósea, e interaccionan tanto con otros componentes celulares del microambiente hematopoyético como con las células hematopoyéticas (18).

### Citocinas

Las citocinas son glicoproteínas cuya producción es regulada por estímulos inducibles que actúan a nivel de traducción o transcripción. La producción de citocinas es transitoria, es decir, no son producidas constitutivamente (salvo excepciones).

El radio de acción de las citocinas usualmente es corto, por lo que generalmente su acción es autócrina o parácrina (a excepción de la eritropoyetina (Epo) cuya acción es endócrina).

Estas moléculas actúan uniéndose a receptores de membrana de gran afinidad, la mayor parte de ellas altera la expresión génica de sus células blanco, modificando:

- ◆ la tasa de proliferación celular
- ◆ el estadio de diferenciación celular
- ◆ la viabilidad - muerte celular (apoptosis)

Las citocinas tienen la capacidad de interactuar con otros factores hematopoyéticos y producir acciones tanto sinérgicas como antagonísticas; estimulando o inhibiendo la producción de otras citocinas (21).

### **Matriz Extracelular**

La matriz extracelular es una estructura altamente organizada, que forma parte del microambiente hematopoyético debido a que las moléculas de la matriz interactúan con receptores de membrana de las células hematopoyéticas, fijándolas en un determinado nicho hematopoyético (24). Se compone principalmente por:

- ◆ Colágenas.- proteínas fibrilares producidas por las células endoteliales y reticulares. Se ha identificado la presencia de la colágena tipo I, III y V en el MH de la médula ósea (22).
- ◆ Fibronectina.- es una glicoproteína producida por las células reticulares y macrófagos. Es secretada como un dímero, con enlaces disulfuro cerca del carboxilo terminal, con un peso molecular de 440-500kD. Es una proteína organizada en dominios funcionales con sitios de enlace para colágena, heparán sulfato y trombospondina (23).

- ◆ **Laminina.**- es una larga glicoproteína con múltiples dominios y sitios de adhesión. Es uno de los mayores componentes de la matriz extracelular; a esta molécula se adhieren desde células inmaduras como las CD34+ así como progenitores de granulocitos y células maduras como los monocitos y neutrófilos; es producida por las células endoteliales (22).
- ◆ **Proteoglicanos.**- proteínas con cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG), los cuales son polisacáridos no ramificados, constituidos por unidades repetidas de disacáridos con carga negativa. Se han identificado cuatro tipos de GAG: heparán sulfato, ácido hialurónico, desmatán sulfato y condroitín sulfato (22).
- ◆ **Trombospondina.**- funciona como una molécula de citoadhesión; posee dominios que interactúan con la colágena y fibronectina; se cree que tenga una función en la compartimentalización de las células seminales hematopoyéticas (22).

## **ESTUDIO DE LA HEMATOPOYESIS *IN VITRO***

Para estudiar la hematopoyesis *in vitro* existen principalmente dos tipos de cultivo, el cultivo semisólido y el cultivo líquido de médula ósea a largo plazo (24).

### **Cultivo Semisólido**

El cultivo semisólido se desarrolló entre 1965 y 1970. El propósito de la realización de los cultivos semisólidos es el cuantificar el número de progenitores hematopoyéticos. Estos cultivos permiten evaluar tanto el fenotipo como la fisiología de estos progenitores *in vitro*. El principio de la técnica consiste en cultivar una suspensión de células de la médula ósea en un medio semisólido, que contiene nutrientes, y es suplementado con factores de crecimiento hematopoyéticos. Estas condiciones favorecen el crecimiento de las células progenitoras y la consiguiente formación de colonias. La autorrenovación y crecimiento de progenitores inmaduros es limitado. Los diferentes tipos de células maduras producidas dentro de una colonia refleja el grado del potencial diferenciativo de la célula formadora original (UFC unidad formadora de colonias) (24).

En condiciones de crecimiento óptimas, las UFC, linaje-específico pueden ser categorizadas de acuerdo al tamaño de la colonia. Entre mayor sea el tamaño de la colonia, se puede inferir que el progenitor que la dio origen es más inmaduro, y tardará más tiempo para que toda la prole madure, es decir que todas las células que forman parte de la colonia, tengan un fenotipo maduro. Este periodo varía entre 14-21 días, lo que corresponde al tiempo necesario para que tanto las células que forman parte de una colonia de pocas células como de una de cientos de células maduren y puedan ser cuantificadas. Este tipo de cultivos han sido de gran utilidad para estudiar los distintos factores de crecimiento hematopoyético.

## **Cultivo Líquido de Médula Osea a Largo Plazo (LTMC)**

El cultivo líquido a largo plazo (LTBMC, por sus siglas en inglés); fue desarrollado entre 1973 y 1980 (24). El LTBMC es un sistema de cultivo que permite la autorenovación, proliferación y diferenciación de las células más primitivas (CSH). En estos cultivos se produce una hematopoyesis prolongada (humanos 8-12 semanas), con la producción de células mieloides en todos los estadios de desarrollo (28).

El cultivo líquido a largo plazo permite el crecimiento de células muy inmaduras, las cuales no pueden crecer en otro tipo de sistemas como el cultivo semisólido. Las células inmaduras proliferan y se difrencian en células menos inmaduras (UFC) capaces de formar colonias en cultivos semisólidos, y en células maduras (24,28).

El LTMC no permite directamente la cuantificación de progenitores formadores de colonias, por lo que es necesario tomar células de estos cultivos y sembrarlas en cultivos semisólidos para su cuantificación. Los cultivos líquidos están compuestos por nutrientes, pero a diferencia de los cultivos semisólidos, éstos no contienen factores hematopoyéticos. Esto se debe a que aproximadamente, en la tercera semana de cultivo se desarrolla una capa de células adherentes, denominada capa de células del estroma, que producen y secretan tanto factores de crecimiento como moléculas de la matriz extracelular; los cuales permiten el mantenimiento de los cultivos por 7-8 semanas. Por lo que estos cultivos deben de ser mantenidos por este periodo mediante la remoción de la mitad del medio de cultivo cada semana, y la adición de medio fresco; con la finalidad de remover las sustancias de desecho que se hayan producido y la adición de nutrientes para reponer la perdida por consumo.

La base del mantenimiento de las células inmaduras, al parecer se debe a la interacción de las células hematopoyéticas con la capa de células adherentes derivadas de la médula ósea. La mayor ventaja del LTBMC es que permite el estudio *in vitro* de las interacciones celulares que ocurren entre las células hematopoyéticas y las células del estroma (24).

La capa de células adherentes en el LT BMC se deriva de los elementos no hematopoyéticos de la médula ósea (con excepción de los macrófagos). Esta capa de células adherentes produce y secreta citocinas necesarias para el desarrollo de la hematopoyesis, lo que reemplaza el efecto de los factores hematopoyéticos añadidos exógenamente (24,28).

La capa de estroma o células adherentes se forma entre la segunda y tercera semana del cultivo. Mientras la capa de células hematopoyéticas migran y se adhieren a la capa del estroma, en donde proliferan y forman grandes focos de células del estroma, y posteriormente son liberadas a la fracción soluble. Las células del estroma que crecen *in vitro* son: fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos (28).

Mediante este tipo de sistemas *in vitro* han sido estudiadas muestras tanto de médula ósea normal, cordón umbilical, sangre periférica y de médula ósea proveniente de pacientes con diversas enfermedades hematológicas. Una de ellas son los Síndromes Mielodisplásicos.

## **SINDROMES MIELODISPLASICOS (SMD)**

Los Síndromes mielodisplásicos (SMD) se definen como alteraciones primarias neoplásicas de las células seminales hematopoyéticas (29-33) que tienen la capacidad de transformarse a leucemia aguda (LA). La patofisiología de los SMD es una hematopoyesis ineficaz consecuencia de una maduración anormal de las células precursoras. Las principales líneas afectadas son la eritroide y la mieloide, por lo que se observa una eritropoyesis y una granulopoyesis inefectiva que incluye un decremento en la síntesis de ADN en el ciclo mitótico y un aumento en la muerte celular (apoptosis). Los SMD se caracterizan por citopenias en sangre periférica y por una médula ósea hiperclonal, pero de células inmaduras (29-33).

### **Signos y Síntomas**

Los SMD se presentan con mayor frecuencia en individuos mayores de 50 años de edad, siendo la edad promedio de 70 años (29-33); a pesar de la predominancia en pacientes de edad avanzada, los SMD también han sido descritos en individuos jóvenes y en niños (32). Los hallazgos hematológicos incluyen anemia, neutropenia y/o trombocitopenia. La anemia es la más constante y se presenta en 85% de los pacientes (29-33). El 50% de los pacientes son asintomáticos; si la anemia es severa pueden presentar fatiga y debilidad. Es muy infrecuente que al diagnóstico lo precedan síntomas hemorrágicos (10% de los pacientes) por trombocitopenia o infección (en la tercera parte de los casos), debida a la neutropenia. Entre el 10 y 20% de los pacientes se presenta esplenomegalia, y hepatomegalia en el 5 al 25% de los casos (33).

Es muy infrecuente que los SMD se encuentren asociados con trastornos en la piel. En pacientes con monosomía 7 o deleciones en el cromosoma 7 existe una probabilidad de desarrollar diabetes insipidus. Síntomas comunes pero inespecíficos son, la pérdida del apetito y la pérdida de peso (29-33).

Los pacientes en ocasiones presentan un decremento de las células NK y de linfocitos T cooperadores (29-33). Las principales anomalías se resumen en la siguiente tabla:

	<b>Sangre Periférica</b>	<b>Médula ósea</b>
<b>Serie Eritroide</b>	<b>Anemia</b> , macro-ovalocitosis, poiquilocitosis, anisocitosis, células rojas nucleadas	Eritropoyesis megaloblástica, sideroblastos en anillo
<b>Serie Mieloide</b>	<b>Neutropenia</b> , neutrófilos hipersegmentados, metamielocitos circulantes, pseudo-pelger-hütet	Hiperplasia mieloide, arresto parcial de la maduración en el estadio de mielocito, incremento de las formas monocitoides, formas blásticas (<5-30%)
<b>Serie Trombocitoide</b>	<b>Trombocitopenia</b> , plaquetas disfuncionales, alargadas y atípicas	Número incrementado de megacariocitos, pequeños y granulados

Mayer JR, Canellos GP. 1996 .Leukemia. Saunders Company.

