

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**“ESTUDIO *in vitro* DE LAS CELULAS
MESENQUIMALES PRESENTES EN LA
MEDULA OSEA DE PACIENTES CON
SINDROME MIELODISPLASICO”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P r e s e n t a

M. en C. Eugenia Flores Figueroa

Director de Tesis

Dr. Héctor Mayani Viveros



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

La frase mas excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "(Eureka!" ((Lo encontré!) sino 'Es extraño'.

Isaac Asimov
(1920-1996)

A mi esposo,

A mis padres,

A mis hermanos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Hector Mayani Viveros y la supervisión del comité tutorial conformado por la Dra. Annie Pardo Semo y el Dr. Eduardo García Zepeda.

Durante la realización de este estudio se contó con el apoyo económico del CONACYT, DGEP y de la Coordinación de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Indice

Resumen español	1
Resumen inglés	2
Lista de Abreviaturas	3
I Introducción	5
1.1 Hematopoyesis	5
1.2 Sistema Hematopoyético	5
1.3 Sistema Endotelial	9
1.4 Sistema Estromal	12
1.4.1 Componente Hematopoyético	14
1.4.2 Componente Mesenquimal	14
1.4.2.1 Fibroblastos	14
1.4.2.2 Osteoblastos	16
1.4.2.3 Adipocitos	18
1.5 Células Troncales Mesenquimales	18
1.5.1 Métodos de Obtención de las Células Troncales Mesenquimales ...	21
1.5.2 Caracterización de las Células Troncales Mesenquimales	22
1.5.3 Multipotencialidad de las Células Troncales Mesenquimales	24
1.6 Síndromes Mielodisplásicos	26
1.6.1 Características Clínicas y Diagnostico	26
1.6.2 Clasificación y Factores Pronósticos	28
1.6.3 Historia Natural y Complicaciones Clínicas	30
1.6.4 Tratamiento	31
1.6.5 Biología de los Síndromes Mielodisplásicos	32
II Antecedentes	36

2.1 Estudio del estroma en los Síndromes Mielodisplásicos	36
III Planteamiento del Problema	39
IV Objetivos	40
4.1 Objetivos Generales	40
4.2 Objetivos Particulares	40
V Metodología	42
5.1. Muestras Biológicas	42
5.2 Obtención de células troncales mesenquimales	42
5.3 Ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)	43
5.4 Cultivo de células troncales mesenquimales	44
5.5 Congelación de Células Troncales Mesenquimales	44
5.6 Descongelación de Células Troncales Mesenquimales	45
5.7 Evaluación del Inmunofenotipo de las células mesenquimales	45
5.8 Estudios de Morfología	46
5.9 Estudio de Cariotipo	46
5.10 Síntesis de Fibronectina	47
5.11 Síntesis de Colágena	47
5.12 Análisis de la producción de citocinas.....	48
5.13 Obtención de las células progenitoras de cordón umbilical para cultivos quiméricos	48
5.14 Estudios de co-cultivos o cultivos quiméricos	49
5.15 Evaluación de la capacidad de adhesión de células hematopoyéticas normales a capas de MSC	49
5.16 Cuantificación de progenitores hematopoyéticos (CFU-C)	50
5.17. Estadística	50
VI Resultados y Discusión	53
6.1 Muestras biológicas	53

6.2 Obtención de una población pura de células troncales mesenquimales (MSC)	55
6.3 Análisis Morfológico y Evaluación de Marcadores de las MSC de pacientes con SMD y MON.....	59
6.4 Evaluación del cariotipo y ploidía en las MSC de MOn y pacientes con SMD	66
6.5 Niveles de citocinas y moléculas de la matriz extracelular en las MSC de MOn y pacientes con SMD	73
6.6 Adhesión de células progenitoras hematopoyéticas a capas de MSC de pacientes con SMD y MOn	78
6.7 Capacidad de las células troncales mesenquimales de pacientes con SMD para sostener la hematopoyesis normal.....	82
VII Discusión General	90
VIII Conclusiones y Perspectivas	93
IX Bibliografía	95
X Artículo Publicado	112

Abreviaturas

(I).- por sus siglas en inglés

α -LNGFR.- I. receptor de baja afinidad del factor de crecimiento neuronal.

ADN.- ácido desoxiribonucleico

AGM.- zona aorta-gónada-mesonefros.

ALCAM.-I. molécula de adhesión de linfocitos activados

Ang-1.- angiopoyetina uno.

AR.- anemia refractaria simple

ARS.- anemia refractaria con sideroblastos en anillo

AREB.- anemia refractaria con exceso de blastos.

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

ARN.- ácido ribonucleico.

BFU-E.- I. unidad formadora de colonias de brote eritroide.

CFU-C.- I. unidad formadora de colonias

CFU-F.- I. unidad formadora de colonias de fibroblastos.

CFU-Mix.- I. unidad formadora de colonias mixtas.

CMN.- células mononucleares

CN.- células nucleadas

CTH.- células troncales hematopoyéticas.

Epo.- eritropoyetina

FGF.- I. factor de crecimiento de fibroblastos

FISH.- I. hibridación in situ fluorescente

GAPDH.- I. gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

G-CSF.- I. factor de crecimiento de colonias granulocíticas.

GM-CSF.- I. factor de crecimiento de colonias granulo-monocíticas.

ICAM-I.- I. molécula intercelular e adhesión uno.

ICAM-II.- I. molécula intercelular e adhesión dos.

IL.- interleucina.

IL-1 β .- interleucina 1-beta

IFN- β .- interferón beta.

IFN γ .- interferón gama

ISEL.- I. marcaje terminal por hibridación in situ

LDL.- I. lipoproteína de baja densidad acetilada.

LIF.- I. factor inhibidor de leucemia.

LFA.- I. antígeno asociado a la función leucocitaria.

LMA.- leucemia mieloide aguda

LMMC.- leucemia mielomonocítica crónica

LTC-IC.- I. célula iniciadora de cultivos a largo plazo tipo Dexter.

LTMC.- I. cultivo a largo plazo tipo Dexter

M-CSF.- I. factor estimulante de colonias de macrófagos.

M210B4.- línea estromal de ratón que soporta la hematopoyesis.

MCP-1.- I. proteína quimioatrayente de monocitos uno

mMSC.- I. células troncales mesenquimales maduras

pb.- pares de bases

PECAM.- I. molécula de adhesión de plaquetas-endotelio.
PIGF.- I. factor angiogénico fosfatidil inositol glicano clase F
rPDGF.- I. receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
SCID.- I. inmunodeficiencia severa combinada
SRC.- I. células repobladoras de ratones inmunodeficientes (SCID)
SCF.- I. ligando de kit.
SDF-1.- I. factor derivado del estroma uno.
SMD.- Síndromes Mielodisplásicos
TGF-β.- I. factor de crecimiento transformante beta.
TNF-α.- I. factor de necrosis tumoral alfa.
TUNEL.- TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling
VCAM-I.- I. molécula de adhesión vascular.
VEGF.- I. factor del endotelio vascular.
VLA.- I. antígeno de adhesión tardío.
vWF.- I. factor von Willebrand.

I. Resumen

Los Síndromes Mielodisplásicos se definen como alteraciones primarias neoplásicas de las células seminales hematopoyéticas que en una elevada proporción de los casos se transforman a leucemia mieloide aguda. Los pacientes se caracterizan por presentar una o más citopenias en sangre periférica acompañada por cambios displásicos en la médula ósea. Al parecer un incremento en los niveles de apoptosis de las células hematopoyéticas explican las citopenias encontradas en sangre periférica, a pesar de presentar una médula ósea normo o incluso hipercelular. Esta aparente paradoja puede ser explicada ya sea por las anormalidades presentes en las propias células hematopoyéticas o por las anormalidades funcionales de las células del estroma de la médula ósea. Las anormalidades en las células hematopoyéticas han sido descritas extensamente, sin embargo, el papel del estroma medular en la fisiopatología de los Síndromes Mielodisplásicos continúa siendo incierto. Existen trabajos contradictorios sobre la capacidad funcional de las células estromales de los pacientes con SMD. En un estudio anterior realizado por nuestro grupo, utilizamos capas enriquecidas de los dos principales componentes del estroma, macrófagos y fibroblastos estromales. En nuestro reporte, encontramos diferencias en el comportamiento funcional de los fibroblastos estromales de pacientes con SMD con respecto a controles de médula ósea normal, lo que sugería que el componente mesenquimal del estroma estuviera alterado. Por lo que en el presente trabajo pretendimos esclarecer si el componente mesenquimal del estroma de pacientes con SMD se encontraba alterado y si dichas alteraciones eran debidas a que provinieran de la clona displásica. Nuestro estudio nos permitió establecer que las células troncales mesenquimales, las cuales dan origen al componente mesenquimal del estroma (fibroblastos estromales, adipocitos, osteoblastos) presentan una morfología y marcadores inmunológicos normales. Encontramos que las células troncales mesenquimales de pacientes con SMD son capaces de sostener la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas primitivas de sangre de cordón umbilical, a pesar de contener alteraciones cromosómicas.

Abstract

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are characterized by bone marrow hyperplasia and peripheral blood cytopenias. Ineffective hemopoiesis is due to an equal increased rate of proliferation and apoptosis on hemopoietic cells. Although the origin of MDS is unknown, it might be explained by abnormalities on the hemopoietic compartment and/or the presence of an abnormal stroma. Increasing evidence of functional disturbance of the stromal cells in MDS has been published recently. The alterations include abnormal cytokine production and an impaired capability supporting normal hemopoiesis. It has been postulated that the mesenchymal component of the stroma is altered. The aim of this study was to determine whether the MDS-derived mesenchymal stem cells (MSC) were functional and able to support normal hematopoiesis and to elucidate if the alterations on MDS mesenchymal stem cells, if any, were attribute to their clonality. In the present study we worked with purified mesenchymal stem cells from MDS patients and normal donors. No differences in the capacity to sustained hematopoiesis, immunophenotype, cytokine and extracellular matrix protein levels were observed among normal and MDS-derived MSC. We found no clonality on MDS-derived MSC, but more than 50% of patients had chromosomal alterations within their mesenchymal stem cells. We conclude that MDS-derived MSC are able to support normal hematopoiesis regardless their altered karyotype. We hypothesize that the abnormalities observed in the stroma of MDS patients in former studies may be due to altered interactions with other components of the microenvironment.

I.- Introducción

1.1 Hematopoyesis

La médula ósea, es uno de los órganos más grandes en el cuerpo humano y es el sitio principal desde el momento de nuestro nacimiento, en donde se producen cerca de 6 mil millones de células sanguíneas/ kg de peso corporal al día (Abboud y Lichtman, 2001). Las células sanguíneas llevan a cabo funciones vitales para el organismo como el intercambio de gases (CO₂ y O₂), la respuesta inmune y la coagulación.

La producción de todas las células sanguíneas se lleva a cabo mediante un mecanismo denominado hematopoyesis, el cual es un proceso finamente regulado que permite mantener la homeostasis en el organismo y responder a una mayor demanda de células en respuesta hacia infecciones o sangrado (Abboud y Lichtman, 2001).

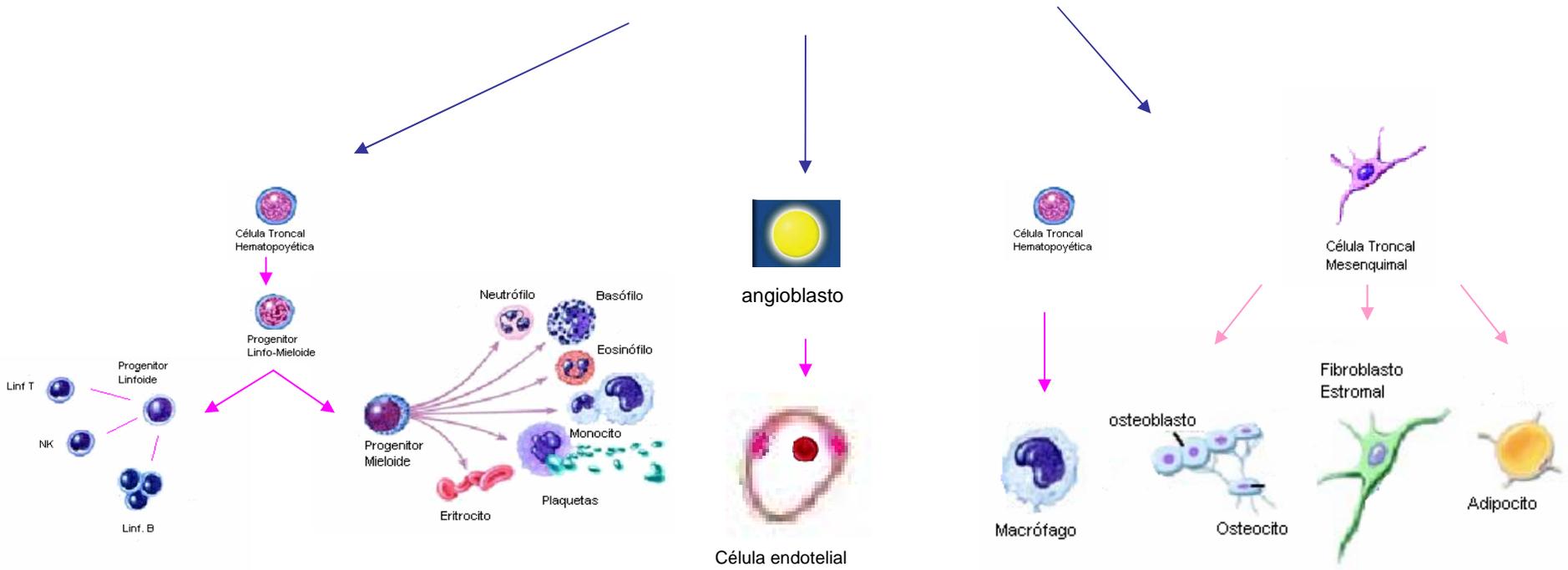
Para que pueda llevarse a cabo la hematopoyesis, es necesaria la interacción de tres sistemas celulares que coexisten en la médula ósea. El primero, el sistema hematopoyético, tiene su origen en un progenitor hematopoyético común, y es el encargado de dar origen a las células sanguíneas circulantes. El sistema hematopoyético es regulado por los otros dos sistemas celulares: el endotelial y el estromal. (Deans y Moseley, 2000) (Esquema 1).

1.2.- Sistema Hematopoyético

El sistema hematopoyético consiste de varios compartimentos, el primero de ellos es el de la células troncales hematopoyéticas (CTH), también denominadas como células madre o células tallo. Las CTH tienen un potencial de proliferación muy amplio, funcionalmente se dice que una CTH es capaz de autorrenovarse y tiene la capacidad de regenerar la hematopoyesis de un organismo cuyo sistema hematopoyético ha sido previamente nulificado (Visser y Van Bekkum, 1990; Berardi et al, 1995). Las CTH por lo tanto, tienen una capacidad multipotencial, es decir, pueden originar a células sanguíneas de los tres linajes: mieloide, eritroide y linfoide.

Las CTH no pueden distinguirse por su morfología, sin embargo poseen características únicas que las diferencian de células maduras. Se han desarrollado sistemas *in vitro* e *in vivo* para evaluar a las CTH, ambos se basan en la capacidad de estas células de dar origen a células más maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos.

MEDULA OSEA



Sistema Hematopoyético

Sistema Endotelial

Sistema Estromal

Esquema 1. Representación de los tres sistemas celulares localizados en la medula ósea que participan en la hematopoyesis.

Dentro de los sistemas *in vitro*, el más utilizado es el cultivo líquido a largo plazo (LTC-IC, por sus siglas en inglés long-term culture-initiating cells), el cual permite detectar a células hematopoyéticas primitivas denominadas células iniciadoras de cultivos a largo plazo. Debido a su estado tan primitivo de maduración, las CTH no producen colonias en cultivos semisólidos, sin embargo en cultivos líquidos generan células más maduras que son capaces de producir colonias en cultivos semisólidos. Las CTH en estos cultivos se siembran sobre una capa adherente de células estromales (líneas celulares de fibroblastos como la M210B4) que permiten el crecimiento y diferenciación de estas células hasta por 12 semanas. La mitad de las células son removidas semanalmente para mantener los cultivos y evitar el sobrecrecimiento y evaluarlas en cultivos semisólidos. (Sutherland et al, 1990).

Dentro de los sistemas *in vivo*, el mejor y más utilizado es el que permite detectar a las células repobladoras de ratones inmunodeficientes (SRC, por sus siglas en inglés). Este se basa en modelos quiméricos, en donde células humanas hematopoyéticas muy primitivas son inyectadas en ratones inmunodeficientes (SCID) irradiados, después de un lapso de tiempo, se evalúa el injerto de las células humanas mediante marcadores como el CD45 humano, el cual distingue a células hematopoyéticas humanas tanto mieloides como linfoideas (Bock, 1997; Zanzan et al, 1998).

Existen diversas metodologías para aislar a las CTH, algunas de ellas se basan en el hecho de que más del 95% de estas células están en estado quiescente, es decir en fase G₀ del ciclo celular, por lo que son resistentes a los efectos del 5-fluorouracilo (Hodgson y Bradley, 1979) y de la hidroxiurea (Monette et al, 1974). Estas células además, tienen la capacidad de retener bajos niveles de rodamina, y no se adhieren a las cajas de cultivo (Visser y Van Bekkum, 1990).

El método mas utilizado para aislar a las CTH se basa en su inmunofenotipo, utilizando citometría de flujo o la técnica de separación positiva o negativa por columnas inmunomagnéticas. Debido al estado inmaduro de las CTH, éstas no presentan antígenos de células maduras. Los marcadores de linaje que se encuentran ausentes de las CTH incluyen antígenos presentes en células eritroides, células T, células B, células NK, monocitos, plaquetas y granulocitos. Algunos marcadores que son mas comúnmente utilizados para aislar a las células linaje negativas humanas son: CD2, CD3, CD4, CD8,

CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD33, CD41, CD56, CD66b, y glicoforina A (Baum et al, 1992; Berardi et al, 1995).

El antígeno CD34 fue el primer marcador reconocido en las células hematopoyéticas primitivas humanas, y sigue siendo el más utilizado. El CD34 es expresado en aproximadamente 1 al 4% de las células nucleadas de médula ósea. Estas células incluyen a la mayoría de las células repobladoras de ratones SCID, de las LTC-IC, pero también a los progenitores hematopoyéticos más maduros, por lo que para poder distinguir entre las CTH y células más maduras como los progenitores, es necesario utilizar adicionalmente otros antígenos.

El CD38 es una molécula presente en aproximadamente el 90% de las células CD34+, incluyendo la mayoría de los progenitores hematopoyéticos y el 60% de las LTC-IC. Las células CD34+ CD38+ tienen la capacidad de reconstituir el sistema de un ratón inmunodeficiente, sin embargo este efecto es transitorio; mientras que las células CD34+ CD38-, son capaces de sostener por tiempos prolongados la hematopoyesis en un ratón inmunodeficiente y de originar a todas las líneas hematopoyéticas. Por esto, se considera que la expresión del antígeno CD38 engloba a una subpoblación de células más maduras dentro de la población CD34+ (Wognum et al, 2003). Estudios recientes han demostrado que una población de células CD34- CD38- linaje- contienen células SRC (Bathia et al, 1998) y que son capaces de injertar *in vivo* produciendo todos los linajes hematopoyéticos, y dar origen a células CD34+ *in vivo* (Zanjani et al, 1998) e *in vitro* (Zanjani et al, 2003). Al ser una subpoblación recientemente descrita y con una frecuencia extremadamente baja, todavía su caracterización no es muy clara, por lo que en la mayoría de los estudios se sigue utilizando a la subpoblación CD34+ CD38- linaje- junto con otros antígenos como el CD133, c-kit y el CDCP1 (Wognum et al, 2003).

Las CTH se diferencian y dan origen a células que constituyen el segundo compartimiento, son células con un potencial amplio de proliferación pero restringidas a ciertos linajes, estas células denominadas como *progenitores hematopoyéticos* (Colony-Forming Unit ó CFU por sus siglas en inglés) pueden distinguirse tanto por su inmunofenotipo (expresan el antígeno CD34 y diversos antígenos de linaje, dependiendo del tipo de progenitor) (Mayani et al, 1993) como por su capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos suplementados con citocinas recombinantes. Los progenitores

hematopoyéticos que dan origen a las colonias en cultivo pueden ser multipotenciales, bipotenciales ó monopotenciales. Los progenitores multipotenciales, como es el caso de las unidades formadoras de colonias mixtas (CFU-MIX o CFU-GEMM), forman colonias que contienen células tanto mieloides como eritroides. Los progenitores bipotenciales tienen la capacidad de originar colonias de dos tipos celulares como las unidades formadoras de colonias granulomonocíticas (CFU-GM), las cuales originan colonias compuestas por granulocitos y por monocitos. Los progenitores monopotenciales son progenitores que tienen la capacidad de generar únicamente un tipo celular, dentro del linaje mieloide encontramos las unidades formadoras de colonias de granulocitos (CFU-G) y de monocitos (CFU-M); y dentro de la línea eritroide encontramos progenitores monopotenciales inmaduros como las unidades formadoras de brote eritroide (BFU-E) y progenitores más maduros como las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) (Bock, 1997).

Los progenitores hematopoyéticos a su vez, originan a las células que conforman el tercer compartimiento, el de los *precursores hematopoyéticos*, los cuales son células con mayor grado de madurez y diferenciación, su capacidad proliferativa se encuentra más limitada y son precursores comprometidos a un linaje, ya sea eritroide, mieloide, megacariocítico o linfoide. Estos precursores pueden ser reconocidos por su morfología bajo el microscopio óptico (Mayani, 1992).

Finalmente los precursores maduran y dan origen al cuarto y último compartimiento, el de las células sanguíneas circulantes, las cuales son células maduras, terminales, capaces de ejercer su función en el organismo, e incluyen a los eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas (Mayani, 1992).

1.3.- Sistema Endotelial

Durante el desarrollo embrionario, tanto las células hematopoyéticas como las endoteliales provienen de un progenitor común conocido como hemangioblasto. Los hemangioblastos dan origen a las islas hematopoyéticas, compuestas por CTH en estrecha interacción con las células endoteliales. Esta cercana interacción entre las CTH y las células endoteliales se observa no solamente a nivel embrionario en saco vitelino y en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM), si no también en el hígado y bazo fetales hasta la médula ósea adulta (Rafii, 2001). En el adulto no ha sido posible encontrar un progenitor común

entre las células endoteliales y las hematopoyéticas, el sistema endotelial en el adulto se origina a partir de un progenitor denominado angioblasto (Rafii, 2001).

La relevancia del sistema endotelial se ha puesto de manifiesto recientemente, ya que anteriormente se consideraba que tenía un papel pasivo y servía exclusivamente como una barrera entre la médula ósea y la circulación. Actualmente se le considera como uno de los elementos indispensables que regulan la hematopoyesis. Gracias a nuevas técnicas de cultivo (Rafii et al, 1994), ha sido posible aislar y cultivar a las células endoteliales para estudiarlas.

Estudios de inmunocitoquímica revelan que la microvasculatura de médula ósea y capas de células endoteliales *in vitro*, expresan el factor von Willebrand (vWF), el antígeno CD34, la molécula de adhesión de plaquetas-endotelio (PECAM), trombospondina, así como bajos niveles de las moléculas intercelulares de adhesión ICAM-I (CD54), la molécula de adhesión vascular (VCAM-I) y CD106, así como E-selectina. Las células endoteliales de médula ósea en cultivo también incorporan lipoproteína de baja densidad acetilada (LDL).

En la médula ósea de organismos adultos, las células endoteliales juegan un papel crítico en la supervivencia y proliferación de las células progenitoras. El medio condicionado de cultivos de células endoteliales permite la proliferación y diferenciación de las colonias eritroides (BFU-E) y multipotenciales (CFU-mix) (Ascensao et al, 1984). En sistemas *in vitro* de co-cultivo -en donde células hematopoyéticas primitivas son cultivadas sin factores de crecimiento pero en presencia de una capa de células adherentes- se ha demostrado, que capas confluentes de células endoteliales mantienen la hematopoyesis a partir de células CD34+ de sangre de cordón umbilical hasta por 10 semanas, permitiendo la proliferación y diferenciación de los distintos progenitores hematopoyéticos. Uno de los mecanismos por los cuales las células endoteliales mantienen la hematopoyesis es a través de la producción y secreción de citocinas. Se ha demostrado que capas de células endoteliales de médula ósea producen constitutivamente interleucina 6 (IL-6), IL-11, IL-5, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el ligando kit (SCF) el factor de crecimiento de colonias granulocíticas (G-CSF), el factor de crecimiento de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF), el factor inhibidor de leucemia (LIF) y el factor de crecimiento de colonias de macrófagos (M-CSF)(Rafii, 2001).

Aunado a la secreción de citocinas, es necesario el contacto directo entre las células endoteliales de médula ósea y las células hematopoyéticas primitivas. Utilizando el mismo sistema de co-cultivo, pero utilizando una malla de 0.4 μ m para separar a las células endoteliales de las células CD34+, se demostró que cuando las células se encuentran en contacto directo, se favorece el crecimiento de un mayor número de progenitores hematopoyéticos, lo cual es más evidente después de cuatro semanas de cultivo. Las células endoteliales inducen una expansión de 10 a 12 veces de células CD34+ en los primeros 7 días de cultivo, y permiten la regeneración de los progenitores hematopoyéticos por más de 70 días, cuando están en contacto, y más de 56 cuando no están en contacto con las células endoteliales (Rafii et al, 1995).

Las células endoteliales de médula ósea regulan también la expresión de moléculas de adhesión que modulan el tráfico de las CTH y de las células progenitoras. Las células endoteliales presentan en su superficie moléculas de adhesión como la E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, PECAM, CD34+ y la molécula de matriz fibronectina, las cuales median la adhesión de las células hematopoyéticas primitivas; éstas a su vez, presentan los receptores antígeno de adhesión tardío (VLA)-4, antígeno asociado a la función leucocitaria (LFA)-1, PECAM, VLA-5 y L-selectina. La interacción entre las moléculas de adhesión y sus receptores media diferentes funciones, como: adhesión superficial (rolling), adhesión firme, trasmigración y adhesión célula-matriz. Se ha observado que estas moléculas son reguladas por citocinas como IL-3, IL-6 y el SCF, así como por el estado de maduración de las células (Rafii, 2001).

Dentro de la médula ósea, los megacariocitos poliploides residen en una estrecha proximidad a las células endoteliales (Zucker-Franklin et al, 1987). La adhesión de los megacariocitos a las células endoteliales o a la matriz extracelular de médula ósea induce la extensión de los pseudópodos y a la fragmentación final de las plaquetas.

Las células endoteliales de médula ósea tienen un papel importante en la regulación de la proliferación de las células leucémicas (Rafii, 2001). Dentro del microambiente hematopoyético de médula ósea, las células endoteliales residen en una asociación cercana con varios tipos celulares como adipocitos, fibroblastos, megacariocitos maduros, células plasmáticas y células hematopoyéticas (Rafii et al, 1994).

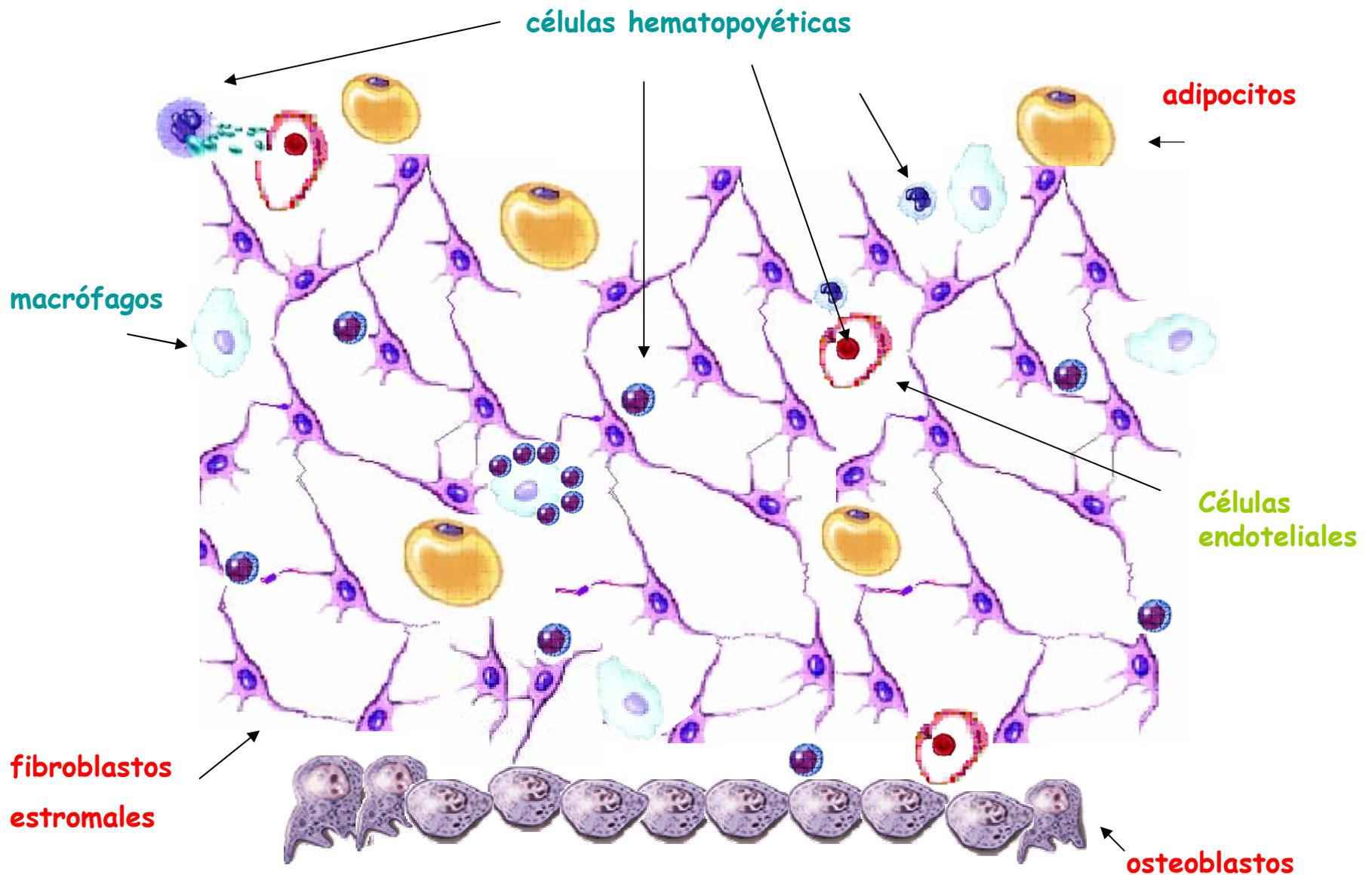
1.4.- Sistema Estromal

El término estroma se utiliza para definir a células de tejido conectivo que mantienen la estructura de un órgano (Mayani et al, 1992). En la médula ósea, el sistema estromal describe a una variedad de células grandes, extendidas, de morfología fibroblastoide que se encuentran en cercana asociación con las células hematopoyéticas (Deryugina, Müller-Sieburg, 1993). La palabra estroma deriva del griego que quiere decir “cama” y del latín que quiere decir “colchón” (Mayani et al, 1992), ya que de acuerdo con la definición más antigua, se pensaba que estas células proveían un soporte físico para las células hematopoyéticas.