## Historia

A comienzos del siglo XX, comenzaron a surgir reportes en donde se describían una alta mortalidad en trastornos citopénicos, refractarios al tratamiento. Chevallier et al en 1942 propuso el termino de “odo-leucemia”. El eligió el termino griego “odo” que significa comienzo; para resaltar que estos trastornos son el comienzo a la leucemia. En 1949, Hamilton-Peterson utilizó el termino “preleucemia”, para describir a pacientes con anemia refractaria que antecedia al desarrollo de leucemia mieloide aguda (LMA). Cuatro años mas tarde Block y colaboradores ampliaron el concepto para incluir citopenias de todas las líneas.

Desde mediados de siglo, este tipo de trastornos han recibido múltiples denominaciones , dentro de los mas comunes encontramos: “preleucemia”, “síndromes preleucémicos” y “síndromes dismielopoyéticos” (2).

## **Clasificación**

Los SMD pueden ser divididos en primarios; los cuales se refieren a trastornos que se presentan de novo, y secundarios, los cuales incluyen condiciones congénitas o adquiridas. Los SMD secundarios se relacionan con agentes tóxicos, como agentes alquilantes y radiación, o a terapia en el tratamiento de enfermedades malignas (1,33,35). En el presente estudio abordaremos únicamente el estudio de los SMD primarios.

En 1982, el grupo franco-americano-inglés (FAB) propuso un esquema de clasificación para los SMD. Esta clasificación define cinco subgrupos basados en la cuenta de blastos y el grado de displasia tanto de la sangre periférica como de medula ósea. Los cinco subgrupos son:

- Anemia refractaria (**AR**)
- Anemia refractaria con sideroblastos (**ARS**)
- Leucemia mielomonocítica crónica (**LMMC**).
- Anemia refractaria con exceso de blastos (**AREB**)
- Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (**AREB-T**)

En el siguiente cuadro se observa el porcentaje de blastos de acuerdo al subtipo de síndrome mielodisplásico, tanto en sangre periférica como en médula ósea:

<b>TIPO</b>	<b>SANGRE PERIFERICA</b>	<b>MEDULA OSEA</b>
<b>AR</b>	<1% blastos	<5% blastos
<b>ARS</b>	<1% blastos	<5% blastos con sideroblastos que comprenden >15% de las células nucleadas
<b>LMMC</b>	<5% blastos con monocitosis (>1x10 <sup>9</sup> /L)	5-20% blastos
<b>AREB</b>	<5% blastos	5-20% blastos
<b>AREB-t</b>	>5% blastos	20-30% blastos

Mayer JR, Canellos GP. 1996 .Leukemia. Saunders Company.

### **Factores Pronósticos**

La supervivencia media de los pacientes con SMD es de 22 meses. El índice de mortalidad varía de 58 a 72%. Entre el 10 y 50% de los pacientes evolucionan a Leucemia mieloide aguda, dependiendo del tipo de SMD. Los pacientes con AR y ARS pueden permanecer estables por años sin que la anemia o los síntomas empeoren. En pacientes politransfundidos un problema común son las altas cantidades de hierro, lo que puede llevar a hemosiderosis o algunas veces hemocromatosis.

El tiempo de supervivencia es más corto en pacientes con un número incrementado de blastos en la médula ósea. Las causas más comunes de muerte son las hemorragias y las infecciones, ambas resultado de las citopenias (33,35).

Entre el 50 y 70% de los pacientes presentan cariotipos anormales (36). Dentro de los cambios citogenéticos se pueden encontrar anomalías tanto numéricas como estructurales. Las anomalías cromosómicas que se presentan más frecuentemente involucran a los cromosomas 5,7,8,11,12 y 20 (36). Los pacientes con AREB y AREB-T presentan con mayor frecuencia cariotipos anormales, con excepción de la del(5)(q13q133) y de la del(11)(q14q23) que se asocian con AR y ARS respectivamente. Los pacientes con rearrreglos cromosómicos múltiples tienen un alto riesgo de evolucionar a leucemia, mientras que las anomalías únicas, excepto por la monosomía 7 y la 5, tienen una supervivencia similar a los que presentan cariotipos normales (36,37).

	Edad promedio (años)	Supervivencia (meses)	Transformación a leucemia aguda ( % )
<b>AR</b>	68	44	17
<b>ARS</b>	73	55	10
<b>LMMC</b>	72	29	19
<b>AREB</b>	68	17	42
<b>AREB-t</b>	66	5	51

Mayer JR, Canellos GP. 1996 .Leukemia. Saunders Company.

## Tratamiento

No existe una terapia específica ni efectiva para eliminar a la clona displásica. El tratamiento principal consiste en terapéutica de sostén, incluyendo transfusiones y antibióticos (29-33). Sin embargo, existen protocolos que involucran la utilización de diversas terapias, entre las que se encuentra el uso de quimioterapia. La quimioterapia se inicia con mayor frecuencia en pacientes que han evolucionado a leucemia mieloide aguda (LMA), debido a que en pacientes con SMD no tiene un buen pronóstico. El trasplante de médula ósea alogénico (TMOA), parece tener un mejor pronóstico, aunque a la fecha no existen suficientes estudios para poder corroborarlo (32). Además del uso de la quimioterapia y del TMOA, se han realizado otros intentos clínicos como es el uso de factores de crecimiento y el uso de agentes inductores de la diferenciación. Dentro de los agentes inductores de la diferenciación se encuentran los retinoides, los interferones, la 1,25 dihydroxyvitamina D3 y el HMBA y 5-Aza-2' deoxycytidina. Desafortunadamente estos agentes aunque han demostrado utilidad en otros padecimientos como la leucemia promielocítica aguda; y han demostrado disminuir el porcentaje de blastos *in vitro*; en pacientes con SMD el uso de estos agentes resulta en una respuesta parcial y poco durable; en algunos casos se mejoran los parámetros hematológicos, pero no se reducen ni los blastos en médula ósea, ni la progresión a leucemia.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado un mejor efecto de los agentes inductores de la diferenciación cuando se utilizan en combinación con factores hematopoyéticos. Estudios combinando ATRA y G-CSF; y nTRA mas G-CSF, Epo y tocoferol; han demostrado un incremento en la cuenta absoluta de neutrófilos en el 95%, además de una mejoría en otros parámetros hematológicos y un decremento en el requerimiento de transfusiones, así como un aumento en el número de BFU-E *in vitro*. Al parecer la combinación de diferentes agentes en el tratamiento de los SMD es prometedor, pero aun hacen falta mas estudios en donde se puedan utilizar estos agentes en el tratamiento tanto de pacientes considerados con un SMD menos agresivo (RA y RARS), como en pacientes en los que el uso de quimioterapia y TMOA no es de buen pronóstico (39).

## ANTECEDENTES

Estudios bioquímicos y moleculares han demostrado que la hematopoyesis en los pacientes con SMD es monoclonal (42); análisis clonales han demostrado que la mayoría de las células mieloides maduras y monocitos derivan de la clona maligna; sin embargo se ha observado que la clona anormal coexiste con la clona normal, la cual se ve desplazada, al adquirir la clona transformada, una ventaja de crecimiento (42).

Los primeros estudios *in vitro* se enfocaron al estudio de los progenitores granulomonocíticos en los pacientes con SMD. Greenberg, en 1979, describió un bajo crecimiento de UFC-GM en 79% de las muestras analizadas, lo cual ha podido corroborarse con diversos estudios (44-46). Dan en 1993, encontró una disminución en el número de progenitores UFB-E, UFC-GM y UFC-Meg en 21 muestras de pacientes con SMD, y en algunos casos ausencia de colonias UFC-Meg (67% de los pacientes). Es importante remarcar que el número de colonias eritroides se encontró muy disminuído en la mayoría de las muestras, sin embargo, fue particularmente muy bajo o incluso se encontró ausencia en muestras de AREB y AREB-t. Por el contrario, dos muestras de AR mostraron niveles de UFB-E semejantes al control, interesantemente en estas muestras los números de colonias de UFC-GM y UFC-Meg fueron normales también.

Los estudios en cultivo a largo plazo, muestran una disminución en la cinética de células mononucleares tanto en la capa adherente como en la no adherente (47), a excepción de la cinética de un caso de LMMC, el cual fue reportado por Coutinho en 1993, en donde la cinética de crecimiento es superior a la del control. En cuanto a la cinética de crecimiento de los progenitores hematopoyéticos, únicamente se ha reportado la cinética de los progenitores granulomonocíticos, la cual es inferior a la del control (a excepción del caso de LMMC) (47).

Tanto en los estudios en cultivo a largo plazo como en cultivos semisólidos, la mayoría de los casos estudiados han correspondido a los subtipos AR y AREB (44,47,48).

Los estudios realizados acerca del MH son contradictorios, ya que trabajos realizados en cultivos de médula ósea a largo plazo (LTBMC) han demostrado anormalidades en la capa de estroma (Borbenyi, 1987). Por su parte Coutinho et al en 1993 encontró que el número de UFC-F (unidades formadoras de colonias de fibroblastos) era normal, así como un incremento en el número de células adiposas. Este autor concluye que no existen anormalidades en la capa de estroma, ya que ésta tiene la capacidad de mantener la hematopoyesis de células normales y por lo tanto el microambiente hematopoyético de los pacientes con SMD es normal. Sin embargo estudios realizados por Ohmori et al en 1993, describieron que los macrófagos de los pacientes con SMD inhiben el crecimiento de las UFC-GM normales. Ellos encontraron que dicha inhibición estaba mediada por  $TNF\alpha$  y ferritina. Por otra parte los macrófagos de los pacientes con SMD no suprimen a las UFC-GM mielodisplásicas, por lo que proponen que en el microambiente hematopoyético de los pacientes con SMD pueden existir factores secretados por las células SMD que inhiben a la clona normal, y/o que existen factores que estimulan a la clona anormal.

Analizando las concentraciones de factores hematopoyéticos en los cultivos, estudios realizados por Visani et al (48) describen una producción disminuida de FEC-GM, en el sobrenadante de los cultivos, y niveles normales de interleucina 6 (IL-6) y  $TNF\alpha$ ; lo cual difiere con lo encontrado en las biopsias de médula ósea, en donde se encontraron niveles elevados de dicha citocina (59). Masters et al (49), analizando los niveles del ligando del receptor c-kit (stem cell factor) encontraron que los pacientes con SMD tienen niveles inferiores de dicha citocina.

Utilizando una técnica que mide simultáneamente proliferación celular y apoptosis, se encontró que en los SMD existe una alta tasa de proliferación, la cual se ve abatida por una alta tasa de muerte celular por apoptosis, tanto en células hematopoyéticas como en células del estroma (47-52).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios anteriores, han descrito que los progenitores de pacientes con SMD tienen un crecimiento anormal en cultivo (44-50). Estos trabajos han hecho especial énfasis en el crecimiento de progenitores mieloides, pero no se analizan sus distintos subtipos, es decir (UFC-G, UFC-M y UFC-GM). Por otra, algunos de estos estudios analizan también a los progenitores eritroides, sin embargo, en ellos no se diferencia entre progenitores eritroides maduros e inmaduros. En ninguno de estos trabajos se reporta el crecimiento de las colonias multipotenciales (UFC-MIX). Lo anterior indica que hasta la fecha no existe ningún estudio en donde se analicen conjuntamente los distintos tipos de progenitores hematopoyéticos. Esto es de gran relevancia debido a que los progenitores de SMD pueden presentar no solamente anomalías en el número de progenitores, sino también en la composición de los mismos.

Además de lo anterior, es importante recalcar que en estos estudios no se ha caracterizado la cinética de los progenitores hematopoyéticos presentes en la capa de los cultivos a largo plazo. Esto es de gran importancia ya que nos permitiría conocer la biología de los progenitores hematopoyéticos de pacientes con SMD interactuando con el MH desarrollado *in vitro*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar cualitativa y cuantitativamente a los distintos tipos de progenitores hematopoyéticos presentes en la médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico *in vitro*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ◆ Evaluar el número y tipo de progenitores hematopoyéticos desarrollados en cultivos semisólidos de médula ósea de pacientes con SMD.
  
- ◆ Estudiar la cinética de crecimiento de las células mononucleares presentes en los cultivos líquidos de médula ósea a largo plazo.
  
- ◆ Evaluar la cinética de crecimiento de los progenitores mieloides, eritroides y multipotenciales presentes en los cultivos de médula ósea a largo plazo.



## **METODOLOGIA**

Las muestras de pacientes con SMD fueron obtenidas en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Los pacientes fueron sometidos a la toma de un aspirado de médula ósea en la cresta ilíaca postero-superior, como parte de las pruebas que se realizan para diagnóstico. Las muestras fueron obtenidas bajo anestesia local, en jeringas de plástico estériles heparinizadas; se recolectaron entre 3 y 5 ml. La médula ósea de sujetos hematológicamente sanos se obtuvo de los donadores de médula ósea para trasplante alogénico, realizados en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

### **Obtención de las Células Mononucleadas (CMN)**

La muestra de médula ósea se homogeneiza y se coloca en un tubo de plástico estéril para centrifugación (1200rpm, 7 minutos a 15° c). Después de la centrifugación se obtiene el plasma y se guarda en tubos para congelación (nalgene® cryowale™) de 5ml. La capa superior de células o "buffy coat" se separa y se resuspende en PBS (Buffer Salino de Fosfatos 7.2 -Life Technologies™) para tener una relación de 2ml de PBS por 30-35 millones de células nucleadas y 4ml de Ficoll (Ficoll-paque™ PLUS Pharmacia Biotech). Se centrifuga a 2300 rpm, 20 minutos a temperatura ambiente. Este sistema divide a los elementos celulares en dos fracciones principales: granulocitos y eritrocitos que precipitan en la pastilla y células mononucleares que permanecen en la interfase, la cual se separa y se somete a dos lavados con PBS, centrifugando a 1200 rpm, 7 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar por segunda vez con PBS se retira el sobrenadante y se resuspende la pastilla con medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) con 2% de suero fetal bovino (FBS - Stem Cell Technologies Inc). La pastilla debe de resuspenderse en una cantidad conocida de medio, para que se pueda realizar el conteo de células (24).

## **Conteo de células**

La cuenta de células nucleadas se realiza utilizando una muestra de médula ósea mezclada con una solución que causa lisis a las células rojas (líquido de Turck). El procedimiento se lleva a cabo tomando 10 $\mu$ l de la suspensión y mezclándola con 90 $\mu$ l de líquido de Turck (almacén de reactivos del IMSS). Se dejan pasar unos minutos para que el líquido pueda lisar a las células rojas y se vierten 10 $\mu$ l de la suspensión en el hemocitómetro. El hemocitómetro se coloca en un microscopio óptico a 10x, y se cuentan las células que se encuentren dentro de la cuadrícula con la ayuda de un contador. Posteriormente se hace la relación del número de células multiplicando el volumen de la suspensión de la muestra de médula ósea (ml) por la dilución (10), por el número de células por cuadrícula, por una constante (10,000) (1,2).

## **Cultivos Semisólidos**

El procedimiento que se lleva a cabo es el siguiente: se adicionan 50 000 células nucleadas a un tubo que contiene 1.3 mL de metilcelulosa (Stem Cell Technologies Inc), suero fetal de bovino, 2-mercaptoetanol, penicilina, estreptomycin y citocinas recombinantes: FEC-GM, Epo, Stem Factor e IL-3. Se agita en vortex para homogeneizar. Con una jeringa estéril de 3mL con aguja de punta roma estéril, se aspira la suspensión, y se coloca en placas de 35mm de diámetro. El cultivo se coloca en cajas petri de 100x20mm con otra placa que contenga agua estéril, sin tapa. Se coloca en la incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y a una humedad relativa de 80%. Después de 14-21 días se cuentan las colonias en el microscopio invertido (24).

## Conteo de colonias

Se cuantifican las colonias, y dependiendo de su morfología se clasifican en colonias mieloides, las cuales son colonias de color blanquecino; colonias eritroides, que se observan de color rojo, y finalmente colonias multipotenciales o mixtas, en este tipo de colonias se observan células tanto rojas como blancas (24).

Dentro de las colonias mieloides vamos a distinguir tres tipos; las colonias de granulocitos (UFC-G), las colonias de monocitos (UFC-M), y las colonias bipotenciales o de granulomonocitos (UFC-GM). Las colonias UFC-G, son colonias compuestas por células de tamaño pequeño, redondas con la membrana muy bien definida y refringentes. Las colonias de UFC-M son colonias compuestas por células de mayor tamaño que las de granulocitos, son células no refringentes y la colonia generalmente presenta menor número de células que la de granulocitos. Finalmente las colonias UFC-GM, están compuestas por ambos tipos celulares, generalmente son colonias de mayor tamaño que las de granulocitos o las de macrófagos.

Dentro de las colonias eritroides podemos distinguir dos tipos, una de ellas formada por un progenitor inmaduro denominada UFB-E, es una colonia de color rojo, con células muy pequeñas, de menor tamaño que las de granulocitos, la colonia es muy densa, y puede o no contener lóbulos. El otro tipo de colonia eritroide, es la formada por un progenitor mas maduro UFC-E, por lo que el tamaño de la colonia va a ser menor, así como usualmente la intensidad del color rojo de la colonia es menor.

Las colonias mixtas o multipotenciales son formadas por progenitores muy inmaduros. Estas colonias se distinguen por contener células tanto eritroides como mieloides, su tamaño puede ser variable.

## **Cultivo líquido de médula ósea a largo plazo**

La técnica para llevar a cabo estos cultivos es la siguiente; se utiliza una suspensión celular con  $3 \times 10^6$  células nucleadas por cada mL de medio de LTBM, el cual contiene: medio alfa, suero fetal de bovino, suero de caballo, ácido fólico, transferrina, 2-mercaptoetanol, hidrocortizona, antibióticos (Stem Cell Technologies Inc). A la suspensión, se le agrega hidrocortizona ( $10^{-6}$  M), y se agita. Se adiciona 1 mL de la suspensión en cada uno de los pozos centrales, de las placas de 24 pozos. A los pozos de alrededor se les adiciona agua estéril. La placa se incuba 4 días a  $37^{\circ}\text{C}$ , después del cuarto día se incuba a  $33^{\circ}\text{C}$ . En el día 7, se realiza el cambio de medio, el cual se realiza removiendo la mitad del medio y agregando la misma cantidad de medio fresco. Del medio que se removió, se hace una cuenta de células nucleadas, y se siembra en cultivo semisólido. El mismo procedimiento se realiza cada 7 días hasta llegar al día 49. A partir de la semana 3, algunos pozos fueron sacrificados para el análisis de las células adherentes, las cuales se obtienen mediante la adición de  $500\mu\text{l}$  de tripsina, después de 10 minutos de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  se agregan  $300\mu\text{l}$  de suero fetal bovino. Posteriormente se separa la capa adherente y se realiza una cuenta de células nucleadas, y se siembra en cultivo semisólido. Este procedimiento se realiza en la semana 3, 5 y 7 (24,28).

# RESULTADOS Y DISCUSION

## I.- PACIENTES

Se estudiaron 11 muestras de pacientes con SMD, de las cuales 6 correspondieron al subtipo de anemia refractaria (AR), 1 al subtipo anemia refractaria con exceso de blastos (AREB), 2 al subtipo de anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t) y 2 al subtipo de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). Se estudiaron 6 muestras de médula ósea normal como control. En este estudio la mayor parte de las muestras correspondieron al subtipo AR (55%), lo cual correlaciona con el estudio realizado por Coutinho et al 1993 (grupo británico)(56), en donde estudiaron 50 muestras de SMD. Sin embargo difiere de un estudio realizado por Soligo et al. 1994 (grupo italiano), en el cual el subtipo más frecuente correspondió al de AREB (60). A diferencia de otros estudios (47,56,60) nosotros encontramos una frecuencia de casos de LMMC alta (18%), mientras que en estos estudios o no se reporta ningún caso, o éstos ocupan el 2 y 5% del total de las muestras, respectivamente.

Se encuentra reportado que en los pacientes con SMD, la anemia es la alteración hematológica más constante y se presenta en 85% de los pacientes (29-33). Dentro de los pacientes incluidos en este estudio, el 80% presentó anemia. En cuanto al número de leucocitos se presentó una amplia variabilidad, el 30% de los pacientes tenían leucopenia (los tres casos correspondieron al subtipo AR), otro 30% presentó niveles normales (incluyendo los subtipos AR, AREB y AREB-t) y el 40% restante mostró datos clínicos de leucocitosis, incluyendo un caso de AR, uno de AREB-t, y los dos casos de LMMC, en donde es importante recalcar, que presentaron los niveles más altos de leucocitos. En cuanto al número de plaquetas, el 82% de los pacientes presentó plaquetopenia en algunos casos severa. Únicamente en 2 de las 11 muestras se encontraron niveles normales de plaquetas, en ninguno de los casos se presentó trombocitosis. Los casos de AREB-t y LMMC presentaron el porcentaje de blastos más elevado ( tabla 1).