Hasta hace algunos años la descripción de las células estromales era sumamente ambigua, englobando a todas las células que tienen la capacidad de adherirse al plástico en cultivos *in vitro*, expresan el antígeno de histocompatibilidad tipo I y no expresan el antígeno CD45 (Deryugina, Müller-Sieburg, 1993). A partir de los sistemas de cultivo *in vitro*, se ha permitido conocer más claramente la composición de las células del estroma.

Estos cultivos denominados cultivos a largo plazo tipo Dexter, son un modelo *in vitro* que permite el crecimiento tanto de células hematopoyéticas como de células estromales, a partir de células mononucleares de médula ósea. Al inicio del cultivo encontramos a las células en suspensión, pero a la semana de cultivo se comienzan a observar células adheridas al fondo de la caja de cultivo, éstas células comienzan a crecer y en la segunda semana ya forman una capa celular heterogénea conformada en su mayor parte por fibroblastos estromales, una proporción menor de macrófagos y por diferentes tipos celulares como adipocitos y osteoblastos (Deans y Morseley, 2000). A esta capa se le denomina como el estroma, una parte de las células hematopoyéticas permanecen en suspensión, mientras que otra parte, generalmente progenitores hematopoyéticos, se adhiere a la capa de estroma del cultivo (Deans y Morseley, 2000).

Para su estudio, las células estromales pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen en dos componentes: el componente hematopoyético, conformado por los macrófagos estromales, los cuales derivan de las células troncales hematopoyéticas, y el componente mesenquimal, conformado por fibroblastos estromales, miofibroblastos o células reticulares, adipocitos y osteoblastos, los cuales derivan de la célula troncal mesenquimal (Esquema 2).



Esquema 2. Localización de los distintos elementos del estroma en médula ósea. Componente hematopoyético: macrófagos; componente mesenquimal: osteoblastos, fibroblastos estromales, adipocitos; componente endotelial: células endoteliales.

1.4.1 Componente Hematopoyético

Los macrófagos estromales son los únicos elementos del estroma que presentan el antígeno CD45. Estas células pueden distinguirse gracias a que expresan moléculas específicas como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), el antígeno CD14, CD11c y CD68. Los macrófagos estromales son el segundo componente del estroma más abundante de la médula ósea y de los cultivos líquidos a largo plazo (Mayani et al, 1992).

Dentro de la médula ósea se localizan en diferentes sitios: como macrófagos centrales en las islas eritroblásticas, en el endotelio y dispersos entre las células hematopoyéticas. Estas células llevan a cabo diferentes y muy importantes funciones, regulando la hematopoyesis mediante interacciones célula – célula, y por medio de la secreción de citocinas estimuladoras e inhibitoras de la hematopoyesis. Dentro de la variedad de citocinas producidas por los macrófagos encontramos el M-CSF, el G-CSF, el GM-CSF, la IL-3, la IL-1, la IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Dorshkind, 1990; Mayani et al, 1992; Deryugina y Müller-Sieburg, 1993).

1.4.2 Componente Mesenquimal

El componente mesenquimal se encuentra conformado por distintos tipos de células que provienen de una célula troncal mesenquimal y que, dependiendo de los factores que se encuentren en su ambiente, sigue un determinado patrón de diferenciación hacia fibroblastos estromales, miofibroblastos, adipocitos, y osteoblastos. Estas células estromales de origen mesenquimal tienen un papel fundamental en la regulación de la hematopoyesis (Charbord, 2001).

1.4.2.1 Fibroblastos estromales

La mayor parte de las células estromales CD45- son células vasculares tipo músculo liso, también conocidas como células reticulares o fibroblastos estromales o miofibroblastos (Mayani et al, 1992; Charbord, 2001; Deans y Moseley, 2000). Estas células presentan varios marcadores que comparten con las células de músculo liso vascular como las proteínas de citoesqueleto: actina alfa de músculo liso y metavinculina, como las proteínas de unión a actina asociadas a citoesqueleto: calponina y h-caldesmon (Charbord,

2001). Estas células también expresan vimetina, fibronectina, colágena tipo I, III y IV, trombospondina tipo 1, tenacina, tropo-elastina, y glicosaminoglicanos, ácido hialurónico, condroitín 4 y 6 sulfato, dermatan-sulfato y heparán sulfato. Por todas estas características, se ha considerado a estas células estromales, células mesenquimales que siguen una vía de diferenciación de músculo liso vascular. Estas células también pueden ser clasificadas como miofibroblastos (Charbord, 2001) una familia de células de tejido conectivo que generan fibroblastos que adquieren marcadores de músculo liso bajo ciertas condiciones *in vivo*. Los miofibroblastos son muy heterogéneos, propiedad que se ve reflejada en los cultivos *in vitro*.

La capacidad de los fibroblastos estromales para sostener la hematopoyesis ha sido demostrada en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha demostrado que capas purificadas de fibroblastos estromales, permiten el crecimiento de las células CD34+ y CD34+ / CD10+ durante varias semanas, manteniendo tanto la mielopoyesis como la linfopoyesis B (Moreau et al, 1993); también se ha demostrado que estas células permiten el crecimiento de progenitores mas inmaduros, como células hematopoyéticas CD34+/CD38- generando células diferenciadas como monocitos, macrófagos, linfocitos B, megacariocitos y eritroblastos (Li et al, 1997). Estudios *in vivo* han demostrado que transplantar simultáneamente células hematopoyéticas con células estromales, tanto alogénicas como autólogas en el modelo de xenotransplante en oveja fetal, resulta en un incremento del injerto a largo plazo de células humanas, así como de un mayor número de células circulantes del donador durante la gestación y después del nacimiento (Almeida-Porada et al, 2000).

En sistemas *in vitro* se ha demostrado que los fibroblastos estromales son capaces de mantener la hematopoyesis sin la adición de citocinas exógenas ya que son capaces de sintetizar y secretar citocinas como la interleucina 1, 6, 7, 8, 11, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, SCF y el interferón beta (IFN β). Estas moléculas actúan sobre receptores específicos en las células hematopoyéticas, desencadenando cascadas de señalización que modulan la expresión de genes reguladores de proliferación, supervivencia, diferenciación, adhesión y secreción de citocinas. Los fibroblastos estromales también secretan una variedad de moléculas que forman parte de la matriz extracelular, como fibronectina (Yoder y Williams, 1995), colágena tipo I y III, heparán sulfato, ácido hialurónico (Gordon, 1988)

las cuales interactúan con las células hematopoyéticas, gracias a que éstas expresan en su superficie una serie de moléculas de adhesión, como VLA-4, VLA-5, $\alpha\text{L}\beta_2$ integrina y CD44, entre otras (Teixidó et al, 1992; Coulombel et al, 1997). Las moléculas de matriz extracelular también regulan la hematopoyesis a través de su interacción con citocinas, las cuales son captadas por esta matriz, y les confiere estabilidad, incrementando su tiempo de vida y restringiendo su ubicación en el medio (Yoder y Williams, 1995).

Los fibroblastos estromales producen y secretan quimiocinas, como el factor derivado del estroma (SDF-1), el cual regula la quimiotaxis de las células B y T, la migración de las células CD34+, así como suprime la apoptosis y promueve la transición G_0/G_1 de las células CD34+ (Lataillade et al, 2002).

Tanto las citocinas, quimiocinas, moléculas de la matriz extracelular, moléculas de adhesión, son necesarias para regular la autorrenovación, diferenciación, maduración, proliferación, muerte (apoptosis) y migración de las células hematopoyéticas (Dorshkind, 1990; Mayani et al, 1992).

1.4.2.2. Osteoblastos

La función más conocida de los osteoblastos es la de regular la reabsorción del hueso induciendo la expansión, maduración y activación de los precursores de los osteoclastos. Los osteoblastos son el blanco primario de los estímulos de reabsorción del hueso, como las prostaglandinas y la 1,25-dihidroxitamina D_3 (Emerson et al, 2001).

El papel de los osteoblastos como parte del estroma hematopoyético no había sido comprendido, debido a su escasez en los cultivos tipo Dexter y a la falta de métodos para aislarlos y cultivarlos. A la fecha no se cuenta con marcadores de superficie que permitan purificarlos directamente, y por lo general el cultivo se satura de fibroblastos estromales y células endoteliales. Gracias a las técnica de cultivo por explante – en donde es cultivado una fracción de hueso de la médula ósea- se ha logrado establecer cultivos homogéneos de osteoblastos primarios (Emerson et al, 2001).

Los osteoblastos producen una gran variedad de citocinas, capaces de regular la hematopoyesis, tanto positiva como negativamente. Se ha reportado la presencia de ácido ribonucleico (ARN) mensajero que codifica para el G-CSF, el M-CSF, el GM-CSF, la IL-1 y la IL-6. La producción de estas citocinas es basal, y puede ser regulada positivamente por

IL-1, el TNF α y lipopolisacáridos. A nivel de proteína se ha corroborado la producción de G-CSF, GM-CSF, IL-6; así como se ha encontrado la expresión del LIF, TNF α , VEGF, TGF- β y linfotoxina TNF- β (LT) (Taichman y Emerson, 1998).

Los osteoblastos han demostrado tener la capacidad para mantener la proliferación de células CD34+ en sistemas de co-cultivos (Taichman y Emerson, 1994). Se observó que estimulan preferencialmente a los progenitores de colonias granulocíticas (CFU-G), lo cual se debe probablemente a la secreción de grandes cantidades de G-CSF en ausencia de estímulos de inflamación, a diferencia de lo que ocurre con otros tipos celulares mesenquimales. De acuerdo con este modelo, los fibroblastos estromales, las células endoteliales y los miofibroblastos estarían únicamente incrementando la granulopoyesis, pero no manteniendo la basal.

En un estudio reciente Calvi y Adams y colaboradores (2003) encontraron que los osteoblastos son capaces de regular la hematopoyesis por otros mecanismos además de la secreción de citocinas. Estos autores reportaron en un modelo murino que los osteoblastos son capaces de regular a las CTH a través de la activación de Notch, presentando en su membrana a su ligando jagged-1 (jag-1).

Los osteoblastos son capaces de producir factores que permiten a las células hematopoyéticas dirigirse a la médula ósea (homing) como es la angiopoyetina 1 (Ang-1) (Arai et al, 2004) y el factor derivado del estroma (SDF-1) (Yu et al, 2003). La Ang-1 promueve la adhesión de las CTH a la fibronectina y colágena a través de su receptor Tie2, permitiendo que las CTH se localicen en un sitio específico de la médula ósea (nicho) que promueve su quiescencia y sobrevivencia. Se ha observado que la expresión de Ang-1 por parte de los osteoblastos es fundamental para el establecimiento de la hematopoyesis definitiva en la médula ósea.

Al parecer los osteoblastos presentan en su superficie varios receptores que permiten localizar a las células hematopoyéticas más primitivas, como el receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$), N-caderina, Tie2 y Jagged-1. Estos hallazgos han permitido establecer que los osteoblastos forman una zona o nicho que favorece la expansión de las CTH, lo cual tiene una gran relevancia no solo en la investigación básica sino en la clínica (Taichman, 2005).

1.4.2.3. Adipocitos

La presencia de adipocitos en el estroma post-natal depende de varios factores: 1) el estadio de desarrollo del esqueleto, ya que se ha observado que la adipogénesis progresa de la diáfisis a la epífisis; 2) la edad, el número de adipocitos incrementa con la edad; y 3) el nivel de hematopoyesis, debido a que la adipogénesis aparentemente correlaciona de manera inversa con la celularidad, y con la proporción del hueso que está llevando a cabo hematopoyesis (Deans, Moseley 2000). Su papel en la hematopoyesis no es muy claro, sin embargo se piensa que produzcan factores inhibidores de la hematopoyesis (Dorshkind, 1990; Mayani et al, 1992).

1.5. Células Troncales Mesenquimales

Las células troncales son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: son capaces de auto-renovarse, es decir de formar células idénticas a las células de origen, y tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo (Mayani, 2003). Dependiendo de su origen, las células troncales pueden dividirse en células troncales embrionarias y somáticas. Las células troncales embrionarias (CTE) son células pluripotenciales, es decir, cada una de ellas es capaz de generar todos los tipos celulares del organismo. Por su parte, las células troncales somáticas son, en su mayoría, multipotenciales ya que pueden generar una gran variedad de tipos celulares dentro de un tejido específico (Mayani, 2003).

Dentro del grupo de células troncales de adulto, las células troncales hematopoyéticas han sido las más estudiadas (desde de los años 50's), y en la actualidad se tiene un panorama bastante claro de su estructura y biología (Mayani, 2003). La investigación sobre células troncales de otros tejidos ha sido más reciente. Particularmente, el estudio de las células troncales mesenquimales comenzó a finales de los años 60's y extensamente durante la década de los 70's, con los trabajos realizados por Friedenstein y colaboradores. Este grupo, utilizando ratones y cobayos, describió por primera vez a las células adherentes de médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético, a las cuales denominaron como mecanocitos

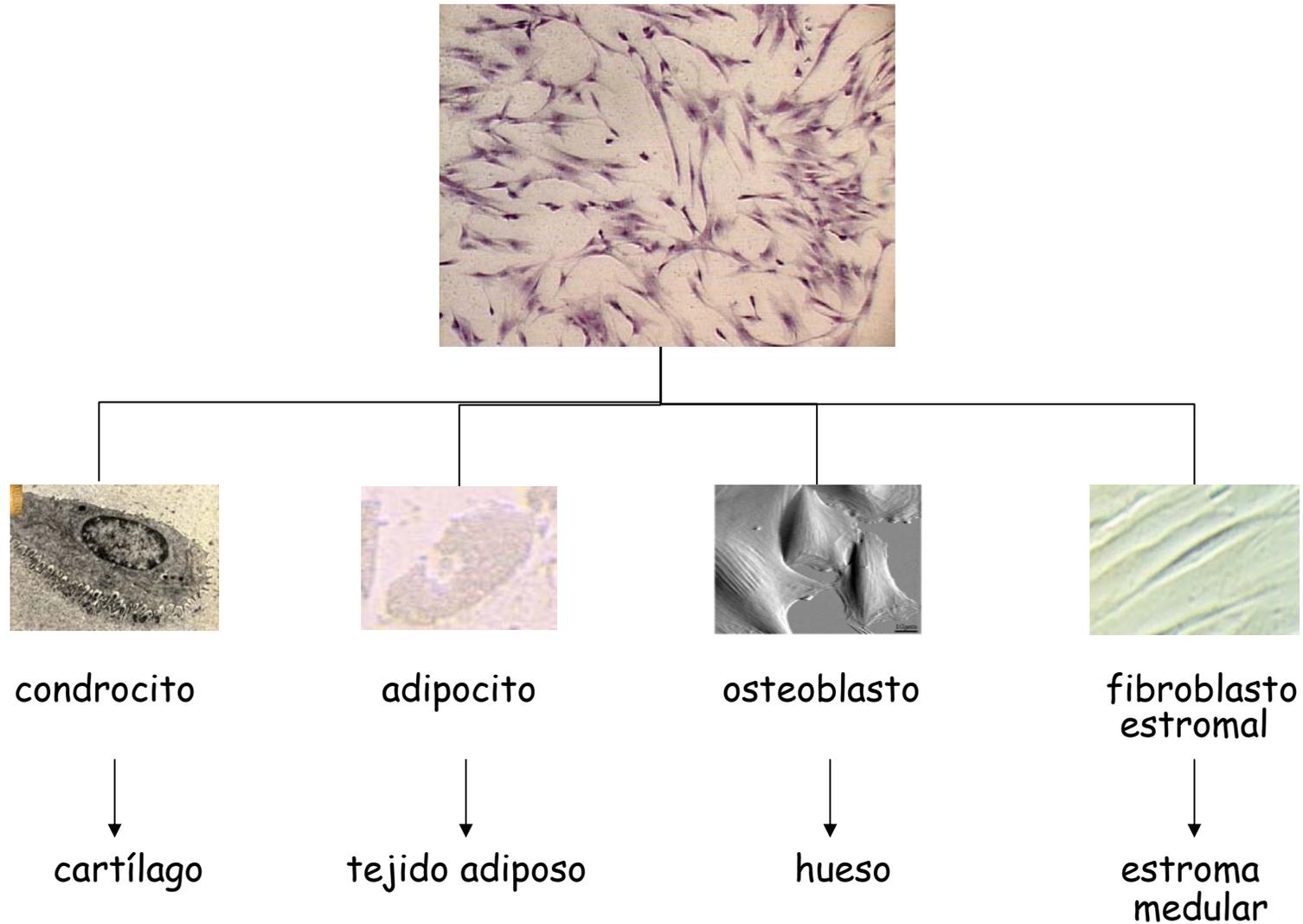
estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F, por sus siglas en inglés) (Friedenstein et al, 1968; 1970; 1978).

En la década de los 80's, varios grupos de investigación, entre los que se destacan los grupos de Piersma, Friedenstein y Owen, se dieron a la tarea de caracterizar a una población celular, proveniente de médula ósea capaz de originar el estroma medular, hueso y cartílago (Ashton et al, 1980; Bab et al, 1986). Durante esta etapa, los investigadores trabajaron intensamente en la caracterización y la biología de las células troncales mesenquimales, -aunque todavía no se utilizaba este término-. Los estudios se basaban principalmente en modelos de trasplante.

Piersma y colaboradores (1983) demostraron que las células de médula ósea contenían progenitores de fibroblastos, las cuales podían ser trasplantadas. Por su parte, Owen y colaboradores demostraron que estas células tenían la capacidad de originar tejido óseo, cartilaginoso y conjuntivo (Ashton et al, 1980), y que a partir de una pequeña cantidad de células de médula ósea inoculadas en cámaras de difusión, se generaba una gran cantidad de células estromales, lo que dejaba claro el gran potencial de proliferación y diferenciación de estas células Bab et al, 1986). Sin embargo, faltaban estudios con clonas aisladas que permitieran establecer si los osteoblastos, condrocitos y fibroblastos que originaban estos tres tejidos provenían de un progenitor común en la médula ósea o de distintos progenitores estromales.

El grupo del Dr. Friedenstein en 1987 abordó esta pregunta. Estos autores encontraron que las colonias de morfología fibroblastoide (CFU-F) formadas al cultivar *in vitro* una suspensión de células provenientes de la médula ósea, derivaban de una sola célula. Demostraron también la gran capacidad proliferativa de las CFU-F, su habilidad para autorrenovarse, y su multipotencialidad. Finalmente Owen y Friedenstein, propusieron a finales de los 80's, que existía una célula troncal presente en el tejido conjuntivo asociado a la médula ósea, capaz de dar origen a diferentes tipos celulares, en los que se incluía el tipo osteogénico (Esquema 3). Estos autores la denominaron como célula troncal estromal (Owen y Friedenstein, 1988). No fue hasta 1992, cuando el grupo de Caplan desarrolló una metodología que permitía cultivar y transplantar a células mesenquimales de humanos adultos y obtener la formación de hueso (Haynesworth et al, 1992).

Células Troncales Mesenquimales (MSC)



Esquema 3. Representación del mecanismo de mesengénesis. Generación de condrocitos, adipocitos, osteoblastos y fibroblastos estromales a partir de una célula troncal mesenquimal.

1.5.1 Métodos de obtención de las Células Troncales Mesenquimales

Desde los primeros estudios realizados por Friedenstein y Owen, se encontró que la población de células que se adherían en cultivo era heterogénea, tanto en morfología como en capacidad de diferenciación. Owen y Friedenstein (1988) por un lado, y más tarde Kuznetov y colaboradores (1997), demostraron que no todas las CFU-F tenían el mismo potencial para dar origen a células de distintos linajes. Por lo tanto se hizo necesario estandarizar las condiciones para cultivarlas y diferenciarlas *in vitro*.

El grupo de Friedenstein fue el primero en obtener a las células adherentes de médula ósea, en donde están contenidas las células troncales mesenquimales, y hasta la fecha este método de obtención sigue siendo utilizado. Los estudios *in vitro* de Friedenstein consistían en cultivar células provenientes de médula ósea de organismos adultos, después de un lapso de tiempo, retiraba todas las células en suspensión y cultivaba a las células adheridas en la caja de cultivo. Las células adherentes eran heterogéneas, sin embargo después de varias resiembras, predominaban células que crecían en forma de colonias, de morfología fibroblastoide, denominadas como células clonogénicas progenitoras de fibroblastos o CFU-F (Friedenstein et al, 1974; Friedenstein,1976).

El grupo de Caplan, en la década de los 90's, logró obtener y diferenciar células troncales mesenquimales de humanos adultos (Haynesworth et al, 1992), modificando el método utilizado por Friedenstein. Su metodología consistía en obtener médula ósea de aspirados de cresta iliaca de donadores sanos y células de médula de la epífisis femoral. Las células se obtenían en la fracción de baja densidad de un gradiente de Percoll. Después de tres días de cultivo las células no adherentes eran removidas y las células adherentes seguían siendo cultivadas *in vitro*. Los autores encontraron que de todas las células mononucleares sembradas, únicamente una baja proporción tenía la capacidad de adherirse y formar colonias. La mayor parte de las células adheridas tenían una morfología fibroblastoide, con pocas células poligonales, adipocíticas o redondas. La frecuencia que reportaron fue de 1 a 5 CFU-F por 100,000 células nucleadas de médula ósea sembradas. Las colonias se formaban a partir de los 14-21 días de cultivo, sin embargo, después de ese periodo se daba un crecimiento exponencial y las células cubrían rápidamente el área de cultivo.

Actualmente, algunos grupos continúan utilizando el gradiente de Percoll para obtener a las células troncales mesenquimales (Pittenger et al, 1999), sin embargo, otros grupos han utilizado gradientes de Ficoll (Colter et al, 2000; Sekiya et al 2002, Flores-Figueroa et al, 1999; 2005). Majumdar en 1998, realizó una comparación entre ambos métodos y encontró que al utilizar el gradiente de Percoll se obtenía una población más homogénea y pura de células troncales mesenquimales, sin embargo en este estudio se utilizaron medios de cultivo diferentes, por lo que los datos no pueden ser concluyentes y en la actualidad ambos métodos de obtención son aceptados.

La obtención de las células troncales mesenquimales de médula ósea mediante gradientes de densidad tiene la desventaja de que en las primeras resiembras se encuentran tanto células endoteliales como macrófagos contaminando los cultivos, por lo que son muy heterogéneos (Flores-Figueroa et al, 2005). Es por esto que recientemente se han tratado de implementar nuevas metodologías que permitan obtener células troncales mesenquimales más puras y homogéneas.

Los métodos de separación se basan tanto en características físicas de las células, como su tamaño (Shih-Chieh et al, 2002; Smith et al, 2004), como características inmunofenotípicas, utilizando anticuerpos como el STRO-1 o el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento neuronal (α -LNGFR o p75^{NGFR}) (Simmons y Torok-Storb, 1991; Quirici et al, 2002), o utilizando selección negativa (Flores-Figueroa et al, 2005). El inconveniente de la selección positiva es que hasta la fecha no se cuenta con un anticuerpo que reconozca únicamente a células troncales mesenquimales.

La selección negativa se basa en la eliminación de macrófagos, linfocitos, megacariocitos y células endoteliales, mediante marcadores específicos de membrana. Este tipo de selección es la más recomendable ya que evita el dejar a una población de interés fuera de los cultivos (lo que pudiera ocurrir al utilizar STRO-1, por ejemplo) así como favorece que los cultivos sean más homogéneos (Flores-Figueroa et al, 2005).

1.5.2 Caracterización de las Células Troncales Mesenquimales

Morfológicamente las células troncales mesenquimales se caracterizan por presentar una morfología espigada, en forma de huso, con la presencia de un núcleo alargado, central, que contiene de dos a tres nucleolos (Flores-Figueroa et al, 2005). A principios de los años

90 ya se contaba con la descripción de las células mesenquimales en la mayoría de los modelos animales y en humanos (Friedenstein et al, 1968; 1970; Ashton et al, 1980; Bab et al, 1986; Zohar et al, 1997; Haynesworth et al, 1992), también en esta fecha se les comienza a llamar Células Troncales Mesenquimales (Caplan, 1991). Sin embargo, faltaban estudios más detallados sobre su biología. Para llevar a cabo estos estudios, era necesario contar con una población purificada de estas células, y contar con marcadores de linaje y de estadio específico.

Desde entonces, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar moléculas que estuvieran expresadas diferencialmente en las células mesenquimales, tanto progenitoras como maduras. Hasta la fecha, no se ha identificado una molécula exclusiva que permita obtener o distinguir a las células troncales mesenquimales. En este momento, para obtener y caracterizar células mesenquimales se utiliza una batería de anticuerpos y tinciones. Las células troncales mesenquimales también han sido caracterizadas con anticuerpos ya conocidos y expresados en otros tipos celulares. Diversos trabajos concuerdan en que las células troncales mesenquimales no expresan los antígenos de células hematopoyéticas como: CD11b, CD14, CD31, CD34, CD43, CD45, CD56 y CD68; siendo positivos para el marcador de células hematopoyéticas CD90 (Conget y Minguell, 1999; Guo et al, 2001; Shih-Chieh et al, 2002; Flores-Figueroa et al, 2005).

Las células troncales mesenquimales son positivas para diversos receptores de factores de crecimiento y de matriz extracelular como: los receptores de la IL- 1, IL-3 α , IL-4, IL-6 e IL-7; el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (rPDGF), el α -LNGFR, el receptor del TGF β I y II, el receptor del TNF I y TNFII, el receptor del interferón gama (IFN γ) y transferrina (Pittenger et al, 1999), así como para las moléculas de adhesión, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, L-selectina, LFA-3, la molécula de adhesión de linfocitos activados (ALCAM), hialuronato, endogлина (CD105) y CD72 (Conget y Minguell, 1999; Pittenger et al, 1999; Guo et al, 2001; Majumdar et al, 2003)

Las células troncales mesenquimales también expresan una variedad de integrinas incluyendo α 1, α 2, α 3, α 5, α 6, $\alpha\alpha$, $\alpha\nu$, β 1, β 3 y β 4 (Pittenger et al, 1999; Majumdar et al, 2003). Por otra parte estas células son negativas a las siguientes reacciones citoquímicas: fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y sudán negro (Guo et al, 2001). Existe controversia sobre la expresión del antígeno STRO-1, ya que algunos autores no lo encuentran, mientras

que otros lo reportan incluso como método para obtenerlas (Haynesworth et al, 1992; Huss et al, 2000; Hung et al 2002).

Las células troncales mesenquimales producen y secretan diversas moléculas de gran relevancia en la hematopoyesis, tales como colágenas I, III, IV y VI, laminina, trombospondina, tenacina y fibronectina (Galmiche et al, 1993; Conget et al, 1999). Dentro de las citocinas que producen constitutivamente se encuentran: la IL-6, IL-11, LIF, M-CSF, SCF, el ligando de FLT-3, la trombopoyetina, VEGF, el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), la proteína quimioatrayente de monocitos uno (MCP-1) y el factor angiogénico PIGF (Zhu et al, 2003; Majumdar et al, 2000; Heil et al, 2004, Flores-Figueroa, en preparación). Al ser estimuladas con IL-1 α , incrementan los niveles de IL-6, IL-11 y LIF, y producen bajos niveles de G-CSF y GM-CSF (Majumdar et al, 2000) al ser estimuladas con IL-1 β incrementan los niveles de GM-CSF, y al estimularse con TNF α incrementan los niveles de SCF. (Flores-Figueroa, en preparación).

5.3 Multipotencialidad de las Células Troncales Mesenquimales

El término multipotencialidad se refiere a la capacidad de una célula para dar origen a distintos tipos celulares, dentro de un mismo tejido o capa embrionaria. Así, una célula troncal hematopoyética es capaz de dar origen a células sanguíneas tan distintas entre sí (ej. linfocito y un eritrocito) pero que pertenecen al mismo tejido, en este caso el hematopoyético.

La capacidad multipotencial de las células troncales mesenquimales comenzó a demostrarse *in vivo*, desde su primera descripción con los trabajos de Friedenstein, (Friedenstein et al, 1968;1970;1978) los cuales demostraron que al transplantar células mesenquimales previamente cultivadas *in vitro*, eran capaces de producir células de tipo fibroblastos y osteoblastos. Mas adelante, los trabajos realizados por el grupo de Owen demostraron en modelos animales, la capacidad de las células troncales mesenquimales para producir también, condrocitos y tejido conjuntivo. Sus estudios consistieron en cultivar células de médula ósea de conejo, y transplantarlas *in vivo* en cámaras de difusión. Ellos observaron que las células que crecían *in vitro* eran fosfatasa alcalina negativas, y negativas también para la reacción de Von Kossa. Sin embargo, al colocar a las células cultivadas *in vitro* en cámaras de difusión dentro de la cavidad peritoneal de los conejos,

estas células originaban una mezcla de tejido óseo, cartilaginoso y tejido conjuntivo. Estos autores demostraron, que la capacidad de originar células osteoblásticas, cartilaginosas y fibrosas, era única para las células mesenquimales de médula ósea, ya que fibroblastos aislados de bazo, desarrollaban únicamente tejido conjuntivo (Ashton et al, 1980).

El potencial de las células troncales mesenquimales humanas para producir células osteogénicas también fue demostrado. El grupo de Caplan logró cultivar y transplantar en ratones desnudos células troncales mesenquimales humanas y después de un periodo de tiempo encontrar la formación de hueso (Haynesworth et al, 1992). En este estudio se utilizaron capas de células estromales. Posteriormente, Kuznetsov y colaboradores (1997) demostraron a nivel de una sola colonia de células troncales mesenquimales, su potencial osteogénico.