TABLA 1

PARAMETROS HEMATOLOGICOS DE LOS PACIENTES

Muestra	Hb g/dl	Leucocitos $\times 10^3 / \mu l$ sangre	Plaquetas $\times 10^3 / \mu l$ sangre	%Blastos m.o.	%Blastos s.p.	Edad	Sexo	TIPO DE SMD
WS	10.8	16.2	135	0	0	71	F	AR
DR	13.5	2.8	120	0	0	53	F	AR
GC	14.9	9.6	42	2	0	73	M	AR
HP	10.8	NP	1.3	0	0	44	M	AR
LM	10.4	3.8	186	0	0	84	F	AR
RR	10.8	1.9	72	0	0	55	F	AR
MG	10.4	7.3	49	0	0	67	F	AREB
LLF	7.7	13	6	30	13	68	F	AREB-t
LA	11.4	6.7	16	6	0	69	M	AREB-t
CL	NP	27.5	23	15	12	59	M	LMMC
ES	7	120	250	30	40	30	F	LMMC
NORMAL	12.2-18.1	4.6-10.2	142-424	0	0	-	-	-

Hb.-hemoglobina, m.o. médula ósea, s.p. sangre periférica. F, femenino, M, masculino  
 NP.-no proporcionado

## II.- CRECIMIENTO DE LOS PROGENITORES HEMATOPOYETICOS EN CULTIVO SEMISOLIDO

El crecimiento de los progenitores hematopoyéticos presentes en los pacientes con SMD en **cultivos semisólidos** de día cero, presentó progenitores mieloides en el 100% de las muestras. Los progenitores eritroides y multipotenciales (mixtos) únicamente se encontraron presentes en el 60 y 30% de las muestras, respectivamente. Únicamente el 10% del total de las muestras presentaron niveles normales de progenitores mieloides y mixtos, y en ninguna de las 11 muestras analizadas se encontraron niveles normales de progenitores eritroides.

En médula ósea normal, el 53% de las colonias que crecen en cultivo son colonias de tipo mieloides, dentro de las cuales la mayoría corresponde a progenitores monopotenciales (UFC-G (fotografía 1) y UFC-M (fotografía 2) ) y un menor porcentaje a progenitores bipotenciales (UFC-GM (fotografía 3) ). Los progenitores eritroides también se encuentran en una alta proporción (45%), aunque ésta siempre es menor a la de los mieloides. Dentro de los progenitores eritroides, encontramos una mayor proporción de progenitores eritroides inmaduros (UFB-E (fotografía 4) ) que maduros (UFC-E (fotografía 5)). Finalmente los progenitores más escasos fueron los progenitores mixtos (UFC-MIX (fotografía 6)) los cuales ocupan el 2% del total de colonias (tabla 2, gráficas de barras 3 y 4).

Analizando los diferentes tipos de progenitores hematopoyéticos por subtipo clínico encontramos que en el subtipo AR el 69% de las colonias son de tipo mieloides, el 30% de tipo eritroide y el 1% mixtas, lo cual es semejante al control; sin embargo se puede observar que en promedio, el número de estos progenitores está disminuído en un 40% (a pesar de que las muestras presentaron un crecimiento muy heterogéneo). En cuanto a la composición de las colonias mieloides, se mantiene la misma proporción del tipo de progenitores que en el control, a diferencia de los progenitores eritroides, de los cuales se presentaron más progenitores maduros que inmaduros (tabla 2, gráficas de barras 3 y 4).

Esto concuerda con otros estudios (46,47) en donde también se reporta una gran heterogeneidad en el crecimiento de los progenitores de este subtipo.

El subtipo clínico AREB estuvo representado únicamente por un caso, en el cual se presentó un crecimiento anormal ya que el número total de progenitores correspondió al 13% del control y el 100% de los progenitores correspondieron a progenitores del tipo mieloides, no encontrándose progenitores ni eritroides ni multipotenciales. Analizando la composición de los progenitores mieloides, también encontramos anomalías, ya que el 100% de los progenitores mieloides fue del tipo de granulocitos. No se presentaron colonias bipotenciales, ni colonias de macrófagos (tabla 2, gráficas de barras 3 y 4).

Los progenitores de AREB-t también presentaron un crecimiento irregular, ya que el 99% de las colonias observadas correspondieron al tipo mieloides y su número fue del 34% con respecto al control. Únicamente una de las dos muestras presentó progenitores eritroides, pero en niveles muy bajos, y en ninguno de los dos casos se detectaron colonias mixtas o multipotenciales. No se encontró diferencia en la composición de las colonias mieloides con respecto al control, sin embargo el 100% de los progenitores eritroides eran progenitores maduros (tabla 2, 3 y 4). Esto difiere con el estudio realizado por Dan et al (46) quienes en dos muestras analizadas de este subtipo no detectaron el crecimiento de progenitores eritroides, lo cual puede deberse a que estos autores únicamente estudiaron progenitores inmaduros (UFB-E), y los que se reportan en el presente estudio son progenitores maduros.

A diferencia del crecimiento de los otros subtipos, los dos casos de LMMC fueron los únicos en presentar niveles de progenitores mieloides por arriba del control. En la proporción de estos progenitores se puede observar un ligero aumento en progenitores de granulocitos, sin embargo se mantiene el mismo patrón. Por otra parte, no se detectó la presencia ni de progenitores eritroides ni de progenitores multipotenciales.

La morfología de las colonias fue normal, únicamente en los subtipos AREB y AREB-t se detectó la presencia de colonias mieloides anormales, las cuales se distinguen por ser colonias muy pequeñas, compactas con un bajo número de células por colonia, por lo que se denominan "clusters" ( fotografía 7).

Estos hallazgos concuerdan con el estudio realizado por Dan et al (46) en donde reportan la presencia de clusters en éstos subtipos, sin embargo estos autores también encuentran este tipo de colonias en el subtipo AR.

En el estudio realizado por Visani et al (48) en donde estudiaron 15 muestras de pacientes con SMD, se incluyeron únicamente los subtipos AR y AREB, y no se encontró crecimiento de colonias mixtas en ninguno de los casos evaluados. Esto difiere con lo encontrado en este estudio para el subtipo AR, en donde encontramos progenitores mixtos en el 50% de las muestras analizadas. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado para el subtipo AREB, en el que no se observó la presencia de ningún progenitor multipotente.

En otros trabajos realizados no se reporta el crecimiento de las colonias por subtipo clínico, sino únicamente como SMD en general (44, 45 y 50) por lo que no podemos hacer una comparación detallada. Es importante hacer notar que en ninguno de estos trabajos se estudió el crecimiento de todos los progenitores hematopoyéticos, en la mayoría únicamente se reporta el crecimiento de progenitores UFC-GM, en los que se engloban los 3 tipos de progenitores mieloides, y en el caso de progenitores eritroides, no distinguen entre maduros e inmaduros.

**TABLA 2****NUMERO DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS EN  
CULTIVO SEMISOLIDO DE DIA CERO****No. progenitores hematopoyéticos / 10<sup>5</sup> células nucleadas**

	<b>MIELOIDES</b>	<b>ERITROIDES</b>	<b>MULTIPOTENCIALES</b>
AR (6)	135±108	59±60	4±5
AREB (1)	31	DD	DD
AREB-t (2)	79±49	1±1	DD
LMMC (2)	472±326	DD	DD
nBM (2)	230±52	222±52	8±5

Mieloides : UFC-G, UFC-M, UFC-GM. Eritroides : UFB-E, UFC-E. Mixtas : UFC-MIX  
DD.-debajo de los niveles detectables. ( ) número de casos

AR: anemia refractaria

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

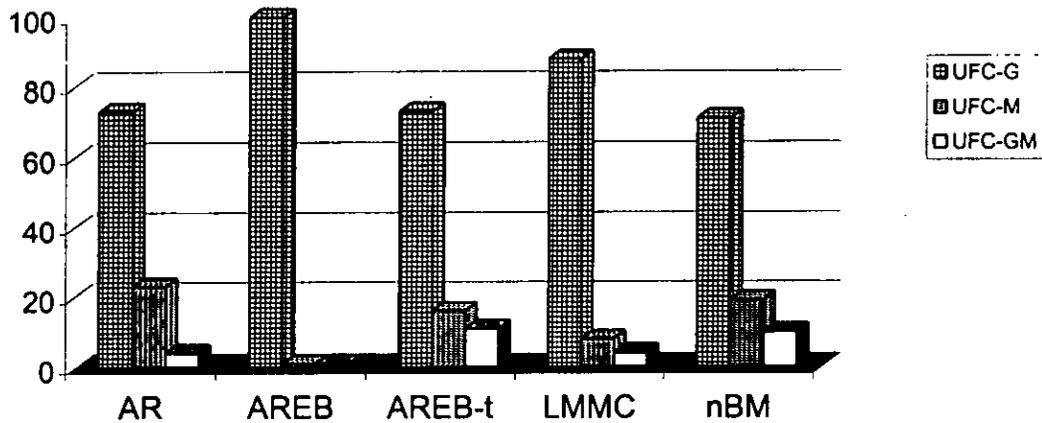
AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

nBM: médula ósea normal, control

# GRAFICA DE BARRAS 1

## PORCENTAJE DEL TIPO DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS MIELOIDES PRESENTES EN CULTIVO SEMISOLIDO DE DIA CERO

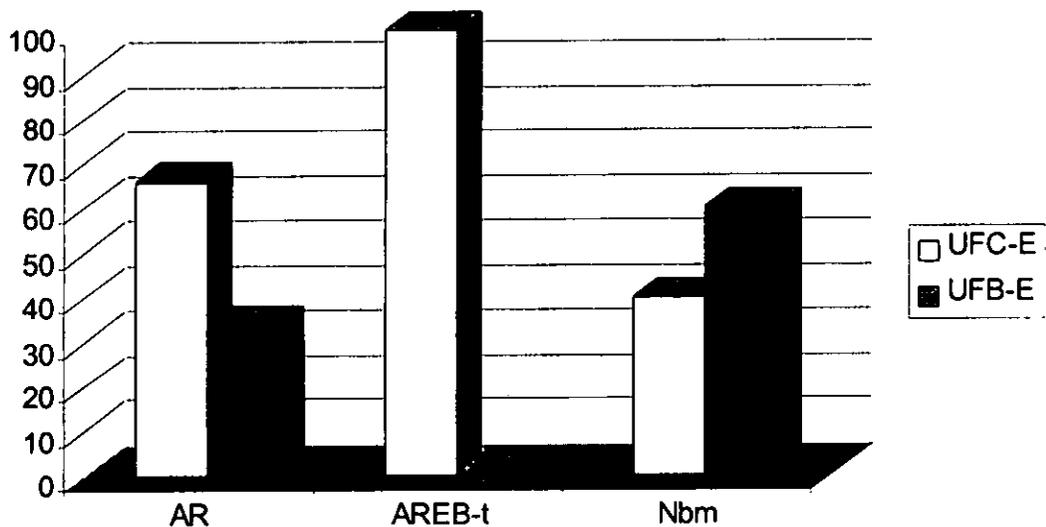


UFC-G: unidad formadora de colonias de granulocitos  
UFC-M: unidad formadora de colonias de macrófagos  
UFC-GM: unidad formadora de colonias granulo-monocíticas  
( ) número de casos