Gracias a los trabajos del grupo de Prockop quedó demostrada la capacidad de las células troncales mesenquimales para diferenciarse *in vivo* en células de bazo, cartílago, médula y hueso (Prockop, 1997) Sus estudios consistieron en cultivar células mesenquimales troncales que contenían una mutación en el gen de la colágena tipo I, para permitir su monitoreo. Posteriormente las células fueron transplantadas en un ratón previamente radiado. Después de 5 meses se observó que las células del donador representaban hasta un 12% de las células de éstos tejidos.

Finalmente, los estudios de Pittenger y colaboradores (1999) demostraron *in vitro*, la capacidad de las células mesenquimales troncales humanas para diferenciarse en células adiposas, osteoblastos y condrocitos. Estos experimentos fueron realizados a partir de colonias CFU-F aisladas. Estos trabajos demostraron además, que la diferenciación de estas células depende de su ambiente, y que no todas las CFU-F tienen el mismo potencial de diferenciación (esquema 3).

1.6.- SINDROMES MIELODISPLASICOS (SMD)

Los Síndromes Mielodisplásicos (**SMD**) se definen como alteraciones primarias neoplásicas de las células seminales hematopoyéticas que en una elevada proporción de los casos se transforman a leucemia mieloide aguda (**LMA**). Se caracterizan por una o más citopenias en sangre periférica junto con cambios displásicos en la médula ósea (Bennett, 2002).

Los SMD han sido uno de los padecimientos hematológicos que más han presentado retos para el hemato-oncólogo debido a que su diagnóstico es de exclusión y hasta la fecha no se cuenta con una terapia curativa. Existe una gran variabilidad en el comportamiento tanto clínico como biológico en estos pacientes, lo que dificulta su estudio. Aunque no se cuenta con un registro estadístico de la incidencia de este padecimiento en México, de acuerdo a estudios de la fundación para la investigación de la leucemia del Reino Unido, los SMD son la malignidad hematológica más común en las personas de la tercera edad, tres veces más frecuente que la leucemia mieloide aguda, dos veces más que la leucemia linfocítica crónica y el mieloma y más común que todos los linfomas no Hodgkin juntos (revisado por Sánchez-Valle, 2004). En Estados Unidos se ha reportado una incidencia de 5 casos/100 000 habitantes/año en población general, la cual incrementa considerablemente en personas mayores de 60 años siendo de 20-50 casos/100 000 habitantes/año (Cazzola y Malcovati, 2005). La incidencia de casos de SMD ha crecido durante los últimos años, posiblemente por el aumento en la población adulta, por lo que su estudio es de gran interés en la medicina pública.

1.6.1 Características Clínicas y Diagnóstico

Los SMD se presentan con mayor frecuencia en individuos mayores de 50 años de edad, siendo la edad promedio de 70 años (Mayani, 1993; Mayer y Canellos, 1996; Bennett 2002). Únicamente del 10 al 20% de los pacientes son menores de 60 años. A pesar de la predominancia en pacientes de edad avanzada, los SMD también han sido descritos en individuos jóvenes y en niños (Hasle y Niemeyer, 2002).

A diferencia de los pacientes con LMA, los pacientes con SMD por lo general son asintomáticos a pesar de presentar anemia y frecuentemente son diagnosticados como resultado de pruebas hematológicas de rutina. Los hallazgos hematológicos pueden incluir

anemia, neutropenia y/o trombocitopenia. Sin embargo, una menor proporción de pacientes puede cursar únicamente con leucocitosis, trombocitosis o trombocitopenia aislada. La anemia es la citopenia más constante, presentándose en 85% de los pacientes. En una baja proporción de los casos (menos del 10%) pueden presentarse síntomas hemorrágicos por trombocitopenia y en aproximadamente 10% de los casos se presentan infecciones debidas a la neutropenia (Bennett, 2002).

Síntomas comunes pero inespecíficos son, la pérdida del apetito y la pérdida de peso. Los pacientes en ocasiones presentan un decremento de las células NK y de linfocitos T cooperadores. La médula ósea es normocelular o hipercelular en la mayoría de los casos. Sin embargo una proporción de pacientes cursan con una médula hipocelular. Los pacientes hipocelulares son de difícil diagnóstico y en ocasiones se confunden con pacientes con anemia aplásica (Mayani, 1993; Mayer y Canellos, 1996; Lichtman y Brennan, 2001; Bennett, 2002).

Entre el 30 y el 50% de los pacientes presentan cariotipos anormales (Bernasconi et al, 1994). 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, siendo las más comunes las deleciones del brazo largo del cromosoma 5 y la trisomía del cromosoma 8. La presencia de anomalías cromosómicas varía dependiendo del subtipo clínico. Los pacientes con los subtipos más agresivos como anemia refractaria con exceso de blastos y en transformación (AREB y AREB-T) presentan con mayor frecuencia cariotipos anormales (Bernasconi et al, 1994). Las deleciones cromosómicas asociadas a los SMD sugieren que una serie de genes supresores de tumor y/o genes de reparación del ADN se encuentran alterados. Usualmente, para que exista un cambio en la expresión de este tipo de genes es necesario que ocurran dos pasos, uno es la pérdida de la funcionalidad de una de las copias, mediante mutaciones, y el otro es la pérdida del segundo alelo a través de un evento genético más severo, como deleciones, duplicaciones o por recombinación (Hofmann et al, 2004).

Como parte del diagnóstico es importante la presencia de células con características displásicas, las cuales se presentan tanto en médula ósea como en sangre periférica. Los cambios displásicos pueden presentarse en las tres líneas hematopoyéticas y para confirmar el diagnóstico estos deben presentarse en por lo menos el 10% de las células.

1.6.2 Clasificación y Factores Pronósticos

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 (Lichtman y Brennan, 2001).

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 tanto en sangre periférica como en médula ósea, el grado de displasia tanto de la sangre periférica como de médula ósea, la presencia o no de sideroblastos y de monocitosis (revisado en Kouides y Bennett, 1997). Los subtipos son: Anemia Refractaria (AR), Anemia Refractaria con Sideroblastos (ARS), Anemia Refractaria con Exceso de Blastos (AREB), Anemia Refractaria con Exceso de Blastos en Transformación (AREB-t) y Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC).

De acuerdo con la clasificación de la FAB (1982), la supervivencia y la probabilidad de transformación leucémica varía dependiendo del subtipo. Los pacientes con AR y ARS pueden permanecer estables por años sin que la anemia o los síntomas empeoren, su transformación a leucemia oscila entre el 10 y el 17% y tienen una supervivencia promedio de 45 meses. Por otra parte, el tiempo de supervivencia es más corto (~10 meses) en pacientes con un número incrementado de blastos en la médula ósea, como en los subtipos AREB y AREB-T y su transformación a leucemia es hasta del 50%. Para el subtipo LMMC, la supervivencia media es de 30 meses y tiene una probabilidad del 20% de transformarse en LMA. A pesar de que esta clasificación permite establecer los factores pronósticos según el subtipo clínico, tiene muchas deficiencias pues existe un gran número de pacientes con SMD que no pueden ser clasificados dentro de los 5 subtipos convencionales, además de que no considera el cariotipo, el nivel de displasia y la celularidad medular que como ya ha sido documentado tienen un impacto importante en la supervivencia y en la transformación leucémica de los pacientes (Kouides y Bennett, 1997).

A partir de la clasificación de 1982 han surgido por lo menos 6 clasificaciones adicionales que intentan incluir tanto factores clínicos como patológicos y biológicos para poder predecir de mejor manera la supervivencia y el riesgo de una transformación

leucémica. Estas clasificaciones incluyen el grado de citopenia, el porcentaje de blastos, la citogenética de médula ósea, la presencia de fibrosis, la histología y localización anormal de los precursores, el inmunofenotipo y las características en cultivos *in vitro*. Sin embargo ninguna de estas clasificaciones llegó a una clasificación precisa y clara de los factores pronósticos en los pacientes. En 1997, se llevó a cabo un seminario internacional para el análisis de los factores de riesgo en los pacientes con SMD; a partir de éste se desarrolló un sistema de clasificación que combina parámetros de las anteriores clasificaciones denominado: Sistema Internacional de Pronóstico y Clasificación (IPSS, por sus siglas en inglés) (Greenberg et al, 1997). Este sistema, además de clasificar adecuadamente a los pacientes con SMD en cuatro diferentes grupos de riesgo, permite un mejor manejo en la elección de la terapia en cada paciente. El sistema IPSS permite estratificar a los pacientes en cuatro grupos de riesgo: bajo, intermedio-1, intermedio-2 y de alto riesgo. La estratificación por edad permite separar a pacientes de menos de 60 años en el grupo de riesgo bajo y a los mayores de 60 años en el grupo de riesgo intermedio. Este tipo de sistema permite la clasificación de los pacientes de acuerdo al porcentaje de blastos en médula ósea, el cariotipo y el número de citopenias presentes. El IPSS puede discriminar entre los subgrupos de otros tipos de clasificaciones. Por ejemplo en algunos casos, los subtipos AR y ARS se encuentran dentro del grupo de bajo riesgo y de riesgo intermedio-1 y los subtipos AREB y AREB-T en el grupo de riesgo intermedio-2 y alto (Greenberg et al, 1997).

Para incorporar de una mejor manera las diversas entidades clínicas comprendidas dentro de los Síndromes Mielodisplásicos, un grupo de prominentes hematólogos y hematopatólogos se reunieron bajo el auspicio de la Organización Mundial de la Salud (Bennet, 2000) y crearon un nuevo sistema de clasificación, el sistema de la organización mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés).

En el sistema WHO se excluyó la categoría RAEB-t, incluyéndola dentro de la leucemia mieloide aguda, consideraron la displasia multilineal dentro de los subtipos RA y RARS e incluyendo la LMMC únicamente si su cuenta de células blancas es de $<13,000/\mu\text{l}$. A pesar de que en esta nueva clasificación, no se incluyó una categoría para la mielodisplasia hipocelular, mielodisplasia con mielofibrosis y mielodisplasia secundaria, al parecer estas entidades están mejor categorizadas en la clasificación WHO que en la FAB.

Categoría	Sangre Periférica	Médula Ósea
1a Anemia Refractaria sin displasia	Blastos <1%, monocitos <1000mm ³	Blastos <5%, sideroblastos en anillo <15%
1b Anemia Refractaria con displasia	Blastos <1%, monocitos <1000mm ³ Disgranulocitos/plaquetas gigantes	Blastos <5%, sideroblastos en anillo <15%, disgranulocitos/dismegacariocitos
2a Anemia Refractaria con Sideroblastos sin displasia	Blastos <1% Monocitos <1000mm ³	Blastos <5% > 15% sideroblastos en anillo
2b Anemia Refractaria con Sideroblastos con displasia	Blastos <1% Monocitos <1000mm ³ Disgranulocitos/plaquetas gigantes	Blastos <5% >15% sideroblastos en anillo disgranulocitos/dismegacariocitos
3a Anemia Refractaria con Exceso de Blastos- I	Blastos 1-5% Monocitos Monocitos <1000mm ³	Blastos 5-10%
3b Anemia Refractaria con Exceso de Blastos- II	Blastos 6-20% Monocitos <1000mm ³	Blastos 11-20%
4 Leucemia Mielomonocítica Crónica	Blastos <1-20% Monocitos >1000mm ³	Blastos 0-20%

Bennet JM. Int. J. Hematol. 2000;72:131-133.

1.6.3 Historia natural y complicaciones clínicas

Debido a que los SMD se presentan en pacientes de edad avanzada, comúnmente la muerte esta relacionada con otros padecimientos ajenos al SMD. Aproximadamente el 20% de los pacientes muere de otra complicación no relacionada con esta enfermedad. La tercera parte de los pacientes se transforma a LMA y muere a consecuencia de la misma. En los pacientes que sí mueren por SMD, la mayor parte de las muertes (~64%) es causada por infecciones debidas a la neutropenia. El 60% de los pacientes tiene cuentas de neutrófilos menores a 2500/μl, además de que la clona displásica presenta anomalías en el funcionamiento de los granulocitos, en donde las funciones de adhesión, fagocitosis y quimiotaxis se encuentran alteradas. Por lo anterior, en ocasiones se inicia con terapia profiláctica con antibióticos. Menos común que las infecciones pero también otra causa de muerte son las hemorragias, que pueden ocurrir aún en ausencia de trombocitopenia como resultado de un funcionamiento anormal de las plaquetas (Kouides y Bennett, 1997).

Los pacientes con SMD pueden también presentar una amplia gama de enfermedades autoinmunes relacionadas con procesos inflamatorios. El uso de agentes inmunosupresores en estos pacientes, mejora no solamente las manifestaciones

autoinmunes sino también mejora las citopenias. Se ha observado que los pacientes con SMD tienen una mayor incidencia de tumores malignos que la población general. Se piensa que el incremento en el riesgo a desarrollar tumores malignos refleja un defecto en el sistema inmune que condujo al surgimiento de la clona displásica anormal en el sistema hematopoyético en estos pacientes (Kouides y Bennet, 1997).

1.6.4 Tratamiento

El tratamiento en los pacientes con SMD puede clasificarse en tres distintas categorías de acuerdo al tipo de terapia: (1) la terapia de diferenciación de la clona anormal, que puede ser inducida con el uso de citocinas o factores inductores de la diferenciación; (2) la terapia de supresión de la clona anormal, mediante el uso de quimioterapia de baja dosis para suprimir la hematopoyesis anormal o el uso de citocinas que estimulen la hematopoyesis normal o el uso de inmunoterapia; y finalmente (3) la terapia de eliminación de la clona anormal, que consiste en una dosis mieloablativa de quimioterapia, seguida por un trasplante alogénico de médula ósea para restablecer la hematopoyesis normal (Kouides y Bennet 1997).

La elección en el tipo de terapia depende fundamentalmente de tres factores: la severidad de la citopenia, el grado de progresión leucémica y la edad del paciente. Estos factores se encuentran reflejados en la clasificación IPSS (Bennett, 2002).

La principal meta en el paciente de edad avanzada es la de controlar las citopenias mediante el uso de la terapia de sostén, que incluye el uso de transfusiones y antibióticos, mientras que en el paciente joven lo que se persigue es el uso de una terapia curativa como el BMT. El tipo de tratamiento puede dividirse en dos grupos de acuerdo a la clasificación IPSS: el grupo de riesgo intermedio-2 y alto, y el grupo de riesgo intermedio-1 y bajo (Greenberg et al, 1997).

Grupo de Riesgo Alto y Riesgo Intermedio-2: debido a que la supervivencia media de estos pacientes es de aproximadamente un año, el uso de terapia agresiva debe de ser considerada. La terapia incluye el uso del trasplante de médula ósea en los pacientes que tienen por lo general menos de 50 años. El porcentaje de supervivencia libre de enfermedad varía entre el 20 y el 70%. Los factores que influyen en la respuesta son: la edad del

paciente, su subtipo clínico, el tipo de régimen de acondicionamiento, el uso de quimioterapia intensiva y si la medula ha sido depletada de linfocitos T. El uso de quimioterapia también puede ser una elección en estos pacientes, en donde se incluyen el uso de nuevos agentes como la 2-clorodeoxiadenosina, y el topotecan. Uno de los agentes que ha tenido un mejor resultado es el inhibidor de la topoisomerasa I, con el que se consiguió un 25% de casos con remisión completa (Greenberg et al, 1997).

Grupo de Riesgo Intermedio-1 y Bajo Riesgo: el tratamiento en estos grupos depende básicamente del grado de las citopenias. En pacientes con anemia dependientes de transfusión, es recomendable el uso de la eritropoyetina. Esta puede ser administrada sola o en combinación con G-CSF o GM-CSF. En pacientes trombocitopénicos con menos de 50 000 plaquetas/ml puede administrarse danazol o fluoxymesterona. En pacientes neutropénicos esta indicado el uso de G-CSF o GM-CSF. En pacientes que presentan una médula ósea hipoplásica recientemente han salido publicado estudios en donde se administra melfalan o ciclosporina con globulina anti-linfocito (Greenberg et al, 1997).

1.6.5 Biología de los Síndromes Mielodisplásicos

Las causas del SMD primario no son completamente claras. Análisis citogenéticos y enzimáticos (Delforge, 2003), han demostrado que los SMD corresponden a una patología clonal de las células hematopoyéticas, caracterizada por una maduración anormal y en estados avanzados, una proliferación descontrolada de las células hematopoyéticas. Anteriormente se pensaba que la alteración en las células hematopoyéticas se encontraba restringida a la línea mieloide, debido a que se identificaron precursores de eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos formando parte de la clona anormal (Hofmann et al, 2004). Mientras que en muy raras ocasiones los linfocitos T y B se encontraron involucrados en la hematopoyesis clonal (Van Kamp et al, 1992; Kroef et al, 1993). Sin embargo, un estudio realizado por Nilsson y colaboradores (2002) demostró que la alteración se encuentra a nivel de un progenitor más inmaduro, un progenitor linfomieloide. En su estudio analizaron pacientes que tenían la delección 5q- y trisomía 8. Las células progenitoras linfo-mieloides (CD34+CD38-Thy-1+) presentaban en todos los casos analizados la delección 5q- y presentaban anormalidades funcionales, pero no presentaban

trisomía 8. Lo que demuestra que la alteración en el cromosoma 8 es secundaria a la deleción del 5q y ocurre en células más maduras, por lo que los progenitores linfomieloides sí pertenecen a la clona anormal, aunque no presenten todas las alteraciones.

El modelo de patogénesis en los SMD involucra múltiples pasos. El primer paso consiste en una lesión inicial en una célula progenitora hematopoyética, que le confiere una ventaja de crecimiento. Esta lesión puede deberse a la exposición a toxinas, radiación, infección viral, agentes quimioterapéuticos o a una mutación espontánea, entre otras. Posteriormente ocurre una acumulación de alteraciones citogenéticas, que afectan el control del ciclo celular y genes supresores de tumor, lo que resulta en una expansión de la clona mielodisplásica. Uno de los pasos subsecuentes es la inhibición de la hematopoyesis normal, la cual se ve reflejada en la hematopoyesis inefectiva que presentan estos pacientes, cursando con cuadros clínicos de anemia, neutropenia o trombocitopenia (Hoffman et al, 2004). Los factores involucrados en la inhibición de la hematopoyesis incluyen una secreción incrementada de citocinas inhibitorias como el $TNF\alpha$ y el $TGF\beta$, entre otros, aunado a un incremento en la apoptosis de las células hematopoyéticas en médula ósea. Como paso final ocurre la progresión leucémica, la cual depende del tipo de genes alterados, más que al número de alteraciones presentes en la clona displásica. La transformación leucémica puede favorecerse con las alteraciones de genes adicionales que incluyan genes supresores de tumor y/o hipermetilación de genes importantes. Este último paso, se asocia a un decremento en la apoptosis y una acumulación de blastos tanto en sangre periférica como en médula ósea (Hoffman et al, 2004).

El primer reporte en donde se estableció que la apoptosis tenía un papel importante en los síndromes mielodisplásicos fue publicado en 1990 por Clark y Lampert. Estos autores, utilizando técnicas de microscopía electrónica, encontraron que la proporción de células en apoptosis era mucho mayor en la médula de los pacientes con SMD que en los controles de médula ósea normal. En 1993, Yoshida propuso que la apoptosis podría ser la responsable de la hematopoyesis inefectiva que se observa en los SMD. Mundle y colaboradores (1994), utilizando una técnica que mide la proliferación celular y la apoptosis en médula ósea, encontraron que en los SMD existe una elevada tasa de proliferación (reflejada por una médula normo o hipercelular) la cual se ve abatida por una alta tasa de muerte celular (reflejada por las citopenias en sangre periférica).

A partir de los estudios iniciales de Clark y Lampert (1990) y por otra parte de Yoshida y colaboradores (1993), se han publicado diversos trabajos que han demostrado un incremento en los niveles de apoptosis en las células hematopoyéticas de pacientes con SMD. Las técnicas para medir apoptosis han sido muy variadas, desde estudios morfológicos y ultraestructurales (Clark y Lampert, 1990; Bogdanovic et al, 1997; Shetty et al, 2000), estudios bioquímicos, que demuestran la fragmentación internucleosomal del ADN (Raza et al, 1995; Tsopou et al, 1999; Bouscary et al, 1997; Martínez-Jaramillo et al, 2002), estudios de marcaje *in situ* con la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) e ISEL (in situ end labeling, por sus siglas en inglés) (Raza et al, 1995; Bouscary et al, 1997; Kitagawa et al, 1998; Flores-Figueroa et al, 2002), así como por citometría de flujo, detectando la población subdiploide (Sub-G1), o marcadores específicos de membranas apoptóticas como anexina V (Rajapaska et al, 1996; Parker et al, 1998).

La fuente de células de médula ósea utilizadas para analizar la apoptosis en los SMD ha sido tanto de aspirados de médula, biopsias, células mononucleares y células CD34+, por lo que el nivel de apoptosis en los diferentes subtipos y en las diferentes subpoblaciones celulares de la médula ósea de los pacientes ha diferido entre los reportes. Los niveles de apoptosis reportados han variado desde un 1.5 al 27% de células en apoptosis, en los estudios estructurales utilizando biopsias y aspirados de médula ósea. En estos estudios se ha reportado que las células en apoptosis incluyen a los linajes eritroide y mieloide de todos los estadios de maduración. En el estudio de Clark y Lampert (1990) no encuentran diferencia en los niveles de apoptosis entre los subtipos, mientras que el estudio de Bogdanovic y colaboradores (1997) reportan niveles inferiores de apoptosis en CMML y RAEB-t y mayores en RA y RAEB. Los estudios de detección *in situ* mediante TUNEL e ISEL y por citometría de flujo analizando la anexina V, han reportado los porcentajes mas altos de apoptosis, siendo de un 39 y hasta 56% (Bouscary et al, 1997; Parker et al, 1998).

Mediante estudios morfológicos y utilizando la técnica de TUNEL, Mundle y colaboradores (1996) y Raza y colaboradores (1995) reportaron que existe un nivel elevado de apoptosis tanto en células hematopoyéticas (mieloides, eritroides y megacariocíticas) como en células del estroma. En un trabajo publicado por nuestro grupo (Flores-Figueroa et al, 2002), también encontramos un incremento en los niveles de apoptosis en las células

estromales. Sin embargo, Bogdanovic y colaboradores (1997) reportaron un incremento en la apoptosis en células mieloides y eritroides pero no en las células estromales.

Los estudios referentes a la detección de la fragmentación nucleosomal del ADN, no permiten mostrar un porcentaje de las células positivas para apoptosis, ya que refleja una suma de todas las células analizadas, sin embargo en estos estudios se puede reportar el porcentaje de pacientes con SMD con evidencias de apoptosis en las células hematopoyéticas. El porcentaje reportado por Raza y colaboradores fue del 60% de pacientes con AR y AREB. Tsopou y colaboradores (1999) reportaron una frecuencia menor, del 34% de los pacientes, pero en su estudio se analizaron todos los subtipos. En todos los casos las células de médula ósea normal no presentaron evidencias de apoptosis ni pacientes con leucemia mieloide aguda.

Estudios realizados por Bogdanovic y colaboradores (1997) y Rajapaksa y colaboradores (1996) utilizando el análisis de la ultraestructura y citometría de flujo para medir apoptosis, también reportan un incremento en el índice de apoptosis en estos síndromes, sin embargo difieren en el grado de apoptosis en cada subgrupo clínico y en los niveles de apoptosis en la médula. Raza y colaboradores (1995) reportan un mayor grado de apoptosis en el subgrupo AREB-t, mientras que Bogdanovic y colaboradores (1997) encuentran un alto índice apoptótico en AR y menos en AREB-t y LMMC. Rajapaksa y colaboradores (1996) observaron altos niveles de apoptosis en pacientes en etapas tempranas (AR y ARS) y niveles más bajos en AREB, AREB-t y en LMA. Las diferencias entre lo reportado por Raza y por Rajapaksa pudieran deberse a que el primer autor utilizó células mononucleares totales y Rajapaksa utilizó células CD34+.

Al parecer, el incremento en la apoptosis en los SMD es la causa de la hematopoyesis ineficaz y las citopenias, sin embargo no se conoce con claridad cual o cuales son los factores causantes de la apoptosis y si éstos provienen de las células hematopoyéticas o si las células estromales dentro de la médula ósea tienen un papel en dicho proceso.

II. Antecedentes

2.1 Estudio del Estroma en los Síndromes Mielodisplásicos

La paradoja en los SMD puede ser explicada ya sea por anormalidades en las propias células hematopoyéticas o anormalidades funcionales de las células del estroma. En lo que se refiere al compartimiento estromal, éste ha sido objeto de diversos trabajos. El cultivo líquido a largo plazo (LTMC, por sus siglas en inglés), es el modelo de estudio *in vitro* para analizar las células del estroma. Este método se basa en el cultivo de células provenientes de médula ósea, que son cultivadas en un medio líquido que contiene altas concentraciones de suero fetal bovino y suero de caballo. Este medio permite el crecimiento tanto de las células hematopoyéticas, como el desarrollo de una capa de células estromales. La capa de células estromales se desarrolla a partir de la segunda y tercera semana de cultivo; está conformada principalmente por fibroblastos estromales, macrófagos, adipocitos, osteoblastos y células endoteliales (Eaves et al, 1991).

En 1987 Borbenyi y colaboradores establecieron que la capa de estroma desarrollada en LTMC de pacientes con SMD es confluyente, aunque en algunos pacientes crecía en forma de parches, y que no existe diferencia en la morfología de los tipos celulares que la conforman con respecto a los LTMC de médula ósea normal; sin embargo, no se hicieron análisis muy detallados. Estos autores reportaron una disminución en el número de células totales y de progenitores hematopoyéticos en los LTMC de pacientes con SMD.

Existen varios estudios, incluyendo uno de nuestro laboratorio, en donde se establece que las capas de estroma en los pacientes con SMD es confluyente y que el número de progenitores de fibroblastos (CFU-F) es normal (Borbenyi et al, 1987; Wetzler et al, 1995; Flores-Figueroa et al, 1999), es decir, no se encuentran alteraciones en el número de células estromales ni de sus progenitores. Sin embargo, diversos estudios han reportado anormalidades funcionales en el estroma de estos pacientes (Coutinho et al, 1990; Aizawa et al, 1999). En dichos estudios se reporta una marcada deficiencia del estroma de pacientes con SMD para sostener la hematopoyesis normal e incluso se encontró que el estroma de algunos pacientes es capaz de inducir apoptosis a las células hematopoyéticas, que no

permite la diferenciación de los precursores, ni el desarrollo de los progenitores hematopoyéticos.

Dentro de las alteraciones funcionales, se encuentran diferencias importantes en la secreción de proteínas reguladores de la hematopoyesis. En los cultivos a largo plazo de pacientes con SMD, se ha reportado que los niveles de $\text{TNF}\alpha$ (Mundle et al, 1994; Kitagawa et al, 1997; Flores-Figueroa et al, 2002; Boudard et al, 2003), de IL-6 (Wetzler et al, 1995) de IL-1 β (Boudard et al, 2003), de $\text{IFN}\gamma$ (Kitagawa et al, 1997) y de $\text{TGF-}\beta$ (Mundle et al, 1996) se encuentran incrementados. La sobre expresión de estas citocinas en la médula ósea de los pacientes con SMD correlaciona con el grado de apoptosis en las células hematopoyéticas de éstos pacientes. La producción anormal de estas citocinas puede estar afectando a las células hematopoyéticas de estos pacientes, y por lo tanto estar relacionadas con la fisiopatología de los SMD. Sin embargo, cabe resaltar que hasta el momento no se ha establecido qué tipo o tipos celulares son los responsables de la producción de estas citocinas, debido a que los cultivos a largo plazo tienen una composición muy heterogénea de células estromales.

Los macrófagos son las únicas células del estroma medular que provienen de la célula troncal hematopoyética, por lo que se sugirió que los macrófagos de los pacientes con SMD pudieran estar alterados por provenir de la clona mielodisplásica. Ohmori y col. (1993) demostraron que el medio condicionado de macrófagos de pacientes con SMD inhibía el crecimiento de los progenitores mieloides (CFU-GM), y el efecto era mayor en progenitores provenientes de la clona mielodisplásica. Este efecto era neutralizado parcialmente al incubar el medio condicionado con anticuerpos anti-ferritina y anti- $\text{TNF}\alpha$. Sin embargo en este estudio no se utilizó un control con medio condicionado de macrófagos normales, cabe mencionar que en el trabajo de nuestro grupo (datos no publicados) hemos encontrado que el medio condicionado de macrófagos normales también inhibe el crecimiento de los progenitores.

Existen pocos trabajos con capas de fibroblastos estromales de pacientes con SMD. Coutinho et al (1990) encontraron que la proliferación de este tipo celular se encontraba disminuida. Por otra parte, se han reportado niveles disminuidos de SCF en el plasma de estos pacientes (Cortezzi et al, 1999), por lo que posiblemente exista una alteración en la producción de dicha citocina por parte de los fibroblastos. En un estudio anterior realizado

por nuestro grupo (Flores-Figueroa et al, 2002), en donde trabajamos con capas enriquecidas de dos principales componentes del estroma, uno hematopoyético (macrófagos) y el otro mesenquimal (fibroblastos estromales), reportamos que no existen diferencias en el crecimiento de fibroblastos de pacientes con SMD, ya que su cinética de crecimiento y el número de progenitores de fibroblastos fue semejante al de médula ósea normal. Sin embargo aunque no encontramos diferencias cuantitativas, si encontramos que las capas enriquecidas de fibroblastos de pacientes con SMD expresan una mayor cantidad de TNF α y de IL-6. Nuestro estudio sugirió que los fibroblastos estromales podrían estar produciendo cantidades incrementadas de citocinas, sin embargo, debido a que los cultivos de fibroblastos estromales contenían un porcentaje de macrófagos, no podía establecerse que las células de origen mesenquimal estuvieran alteradas. Eran necesarios estudios con células purificadas y establecer si el componente mesenquimal del estroma y las células que le dan origen estaban alterados.

III. Planteamiento del Problema

La investigación en el campo de las células troncales mesenquimales ha crecido notablemente durante los últimos años. Las líneas de estudio han estado basadas no solamente en la caracterización de las propiedades biológicas de éstas células, lo cual es importante para entender la biología del estroma y la hematopoyesis, sino dirigida a su uso en la clínica. La investigación en este aspecto ha estado encaminada al desarrollo de terapias celulares y de terapia génica para el tratamiento de una variedad de enfermedades (Deans y Moseley 2000; Javanson et al, 2004). Existen principalmente dos puntos de controversia dentro del campo de la biología de las células troncales mesenquimales. El primero se relaciona con su origen. Existe evidencia que indica que las células troncales mesenquimales y hematopoyéticas comparten un progenitor común (Singer et al, 1984; Zhang et al, 1999; Huss y Moosmann 2002), así como otros reportes sugieren que cada línea proviene de progenitores independientes (Maniatis et al, 1969). El segundo punto se relaciona con su posible papel en el origen o progresión de ciertas enfermedades hematológicas (Mayani, 1996; Dührsen y Hossfeld, 1996; Wallace et al, 2001).