AR: anemia refractaria  
AREB: anemia refractaria con exceso de blastos  
AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación  
LMMC: leucemia mielomonocítica crónica  
nBM: médula ósea normal, control

## GRAFICA DE BARRAS 2

### PORCENTAJE DEL TIPO DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS ERITROIDES PRESENTES EN CULTIVO SEMISOLIDO DE DIA CERO



UFC-E: unidad formadora de colonias eritroides

UFB-E: unidad formadora de brote eritroide

( ) número de casos

AR: anemia refractaria

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

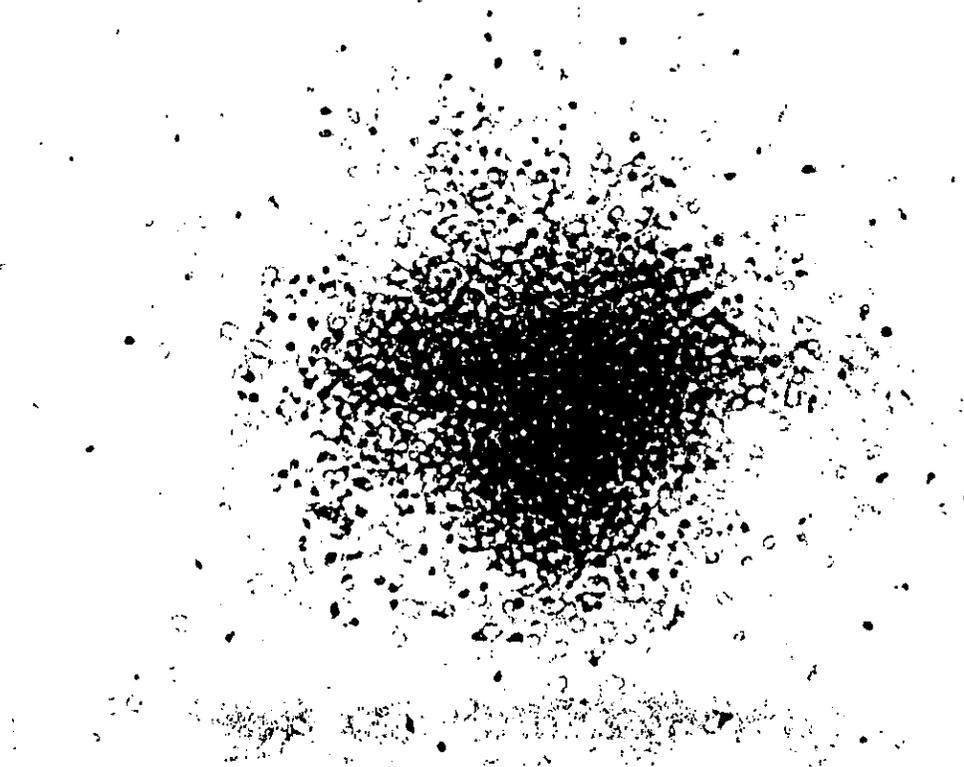
AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

nBM: médula ósea normal, control

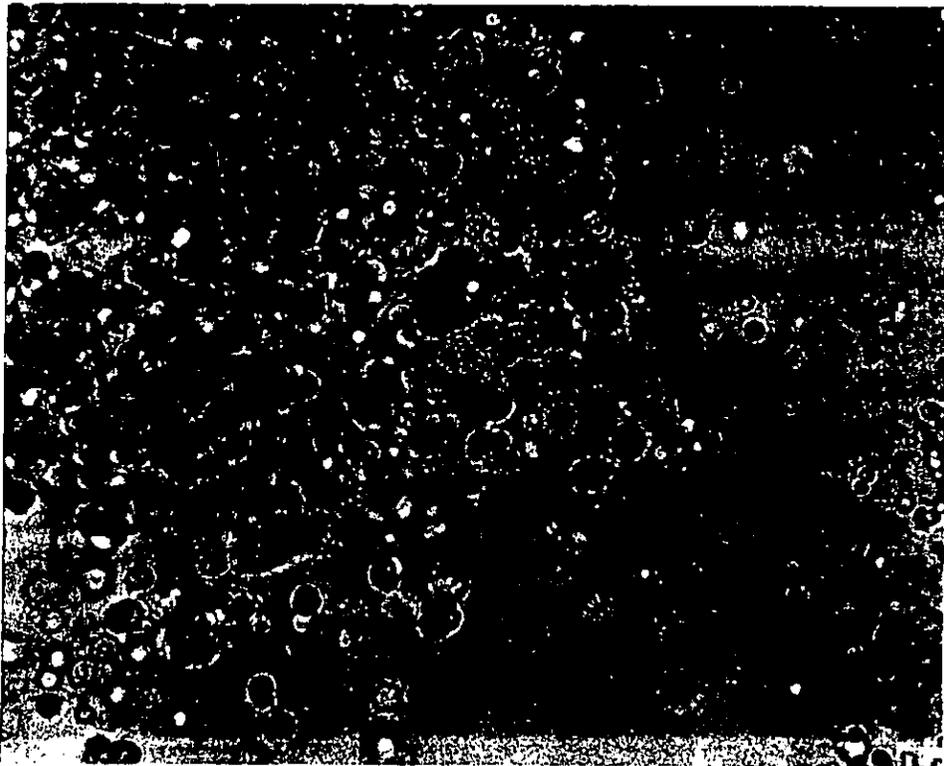
## FOTOGRAFIA 1

Colonia mieloide de granulocitos (UFC-G)



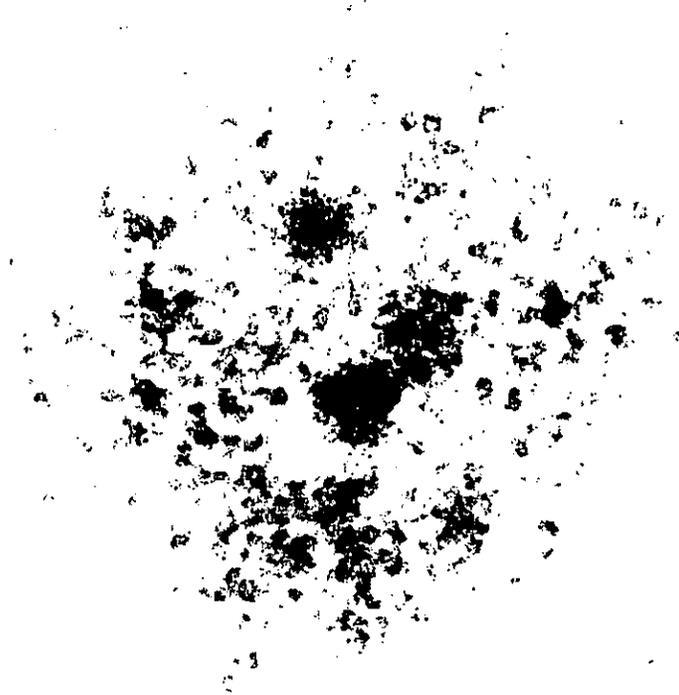
## FOTOGRAFIA 2

Colonia mieloide de monocitos (UFC-M)



### **FOTOGRAFIA 3**

Colonia mieloide de granulo-monocitos (UFC-GM)



### **FOTOGRAFIA 4**

Colonia eritroide inmadura (UFC-E)



## FOTOGRAFIA 5

Colonia eritroide madura (UFB-E)



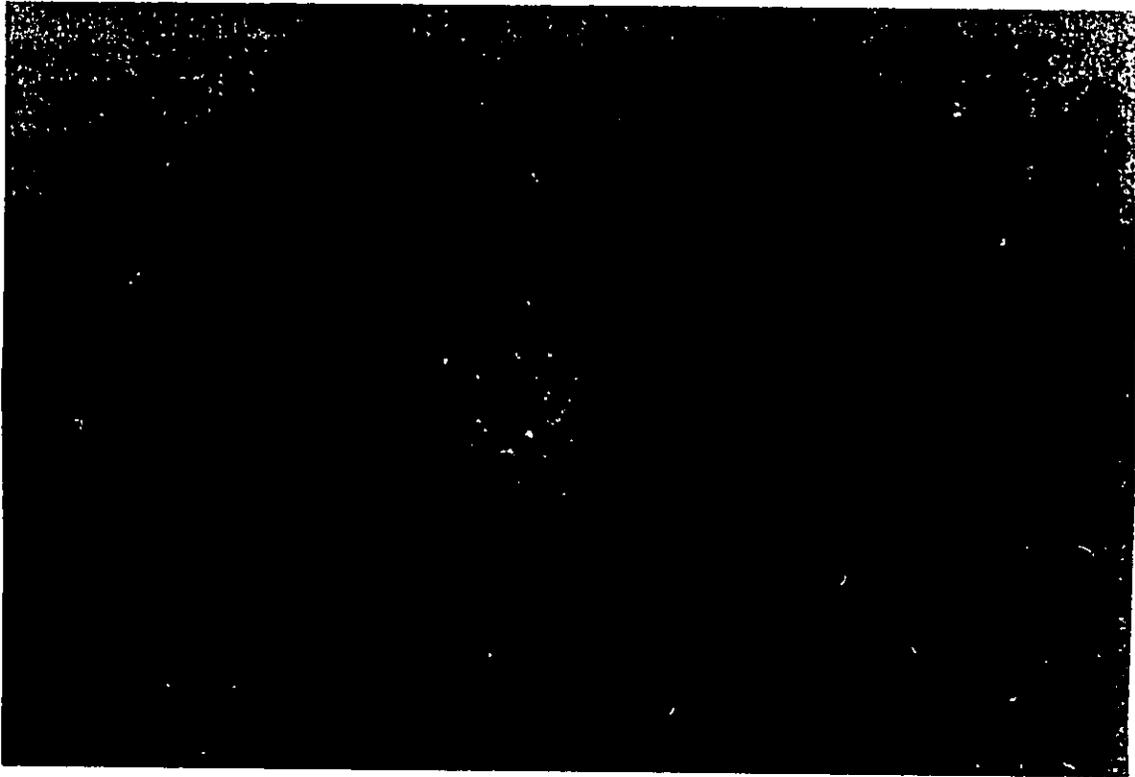
## FOTOGRAFIA 6

Colonia multipotencial (UFC-MIX)



## FOTOGRAFIA 7

“Cluster” de paciente con SMD



### III.- CRECIMIENTO DE LOS PROGENITORES HEMATOPOYETICOS EN CULTIVOS LIQUIDOS TIPO DEXTER DE MEDULA OSEA A LARGO PLAZO

#### CINETICA DE CELULAS NUCLEADAS

En los cultivos de médula ósea normal las células mononucleares no adherentes presentaron una cinética decreciente (gráfica 1), esto se debe a que cada semana se remueve la mitad del medio de cultivo y se reemplaza con medio nuevo, es decir que cada semana se retira la mitad de la población celular. Nuestra cinética del control fue semejante a la reportada en otros estudios (44,47).

La cinética de CMN en los subtipos AR, AREB y AREB-t fue semejante al control. Esto difiere del estudio realizado por Borbenyi et al (44), en donde se aprecia una franca disminución en la cinética de SMD. Esto puede deberse a que en dicho estudio el 75% de las muestras eran del subtipo AREB y los autores únicamente reportan la media de todos los subtipos. La cinética de las células de LMMC se encuentra ligeramente aumentada con respecto al control después de la cuarta semana, manteniéndose un alto número de células aún en la semana 7 (gráfica 1); esto concuerda con el estudio realizado por Coutinho et al (47); en este trabajo.

La cinética de células adherentes se comportó de manera muy semejante en todos los subgrupos, por lo que en la gráfica 2 se muestra la media y desviación estándar de todos los subtipos. El crecimiento fue muy parecido al control en las tres semanas (fotografía 8 y 9), lo cual difiere de los resultados reportados por Borbenyi (44), quien reporta la cinética de células adherentes de pacientes con SMD inferior al control. Esto puede deberse a la misma razón que en el caso de células no adherentes, o bien a diferencias en el tipo de placa de cultivo.

De acuerdo a estos resultados podemos concluir que la cinética de las células nucleadas de pacientes con SMD no presenta alteraciones significativas con respecto al control. Esto es particularmente evidente en la cinética de células adherentes.

## **CINETICA DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS**

En este tipo de cultivo se evaluó la cinética de proliferación de los distintos tipos de progenitores hematopoyéticos. Como se observa en la gráfica 3 los progenitores mieloides de médula ósea normal (UFC-G, UFC-M y UFC-GM) presentaron un descenso continuo, sin embargo sus niveles fueron significativos hasta la semana 7.

Los progenitores de pacientes con AR, AREB y AREB-t tuvieron un crecimiento inferior al control. Los casos de AREB-t y AR mostraron un crecimiento muy semejante entre sí, llegando a niveles no detectables entre los días 42 y 49. En el caso de AREB, su decremento fue mucho más marcado; los progenitores mieloides desaparecieron del cultivo en la segunda semana, encontrándose únicamente pequeños clusters de morfología semejante a las UFC-M pero con menos de 50 células, por lo que no fueron contabilizados como colonias. Esto concuerda con otros estudios (44, 47) en los cuales se reporta que el crecimiento de los progenitores mieloides de pacientes con SMD es inferior al control.

En LMMC encontramos una cinética superior a la del control, manteniéndose con un número de progenitores elevado durante todo el cultivo. Esto no concuerda con lo reportado por Coutinho (47) en donde estudió un caso de LMMC y encontró una cinética inferior a la del control (gráfica 3).

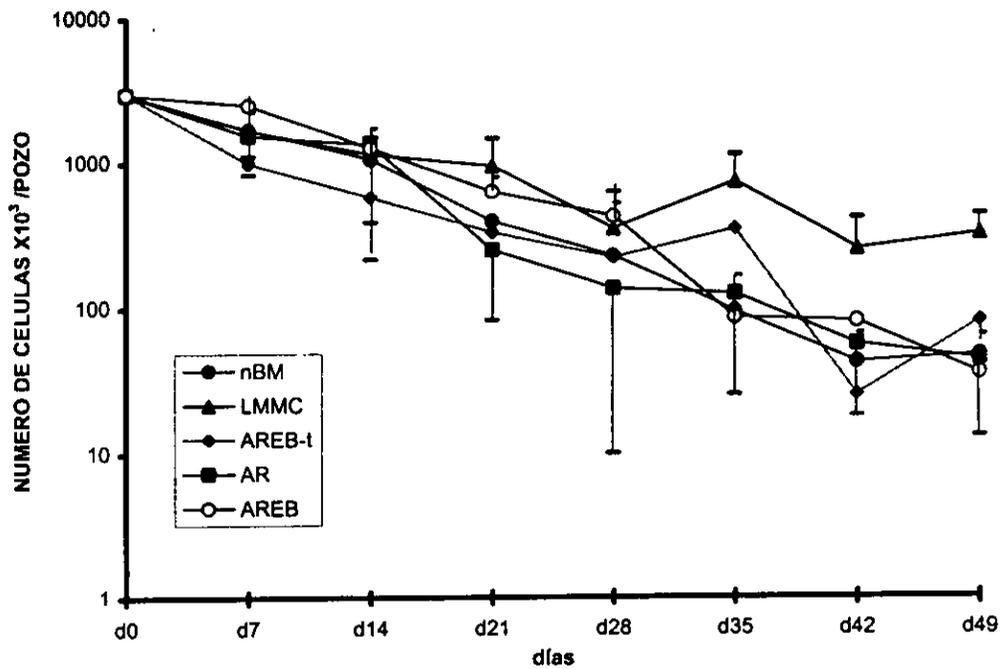
Los **progenitores eritroides** incluyeron tanto a los progenitores maduros (CFU-E), como a los inmaduros (BFU-E). Este tipo de progenitores fue detectado únicamente en 4 muestras de pacientes con AR. En todas las muestras los niveles de los progenitores fueron inferiores al control desde el día cero. En la muestra AR(HP) éstos progenitores se presentaron en el cultivo hasta el día 28, a diferencia de las otras 3 muestras, de las cuales los progenitores desaparecieron en la primera y segunda semana del cultivo (gráfica 4).

En la cinética de los **progenitores multipotenciales** (mixtos), el crecimiento anormal es mucho más dramático (gráfica 5). Los progenitores multipotenciales fueron detectados únicamente en 2 de las 6 muestras de AR. Aún cuando sus niveles fueron semejantes al control en el día 0, desaparecieron del cultivo en la primera y segunda semana, a diferencia del control en donde se detectaron este tipo de progenitores hasta el día 21.

La cinética de progenitores eritroides y multipotenciales no puede ser comparada con otros estudios debido a que el presente trabajo es el primero en reportarlas.

## GRAFICA 1

### CINETICA DE CELULAS NUCLEADAS NO ADHERENTES EN CULTIVO LIQUIDO



nBM: médula ósea normal

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

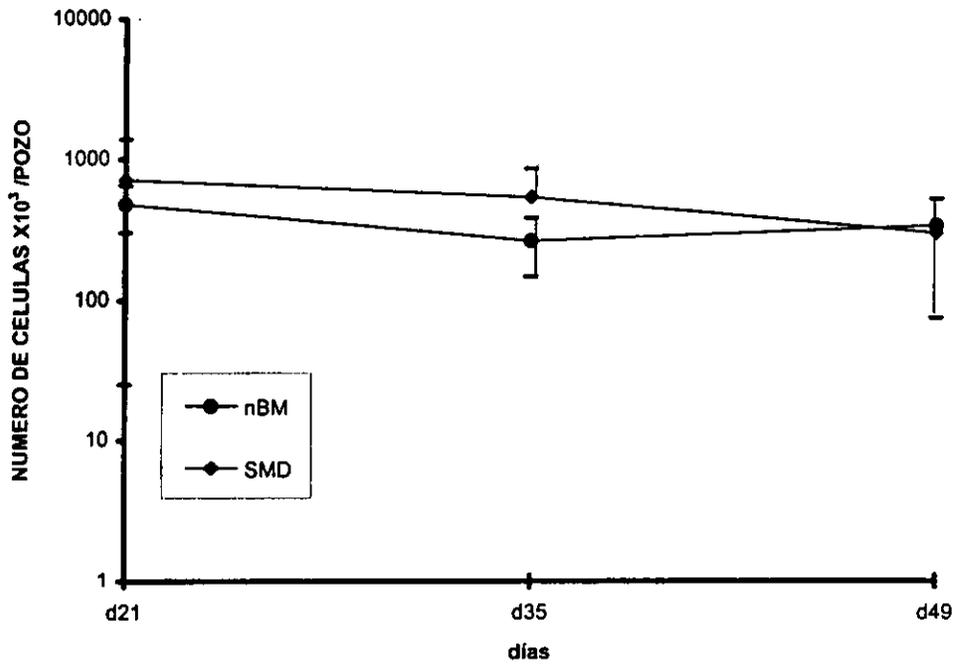
AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