Durante los últimos años los Síndromes Mielodisplásicos han surgido como un modelo para el estudio de las células troncales mesenquimales, principalmente por dos razones. La primera se basa en que al momento del diagnóstico, entre el 40 y 70% de los pacientes con SMD presentan alteraciones cromosómicas (Bernasconi et al, 1994), por lo que es posible estudiar el origen clonal de la enfermedad. Por otra parte, existe evidencia de que tanto el componente hematopoyético, como estromal, de los pacientes con SMD se encuentran alterados (Flores-Figueroa et al, 2002). Los estudios en capas estromales de médula ósea de pacientes con SMD han sido muy heterogéneos, con condiciones de cultivo variadas y en donde no se establece con claridad cuales son y en que proporción se encuentran los componentes estromales.

Por lo anterior, la caracterización de las MSC de pacientes con SMD es importante ya que nos permitirá establecer si las alteraciones encontradas en estudios anteriores, en las capas estromales y en las capas enriquecidas de fibroblastos estromales son debidas a que la alteración se encuentra presente en las células más inmaduras (MSC) o son originadas por las alteraciones en las células diferenciadas.

Este trabajo pretende realizar una caracterización más extensa del componente mesenquimal del estroma de los pacientes con SMD, utilizando una población pura de células troncales mesenquimales en cultivo. Se analizarán varios aspectos que nos permitan definir si las MSC son funcionalmente normales o presentan una alteración, esto mediante la cuantificación de citocinas importantes para la hematopoyesis, la evaluación de dos de las moléculas de matriz extracelular más abundantes, su inmunofenotipo y morfología y más importante, los estudios de co-cultivo que nos permitan establecer si las capas de células mesenquimales de pacientes con SMD son capaces de soportar la hematopoyesis normal; ya que como se mencionó, este tipo de estudios se ha llevado a cabo anteriormente con capas estromales que contenían macrófagos.

En este estudio pretendemos establecer si las alteraciones encontradas en estudios anteriores en los fibroblastos estromales, se deben a que éstos derivan de células troncales mesenquimales que provengan de la clona anormal, mediante el análisis del cariotipo tanto en las células hematopoyéticas como en las mesenquimales.

Para llevar a cabo este estudio nos hemos planteado los siguientes objetivos:

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

- Caracterizar *in vitro* a las células troncales mesenquimales presentes en la médula ósea de pacientes con Síndrome Mielodisplásico.

4.2. Objetivos Particulares

1. Establecer cultivos de células troncales mesenquimales enriquecidos en más de un 95%.
2. Realizar una comparación morfológica e inmunofenotípica de las células troncales mesenquimales de médula ósea normal y de pacientes con SMD.

3. Evaluar si el cariotipo de las células troncales mesenquimales de pacientes es normal o presenta alguna alteración.
4. Evaluar la producción de $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, SCF y GM-CSF por capas de células troncales mesenquimales normales y de pacientes con SMD.
5. Medir los niveles de expresión de fibronectina y colágena por parte de las células troncales mesenquimales normales y de pacientes con SMD.
6. Evaluar la capacidad de adhesión de células hematopoyéticas normales a capas de células troncales mesenquimales tanto normales como de pacientes con SMD.
7. Evaluar si las células troncales mesenquimales de pacientes con SMD son capaces de mantener la hematopoyesis normal.

V. Metodología

5.1 Muestras biológicas

Las muestras de pacientes con Síndrome Mielodisplásico y de médula ósea normal fueron obtenidas en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social. Los pacientes con diagnóstico de Síndrome Mielodisplásico fueron sometidos a la toma de un aspirado de médula ósea en la cresta ilíaca postero-superior como parte de las pruebas clínicas y de cariotipo. La médula ósea de sujetos sanos (MON) fue obtenida de los donadores de médula ósea para trasplante alogénico. Las muestras de médula ósea fueron obtenidas bajo anestesia local, en jeringas de plástico heparinizadas, se recolectaron entre 3 y 5 ml de muestra la cual fue procesada el mismo día. Las células progenitoras de cordón umbilical se obtuvieron de la sangre de cordón umbilical obtenida de partos realizados en el Hospital General de Zona Troncoso (IMSS) (esquema 4).

5.2 Obtención de células troncales mesenquimales

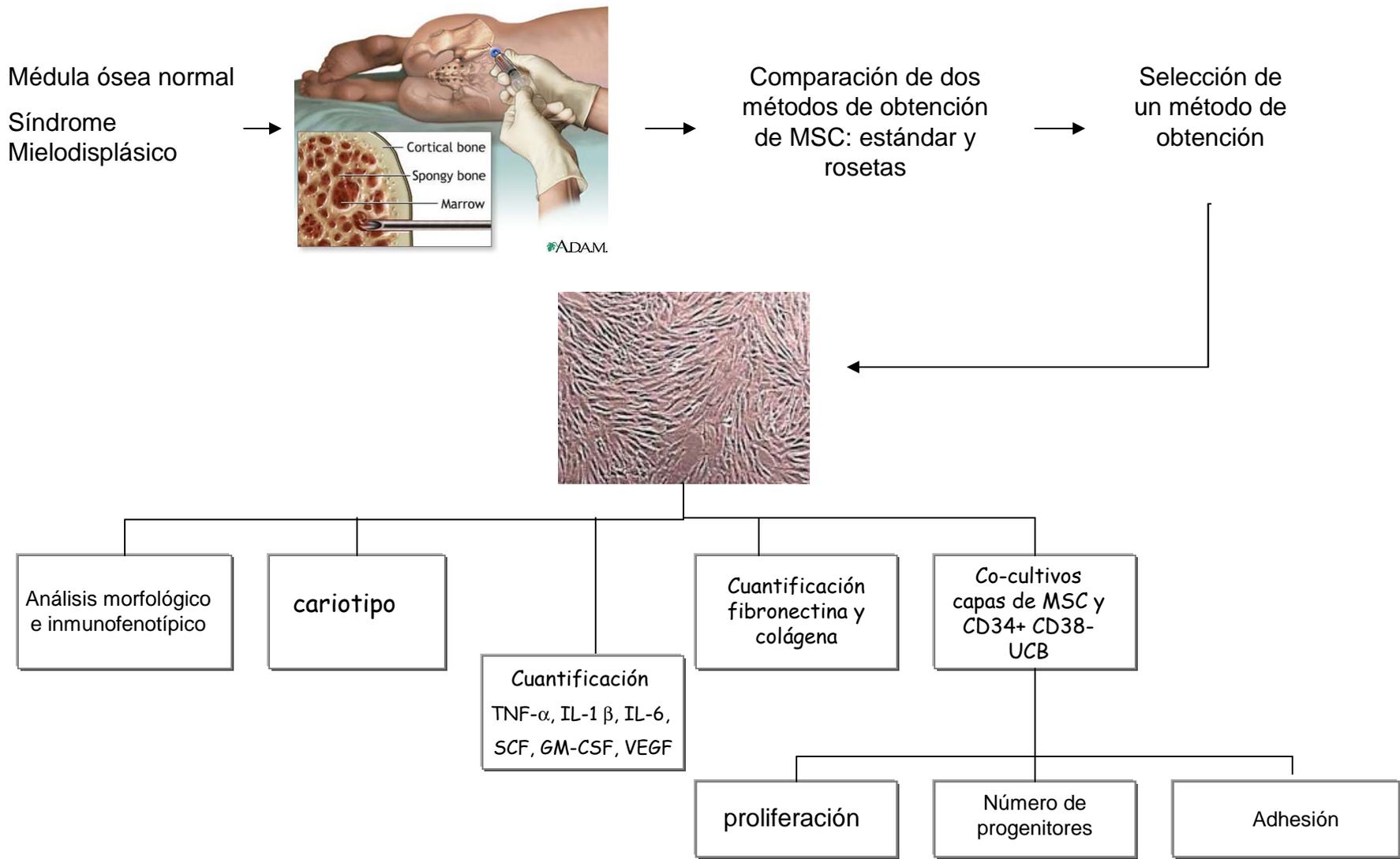
El aspirado de médula ósea fue centrifugado durante 7 minutos a 1200 rpm, se obtuvo la capa intermedia (buffy coat) y se lavó con PBS. Las células fueron sometidas a un gradiente de densidad (<1.077 g/ml) (Ficoll-Paque®, Pharmacia Biotech) durante 30 minutos a 400 gravedades. Se tomó la interfase (células mononucleares, CMN) y se lavó con PBS durante 7 minutos a 1200 rpm. Se obtuvo la pastilla y se resuspendió en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco). Las células mesenquimales tanto de pacientes como de sujetos hematológicamente sanos se obtuvieron de aspirados de médula ósea mediante dos métodos de selección, por adhesión y por selección negativa. La selección por adhesión consistió en cultivar de $1-5 \times 10^5$ células mononucleares en botellas de cultivo (Falcon T25) durante tres días en medio para células mesenquimales (Mesencult Stem Cell Technologies™) con 10% de suero fetal bovino (FBS) probado para el crecimiento de células mesenquimales (Stem Cell Technologies™) y 10u/ml de penicilina y 10µg/ml de estreptomina (Sigma) a 37°C y 5%CO₂. A los tres días de cultivo se retiraron todas las células no adherentes, se lavó la botella con un buffer de fosfatos (PBS, Gibco) y se agregó medio fresco. El cambio de medio fue realizado semanalmente. Las células

mononucleares fueron obtenidas de aspirados de médula ósea (3-5 ml).

La obtención de células troncales mesenquimales por inmunoselección negativa se realizó mediante un kit comercial (Rosett Sep®, Stem Cell Technologies™) que se basa en la eliminación de células hematopoyéticas. Se tomaron de uno a dos mililitros del aspirado de médula ósea y se colocaron en un tubo de centrifuga estéril de 15 ml (Corning) Se les agregó 50 µl por mililitro de una mezcla de anticuerpos que incluía: glicoforina A, CD3, CD14, CD19, CD38 y CD66b y se incubó por 20 minutos. Las células fueron diluidas con el doble de su volumen de un medio de lavado que contenía: PBS (Gibco) con 2% de suero feto bovino (SFB) (Stem Cell Technologies™) y 1 mM EDTA (Sigma). Posteriormente las células fueron colocadas sobre 5 ml de Ficoll (Ficoll-Hypaque Plus, Pharmacia Biotech) y centrifugadas durante 25 minutos a 300 g. Se obtuvo la interfase y se les agregó medio de lavado hasta que el volumen alcanzó los 10 ml. Las células fueron centrifugadas por 7 minutos a 1200 rpm y se obtuvo la pastilla. Las células se resuspendieron en un medio para células mesenquimales (Mesencult Stem Cell Technologies™) con 10% de suero fetal bovino (FBS) probado para el crecimiento de célula mesenquimales (Stem Cell Technologies™) y 10 ul/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina (Sigma) Las células viables se contaron con un hemocitómetro diluyéndolas con azul de tripano (Gibco). Las MSC fueron cultivadas en botellas de cultivo (Falcon T25) durante cinco días en medio para células mesenquimales (Mesencult Stem Cell Technologies™) con 10% de suero fetal bovino (FBS) probado para el crecimiento de célula mesenquimales (Stem Cell Technologies™) y 10u/ml de penicilina y 10µg/ml de estreptomicina (Sigma) a 37°C y 5%CO₂. Posteriormente se retiraron todas las células no adherentes, se lavó la botella con un buffer de fosfatos (PBS, Gibco) y se agregó medio fresco. El cambio de medio fue realizado semanalmente.

5.3 Ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)

Para cuantificar la frecuencia de progenitores de células mesenquimales en ambos métodos de selección, se realizó el ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos. Se adicionaron 1.5×10^5 células mononucleares o $1-5 \times 10^4$ células troncales mesenquimales a 1.5 ml de IMDM (Gibco) suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco) a una caja de petri de 35x10 mm (Corning). Se incubaron a 37 °C y 5% CO₂



Esquema 4. Diagrama de flujo de la metodología.

durante tres días. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se desechó, la caja se lavó con PBS estéril y se agregó medio fresco (IMDM + 20%FBS, Gibco). La caja se volvió a colocar en la incubadora a 37 °C y 5% CO₂. Después de 7 días se retiró el medio de cultivo y se lavó la caja dos veces con PBS y se dejó secar 12 horas a temperatura ambiente. Una vez seca, la caja se tiñó con Wright-Giemsa (Sigma) y se dejó secar. Se realizó la cuantificación de las unidades formadoras de colonias de fibroblastos mediante la utilización de un microscopio invertido (Olympus). De acuerdo a su morfología se cuantificó como una colonia aquellos grupos o focos de células fibroblastoides que crecían en una misma dirección y tenían un centro definido.

5.4 Cultivo de células troncales mesenquimales

Las células se cultivaron en placas de 6 pozos (Corning) tratadas para permitir el crecimiento de células adherentes. Se cultivaron a una densidad de entre 5×10^4 a 3×10^5 células mononucleares por mililitro, en un medio comercial (MESENCULT™ Stem Cell Technologies™) específico para células mesenquimales suplementado con 10% de FBS probado para células mesenquimales (Stem Cell Technologies™). Este medio permite el crecimiento y expansión de las células troncales mesenquimales sin diferenciarlas. Una vez que llegaron a confluencia se les agregó una solución de tripsina 0.05% - EDTA 0.53 mM (Gibco) durante 9 minutos a 37 °C, se lavaron con PBS y se centrifugaron por 7 minutos a 1200 rpm. La pastilla se resuspendió en el medio de cultivo y se cultivaron en botellas falcon de 9.6 cm² y 75 cm² a una densidad de 5×10^3 células/cm². La población de células mesenquimales obtenidas de esta última resiembra (2da resiembra) fue utilizada en los diversos ensayos.

5.5 Congelación de Células Troncales Mesenquimales

Una vez obtenidas, una fracción de las células troncales mesenquimales fue congelada en nitrógeno líquido para su posterior uso. Brevemente, se agregó medio de congelación (50% FBS, 40% de IMDM y 10% de DMSO) a 1×10^6 de células, se colocaron a -70 °C por un día y posteriormente se colocaron en un tanque de nitrógeno líquido.

5.6 Descongelación de Células Troncales Mesenquimales

El vial con las células congeladas fue colocado en un baño a 37 °C; una vez que las células se descongelaron se limpió el vial con etanol y se les agregó IMDM con 2% de FBS (Stem Cell Technologies™). Las células se transfirieron a un tubo de 15 ml (corning) y se les agregó lentamente 10 ml de IMDM con 2% de FBS. Las células fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 8 minutos. La pastilla se resuspendió en 500 µl de Mesencult.