AR: anemia refractaria

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

## GRAFICA 2

### CINETICA DE CELULAS NUCLEADAS ADHERENTES EN CULTIVO LIQUIDO

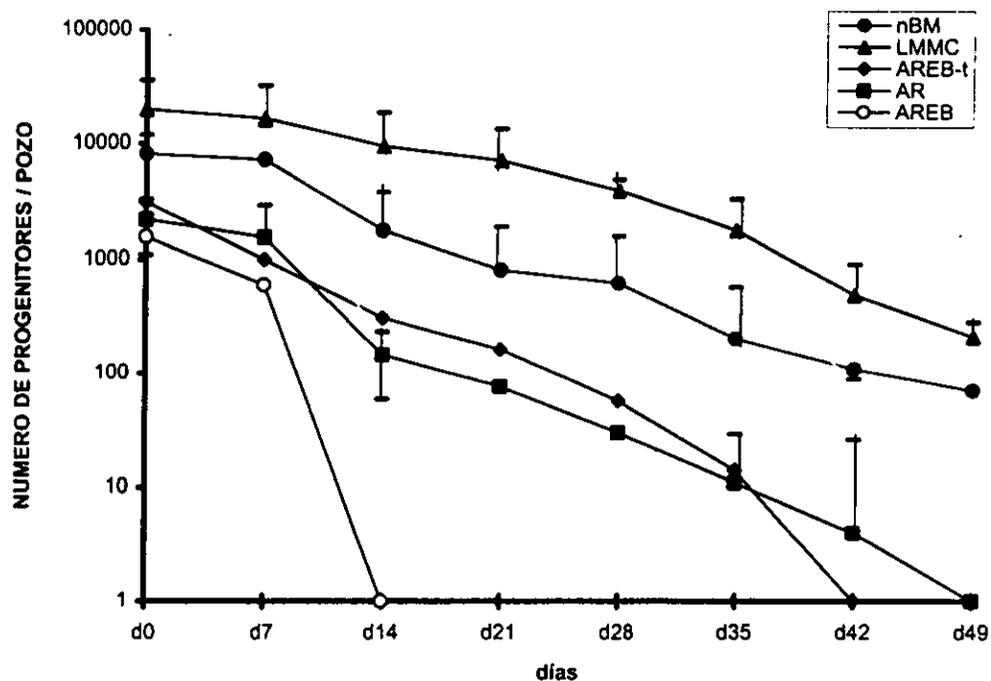


nBM: médula ósea normal

SMD: síndromes mielodisplásicos

GRAFICA 3

### CINETICA DE PROGENITORES MIELOIDES EN CULTIVO LIQUIDO



nBM: médula ósea normal

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

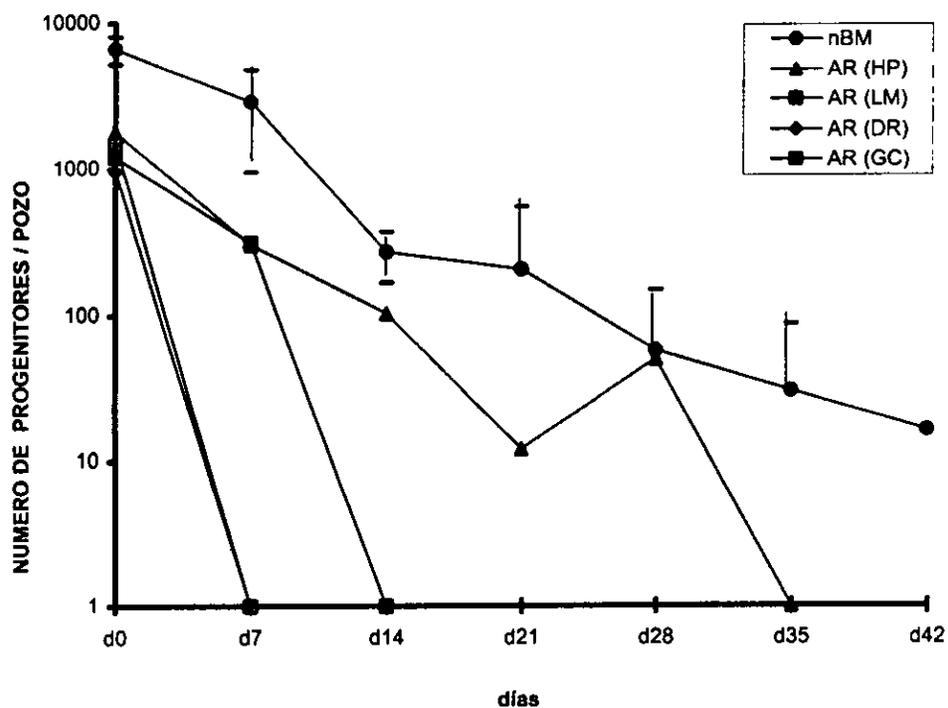
AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

AR: anemia refractaria

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

GRAFICA 4

### CINETICA DE PROGENITORES ERITROIDES EN CULTIVO LIQUIDO



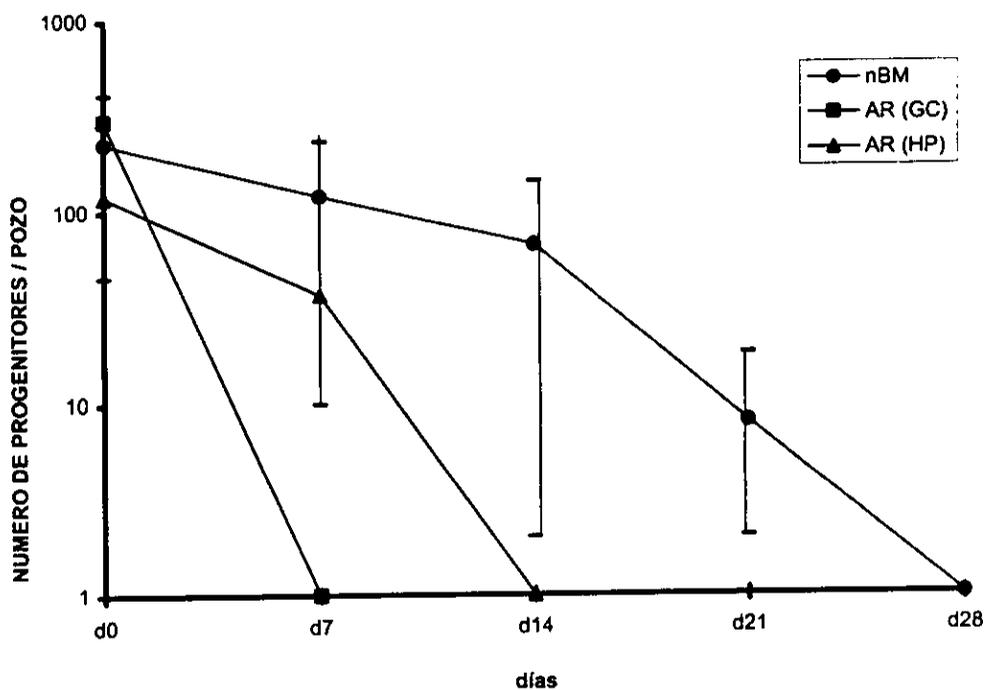
nBM: médula ósea normal

AR: anemia refractaria

( ): iniciales del paciente

# GRAFICA 5

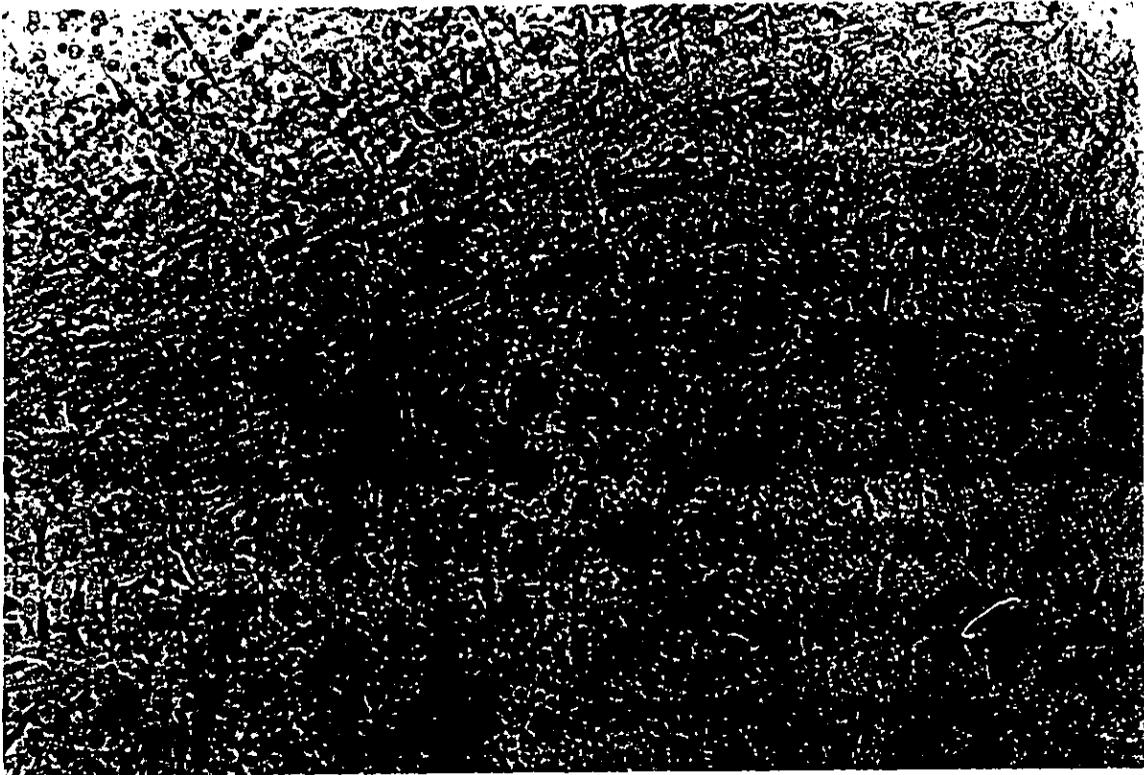
## CINETICA DE PROGENITORES MULTIPOTENCIALES EN CULTIVO LIQUIDO



nBM: médula ósea normal  
AR: anemia refractaria  
( ): iniciales del paciente

## FOTOGRAFIA 8

Cultivo a largo plazo tipo Dexter. Estroma de médula ósea normal



## FOTOGRAFIA 9

Cultivo a largo plazo tipo Dexter. Estroma de paciente con SMD



## FRACCION ADHERENTE

En los cultivos a largo plazo tipo Dexter también fueron evaluados los progenitores hematopoyéticos presentes en la **fracción adherente** (tabla 3). En las muestras de médula ósea normal podemos observar que el mayor número de progenitores adheridos al estroma lo encontramos en el día 21, y en las semanas subsecuentes se encuentra un menor número de éstos progenitores, posiblemente porque van madurando y se desprenden de ésta capa para poder proliferar y diferenciarse. Los progenitores mieloides son los más abundantes, encontrándose hasta el día 49, mientras que los eritroides y multipotenciales únicamente se encuentran hasta el día 35.

En el caso de AR el crecimiento de los progenitores hematopoyéticos fue heterogéneo, sin embargo se aprecia un número muy reducido de progenitores con respecto al control. Los casos de AREB y AREB-t muestran una disminución mucho más marcada de todos los progenitores hematopoyéticos, de hecho, en el día 35 de cultivo no se detectó la presencia de ningún tipo de progenitor en estos cultivos. El crecimiento de los progenitores de LMMC en la fracción adherente se comportó en forma similar a lo ocurrido en la fracción no adherente. No se detectaron progenitores ni eritroides ni multipotenciales, y los progenitores mieloides presentaron niveles semejantes al control y en una muestra incluso superiores a éste.

En la literatura se encuentra un estudio (44) en donde analizaron la capa adherente, pero únicamente los progenitores mieloides. En este estudio se reporta una disminución en éstos progenitores, los cuales desaparecieron en la semana 6 del cultivo. En este estudio se analizó la media y desviación del crecimiento de las muestras de SMD, a diferencia del presente estudio en donde analizamos el crecimiento de los progenitores por subtipo clínico. Esto nos permitió identificar que en algunos subtipos como AREB y AREB-t el crecimiento de los progenitores mieloides desaparece en la semana 5, pero en otros subtipos como en AR y LMMC encontramos la presencia de dichos progenitores hasta la semana 7. No se encontraron reportes en la literatura del número de colonias eritroides ni multipotenciales en la capa adherente.

**TABLA 3**

**NUMERO DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS PRESENTES EN LA CAPA  
ADHERENTE DE LOS CULTIVOS LIQUIDOS**

	Mieloides d21	Mieloides d35	Mieloides d49	Eritroides d21	Eritroides d35	Mixtos d21	Mixtos d35
AR	251±143	30±34	7±16	33±24	45±98	5±6	DD
AREB-t	84±78	DD	DD	DD	DD	DD	DD
AREB	DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD
LMMC	1261±666	125±160	145±60	DD	DD	DD	DD
nBM x	765±499	197±78	151±120	151±95	27±37	13±9	3±2

Mieloides : UFC-G, UFC-M, UFC-GM. Eritroides : UFB-E, UFC-E. Mixtas : UFC-MIX  
DD.-debajo de los niveles detectables. d: día

AR: anemia refractaria

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

nBM: médula ósea normal, control

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Considerando la evidencia experimental surgida del presente estudio, podemos concluir que el crecimiento *in vitro* de los progenitores hematopoyéticos de pacientes con SMD se encuentra alterado. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de deficiencias tanto cuantitativas (bajos niveles de progenitores en médula ósea) como cualitativas (proliferación disminuida de progenitores en cultivos líquidos a largo plazo) en pacientes con AR, AREB AREB-t. En el caso de pacientes con LMMC, las alteraciones observadas fueron principalmente cuantitativas (niveles superiores de progenitores mieloides en médula ósea).

En todos los casos analizados se observó la presencia de progenitores mieloides, mientras que en el grupo de pacientes con AR fue posible la identificación de progenitores eritroides y multipotenciales. Esto sugiere que dentro del complejo sistema hematopoyético, el linaje eritroide y el compartimento de progenitores multipotenciales están siendo preferentemente afectados en pacientes con SMD. La razón de esto es, actualmente, motivo de diversos estudios.

La proliferación deficiente de los progenitores hematopoyéticos de sujetos con SMD en cultivos líquidos a largo plazo puede deberse a alteraciones tanto en ellos mismos, como en el microambiente hematopoyético. Nuestros estudios indican que, en términos cuantitativos, el estroma medular de pacientes con SMD es semejante al estroma de sujetos sanos (el número de células adherentes es similar). Sin embargo, se requiere realizar estudios encaminados a la caracterización funcional y de composición, de dicho microambiente.

Finalmente, el presente trabajo permite apreciar ciertos patrones de proliferación que parecen relacionarse con el subtipo clínico de los pacientes. Sin embargo, debido al número de pacientes incluidos en este estudio, no es posible hacer una correlación clínica. Por lo anterior, sería importante continuar el estudio en un futuro próximo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Beutler E. et al. 1995. Clinical Hematology 8° edition. Ley and Fobiger. Philadelphia.
2. Beutler E. et al. 1995. Williams Hematology 5° edition. Mc Graw Hill. International edition.
3. Zucker-Franklin D, and Petursson S.1984. Thrombocytopoiesis-analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megacaryocytes. J.Cell.Biol. 99:390.
4. Tavassoli M. 1991. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. Blood Cells 1:269.
5. Lansdorp P. 1995. Developmental changes in the function of hemopoietic stem cells. Experimental Hematology 23:187.
6. Metcalf D, Moore M. 1971. Haemopoietic Cells. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. pp550.
7. Mayani H. Las celulas seminales del sistema hematopoyetico (en revision)
8. Golde W.1991. The Stem Cell. Scientific American 12:86.
9. Mayani H. 1992. La produccion de las celulas sanguineas. A treinta años del primer encuentro con las CFU-S. Ciencia y Desarrollo.104:54.
10. Visser JW, Van Bekkum. 1990. Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: Past and Present. Experimental Hematology. 18:248.
11. Berardi AC. et al. 1995. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. Science. 267:104.
12. Donald Orlic, Bodine DM. 1994. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC. Please stand up!. Blood. 84,12:3991.
13. Hodgson GS, Bradley TR. 1979. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell. Nature. 281:381.
14. Craig W, Kay R, Cutler R, Lansdorp P. 1993. Expression of thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. Journal of Experimental Medicine.177:1331.
15. Baum CM et al. 1992. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 89:2804.

16. Humphries R, Eaves C, Eaves A. 1981. Self-renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:3629.
17. Ogawa M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* 81:2844.
18. Mayani H., Guilbert L, Janowska-Wiwczonek. 1992. Biology of the hemopoietic microenvironment. *European Journal of Hematology.* 49:225.
19. Deryugina E. Müller-Sieburg. 1993. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development?. *Critical Reviews in Immunology.* 13(2):115.
20. Russell S, et al. 1996. Human Osteoblast support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood.* 87:518.
21. Thomson AW. 1994. *The Cytokine Handbook.* Second edition. Academic Press.
22. Alberts B et al. 1994. *Molecular Biology of the Cell.* 3<sup>rd</sup> edition. Garland Publishing Inc. N.Y. & London.
23. Potts JR. & Campbell LD. 1994. Fibronectin structure and assembly. *Curr. Opin Cell Biol.* 6:648-655.
24. Testa NG and Molineux G. 1993. *Hemopoiesis. A practical approach.* Irl Press. Oxford University Press.
25. Mayani H, Dragowska W. and Lansdorp PM. 1993. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood.* 81(12): 3252-3258.
26. Hoffbrand VA, Petit EJ. 1994. *Clinical Haematology.* Second edition. Sandoz Atlas.
27. Perkins S and Feishman. 1988. Hematopoietic Microenvironment. *J. Clin. Invest.* 81:1072.
28. Eaves C, Cashman J, Eaves A. 1991. Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. *J. Tiss. Cult. Meth.* 13:55.
29. Mayani H. 1993. Human Preleukemia: cellular, molecular and clinical aspects. *Archives of Medical Research* 4:317.
30. Mayer JR, Canellos GP. 1996. Primary myelodysplastic syndrome and secondary disorders. *Leukemia.* Chapter 26. Sixth edition. Saunders Company.

31. Greaves MF, Barret AJ, Gordon MY. 1993. Bone Marrow Disorders. The biological basis of treatment. Second edition. Blackwell Scientific Publications:167.
32. Koeffler HP.1992. Hematology/Oncology Clinics of North America, Myelodysplastic syndromes. W:B: Saunders Company.
33. Hofmann WK, Ottman OG, Ganser A, Hoelzer D. 1996. Myelodysplastic syndromes: Clinical features. Seminars in Hematology 33 (3):177.
34. Morosetti R, Koeffler PH. 1996. Differentiation therapy in myelodysplastic syndromes. Seminars in Hematology 33 (3):236.
35. Koudies PA, Bennett JM. 1996. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. Seminars in Hematology 33 (2):95.
36. Bernasconi P. et al. 1994. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical evolution and survival . American Journal of Hematology 46:270.
37. Bartram CR. 1996. Molecular genetic aspects of myelodysplastic syndromes. Seminars in Hematology 33(2):139.
38. Morosetti R and Koeffler PH. 1996. Differentiation therapy in myelodysplastic syndromes. Seminars in Hematology 33(3):236.
39. Ganser A and Hoelzer D. 1996. Clinical use of hematopoietic growth factors in the myelodysplastic syndromes. Seminars in Hematology 33(3):186.
40. Greenberg PL. 1996. Biological and clinical implications of marrow culture studies in the myelodysplastic syndromes. Seminars in Hematology 33(2):163.
41. Rosati S, Anastasi J and Vardiman J. 1996. Recurring diagnostic problems in the pathology of the myelodysplastic syndromes. Seminars in Hematology 33(2):111.
42. Okada M, Okamoto T, Kanamaru A, Kaishita E. 1995. Clonal analysis in MDS (refractory anemia) by FISH and X-chromosome inactivation pattern using PCR. Proc Am Soc Hematol 86:799a (abstr.3183).
43. Greenberg PL, and Beth M. 1979. The preleukemic syndrome. The American Journal of Medicine. 66:951.
44. Borbenyi Z et al. 1987. The growth of myelodysplastic bone marrow in long-term cultures. The Macmillan Press Ltd.

45. Mayani H et al. 1988. In vitro growth of myeloid and erythroid progenitor cells from myelodysplastic patients in response to recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Leukemia* 1:29.
46. Dan K et al. 1993. Megakaryocyte, erythroid and granulocyte-macrophage colony formation in myelodysplastic syndromes. *Ascta Haematol.* 89:113.
47. Coutinho LH et al. 1990. Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). *British Journal of Haematology* 75: 16-25.
48. Visani S. et al. 1993. Impairment of GM-CSF production in myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology* 84:227-231.
49. Masters GS et al. 1995. Responsiveness to Stem Cell Factor (SCF) of peripheral blood colony-forming cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research.* 8:561.
50. Ohmori S, et al. 1993. MDS-macrophage derived inhibitory activity on myelopoiesis of MDS abnormal clones. *British Journal of Haematology* 83:388.
51. Yoshida Y. 1993. Hypothesis: apoptosis may be responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 7:144.
52. Ogata K, An Emi, Kamikubo K, Tamura H, Yokose N, Dan K and Nomura T. 1997. Cell cycle modulation by hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes: Analysis by three-color flow cytometry. *Experimental Hematology* 25: 8-18.
53. Tohyama K. Ueda T. Yoshida Y and Nakamura T. 1994. Altered responses of purified blast cells from the myelodysplastic syndromes to colony-stimulating factors in vitro: comparison with normal blast cells. *Experimental Hematology* 22:539.
54. Mundle D, et al. 1996. Indication of an involvement of Interleukine-1 $\beta$  converting enzyme-like protease in intramedullary apoptotic cell death in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 88(7):2640.
55. Mundle D, et al, 1994. Novel in situ double labeling for simultaneous detection of proliferation and apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 42 (12): 1533.

- 56.Raza A, et al. 1995. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cell in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 86 (1) 268.
- 57.Bogdanovic A, et al Apoptosis in bone marrow of myelodysplastic syndrome patients. *Blood* :3064
- 58.Rajapaksa R, Ginzton N, Rott L and Greenberg P. 1996. Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome bone marrow. *Blood* 88 (11): 4275.
- 59.Raza A. et al. 1994. Increased apoptosis as the significant cause of ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood*. 84 (10) suppl. 1 (abstr. 2528).
- 60.Soligo D et al. 1994. CD34 Immunohistochemistry of bone marrow biopsies:prognostic significance in primary myelodysplastic syndrome. *American Journal of Hematology* 46:9.