5.7 Evaluación del Inmunofenotipo de las células mesenquimales

Para corroborar el grado de enriquecimiento de la población de células troncales mesenquimales obtenidas mediante el método de adhesión y selección negativa, se aplicó la técnica de inmunocitoquímica para la detección de los antígenos CD14 (DAKO) y CD68 (DAKO), para evaluar la presencia de macrófagos en el cultivo. La técnica de inmunocitoquímica se realizó con un kit comercial Biotina-Estreptavidina (Biogenex). Brevemente, las laminillas previamente fijadas con acetona, se lavaron con PBS (Gibco) y se incubaron por 30 minutos con el anticuerpo primario en una cámara húmeda, posteriormente se lavaron dos veces con PBS (Gibco) y se incubaron por 20 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con biotina, después del tiempo de incubación se lavaron dos veces y se incubaron con la enzima conjugada con estreptavidina por 20 minutos, se lavaron dos veces con PBS (Gibco) y se incubaron entre 5 y 10 minutos con la solución de revelado. Las células positivas se cuantificaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss), la señal positiva se observó como un precipitado de color café.

Para conocer el inmunofenotipo de las células mesenquimales se analizó la expresión de algunos antígenos mediante la técnica de citometría de flujo en un equipo Coulter ALTRA ubicado en el Hospital de Especialidades del CMN S XXI IMSS. Se utilizaron los anticuerpos CD34-FITC (caltag) y CD14-PE (caltag) que reconocen a células hematopoyéticas primitivas y a monocitos-macrófagos, respectivamente, para descartar la presencia de células hematopoyéticas. Así como se evaluaron los siguientes marcadores, los cuales se encuentran expresados en las MSC: CD90 (Thy-1) (BD), CD105 (endoglina) (caltag), y CD29 (integrinaβ1) (caltag). Brevemente, las células mesenquimales de 2da resiembra se fijaron en etanol al 80% y se guardaron a -20°C. Para ser utilizadas se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo por 30 minutos en obscuridad, se lavaron

con PBS y se analizaron en el citómetro de flujo. Se utilizaron los controles de isotipo (caltag) de acuerdo al anticuerpo primario.

5.8 Estudios de Morfología

Las células fueron cultivadas en cámaras con base desmontable para ser utilizadas como laminillas (Lab-Tek II Chamber Slide System, Nalge Nunc Inter.) en el 1er y 2do pasaje. Los cultivos se estudiaron en confluencia y en semiconfluencia. Se les realizaron diversas tinciones como fosfatasa alcalina y Wright-Giemsa (Sigma). La técnica de detección de fosfatasa alcalina fue aplicada en laminillas con MSC de donadores y pacientes en segundo pasaje fijadas con acetona. Las laminillas se sumergieron 20 minutos en un medio de incubación (5 mg de Naftol AS-BI fosfórico en 0.2 mL de N-N-dimetilformamida mezclado con 60mL de propaneol al 2.5% y 40 mg de fast garnet, Sigma) en oscuridad. Las laminillas se sacaron del medio de incubación y se lavaron con agua destilada. Se tiñeron 30 segundos con hematoxilina (Sigma), seguidos de 10 segundos con agua amoniacal y finalmente se lavaron con agua destilada. Las laminillas se dejaron secar y se montaron para su análisis en el microscopio óptico (Carl Zeiss). La actividad enzimática apareció como gránulos rojo brillantes en el citoplasma celular. La técnica de tinción con Wright-Giemsa fue realizada con un kit comercial (Sigma). Las laminillas sin fijar fueron incubadas por 5 minutos con la solución 1 (colorante), sin lavar se agregó la solución 2 (fijadora) por 5 minutos y finalmente las células fueron lavadas con la solución 3. Las laminillas se dejaron secar y fueron montadas (Vecta-Mount, Vectra).

5.9 Estudio de Cariotipo

El estudio de cariotipo fue realizado con la colaboración de la M. en C. Rosa María Arana en el Hospital General de México. Las células en confluencia fueron tratadas con tripsina 0.05% - EDTA 0.53 mM (Gibco), se dejó actuar de 1 a 2 minutos. Una vez despegadas las células de la monocapa se inactivó la tripsina con medio de cultivo con suero fetal 10% (gibco). Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 7 minutos. La pastilla se resuspendió en 2-3ml de medio RPMI1640 suplementado. Se adicionaron de 500 a 750 μ l de la suspensión celular en un cubreobjetos de 22x22mm colocado previamente en

una caja petri de 10x35 mm estéril. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 24 hrs (dependiendo de la cantidad de células se hicieron entre 2 a 5 cajas por caso).

A las 24 hrs se adicionaron 3 ml de medio de cultivo suplementado y se incubaron por 24 hrs. Se revisaron los cultivos en el microscopio invertido y cuando la confluencia celular y las figuras mitóticas eran suficientes se adicionaron 100 µl de colchicina al 0.02% por 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la caja con PBS (gibco) y se adicionaron 3 ml de una solución de citrato de sodio al 8% (Sigma) precalentada a 37°C y se dejó actuar una hora y media a temperatura ambiente. Se fijaron las células agregando 2 ml de fijador de carnoy (metanol-ácido acético 3:1 Sigma) por 2 minutos, se retiró la solución y se adicionaron otros 3 ml de fijador, se dejó actuar 10min y se repitió el procedimiento. Las preparaciones fueron secadas a la flama, se retiró el cubreobjetos, se etiquetó, y se revisó en el microscopio invertido para valora la calidad de la preparación cromosómica. Se dejó deshidratar la preparación por 24 hrs a 60°C y se realizó el bandeo cromosómico con tripsina al 1% (Gibco). Se montaron las laminillas y se realizó el análisis cromosómico.

5.10 Síntesis de Fibronectina

El ácido ribonucleico (ARN) se obtuvo utilizando la técnica de Tripure™ (Boehringer Mannheim) de 1 x10⁶ de células mesenquimales tanto normales como de pacientes. Cien nanogramos de cada ARN fueron convertidos en cDNA y amplificado mediante la técnica de RT-PCR utilizando el kit comercial TITAN™ (Boehringer Mannheim). Las secuencias de los iniciadores que fueron utilizados fue la siguiente: fibronectina (5' CGAAATCACAGCCAGTAG 3' y 5' ATCACATCCACACGGTAG 3'; gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' y 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: amplificación 94 °C seguido por 15 ciclos de 94 °C por un minuto, 55 °C por un minuto y 72 °C por un minuto. Los productos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa (Roche) al 2 % teñido con bromuro de etidio (Weston et al, 2001).

5.11 Síntesis de Colágena

Para evaluar la producción de colágena se realizó un método indirecto, el cual

consiste en la detección de la enzima proli-4 hidroxilasa, la cual es una enzima fundamental para la síntesis de colágena. Mediante este método no es posible distinguir entre los distintos tipos de colágena, únicamente se puede evaluar si la célula se encuentra produciendo colágena. La enzima fue evaluada mediante inmunocitoquímica empleando el anticuerpo 5B5 (DAKO). La técnica de inmunocitoquímica se realizó con un kit comercial Biotina-Estreptavidina (Biogenex). Brevemente, las laminillas previamente fijadas con acetona, se lavaron con PBS y se incubaron por 30 minutos con el anticuerpo primario; se lavaron dos veces con PBS y se incubaron por 20 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con biotina; se lavaron dos veces y se incubaron con la enzima conjugada con estreptavidina por 20 minutos; se lavaron dos veces con PBS y se incubaron entre 5 y 10 minutos con la solución de revelado. Las células positivas se cuantificaron en el microscopio óptico (Carl Zeiss), la señal positiva se observa como un precipitado de color café.

5.12 Análisis de la producción de citocinas

Las células mesenquimales fueron cultivadas a una densidad de 5,000 células/pozo en placas de 24 pozos, por duplicado. Una vez que se alcanzó la confluencia de los cultivos se cultivaron en presencia y ausencia de 10 ng/ml de TNF α por 48 horas. El medio condicionado fue obtenido y filtrado (0.2 μ m) y almacenado a -20 °C para su posterior uso. Los niveles de citocinas TNF α , IL-1 β , IL-6, SCF, GM-CSF y VEGF fueron evaluadas mediante un inmunoensayo comercial tipo ELISA de la compañía R & D de acuerdo a las especificaciones del comerciante.

5.13 Obtención de las células progenitoras de cordón umbilical para cultivos quiméricos

Las células progenitoras fueron obtenidas mediante un kit comercial (Stem SepTM Stem Cell TechnologiesTM), que se basa en la selección negativa de la población. Brevemente, una vez obtenidas las CMN éstas se llevaron a una concentración de 80 x 10⁶ células por mililitro. Las células fueron marcadas con el coctél de anticuerpos tetraméricos agregando 100 μ l del coctél de anticuerpos que reconocen los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD38, CD56, CD66b y glicoforina A. Se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 60 μ l de la suspensión coloidal por

mililitro de células y se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se pasaron por la columna inmunomagnética y se lavaron con 10 ml de PBS al 10 % FBS. La muestra se centrifugó a 1200 rpm durante 8 minutos, se obtuvo la pastilla y se resuspendió en 500 µl de medio IMDM con 2% de FBS Stem Cell TechnologiesTM).

5.14 Estudios de co-cultivos o cultivos quiméricos

Para evaluar la capacidad que tienen las capas de células mesenquimales de pacientes con Síndrome Mielodisplásico para sostener la hematopoyesis normal, se realizaron los cultivos quiméricos. Se cultivaron 5,000 células mesenquimales por pozo en placa de 24 pozos. Una vez alcanzada la confluencia, se les agregó una solución 2 µg/ml de mitomicina C (Bristol) para inhibir la proliferación celular. La solución permaneció por 24 horas, después de ese periodo se lavó tres veces con PBS y se agregaron 2,500 células progenitoras de cordón umbilical por pozo obtenidas mediante selección negativa (Stem SepTM Stem Cell TechnologiesTM). A los días 14, 21, 28 y 35 se evaluaron las cinéticas de crecimiento de las células totales y de los progenitores hematopoyéticos utilizando un ensayo de meticelulosa. Como control, se realizaron co-cultivos de células mesenquimales normales con células progenitoras de cordón umbilical (esquema 5).

5.15 Evaluación de la capacidad de adhesión de células hematopoyéticas normales a capas de MSC

Se trabajó con progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical obtenidos por inmunoselección negativa mediante la utilización de un kit comercial (Stem SepTM Stem Cell TechnologiesTM). Se cultivaron células troncales mesenquimales tanto de pacientes como de sujetos sanos en placas de cultivo de 24 pozos (Falcon). Una vez alcanzada la confluencia, los cultivos fueron tratados con mitomicina C (0.2 µg/ml) (Bristol) para inhibir la proliferación celular. La solución permaneció por 24 horas, después de ese periodo se lavó tres veces con PBS y se agregaron 2500 células progenitoras de cordón umbilical por pozo. Las células fueron cultivadas en ausencia de citocinas recombinantes, en medio de cultivo a largo plazo tipo Dexter (Myelocult Stem Cell TechnologiesTM). Las células fueron cultivadas por 14 días, realizando cambio de medios semanales. El número de progenitores adheridos fue evaluado al día 14. Para obtenerlos, las

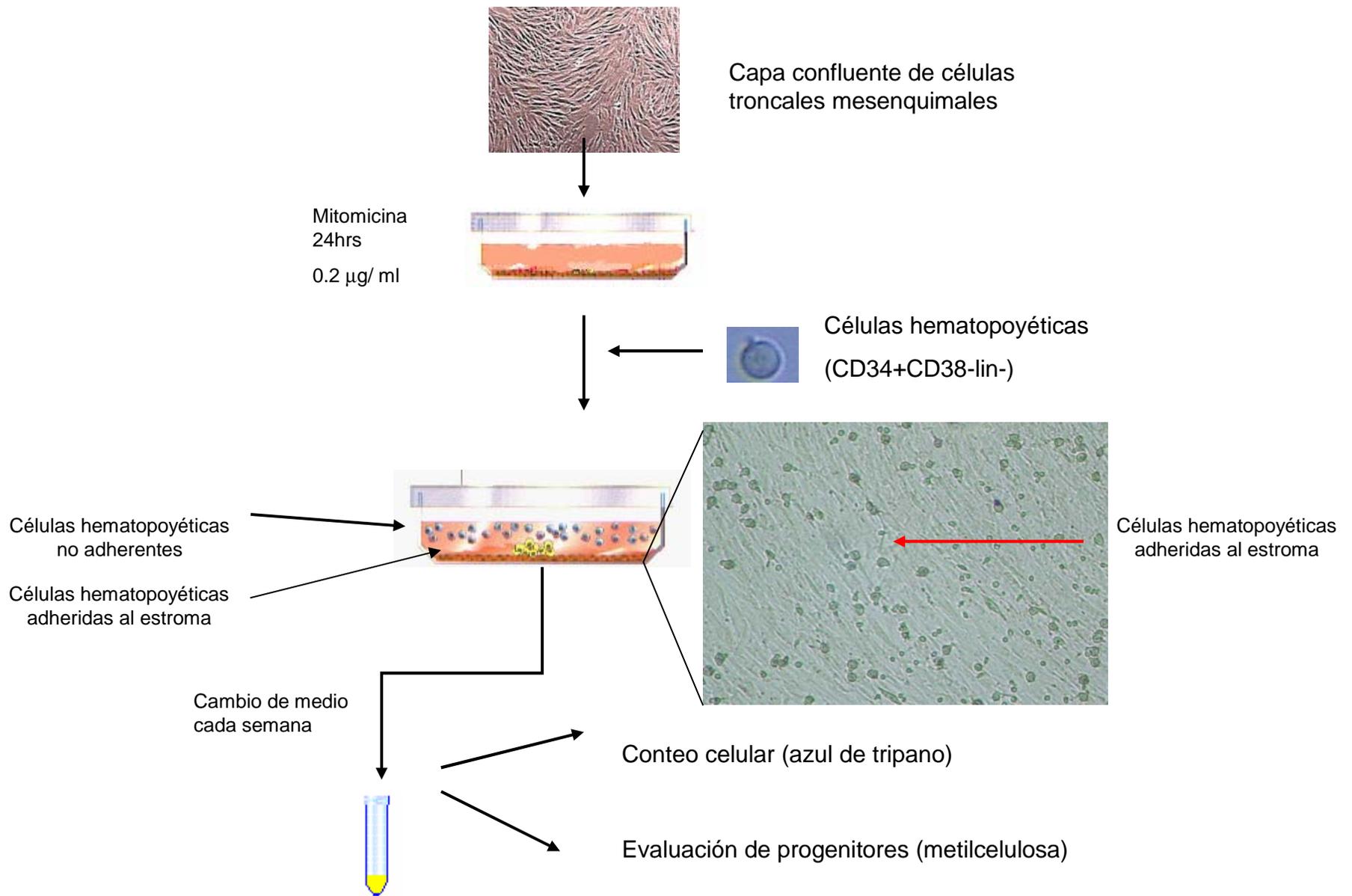
células no adherentes fueron retiradas mediante tres lavados con PBS (Gibco), se agregó una solución de tripsina 0.05% - EDTA 0.53 mM (gibco) durante 9 minutos, se agregó 10% de FBS (Gibco) en los pozos para inactivar la acción de la tripsina. Las células obtenidas fueron centrifugadas a 1200rpm durante 8 minutos. La pastilla se resuspendió en medio de cultivo a largo plazo tipo Dexter; se cuantificó el número celular con un hemocitómetro, tiñiendo las células con azul de tripano (Sigma) y evaluando únicamente las células viables, que se cuantifican como células refringentes, que no contienen el colorante. La cuantificación de los progenitores fue realizada mediante un ensayo de cultivos semisólido de metilcelulosa como se describe a continuación.

5.16 Cuantificación de progenitores hematopoyéticos (CFU-C)

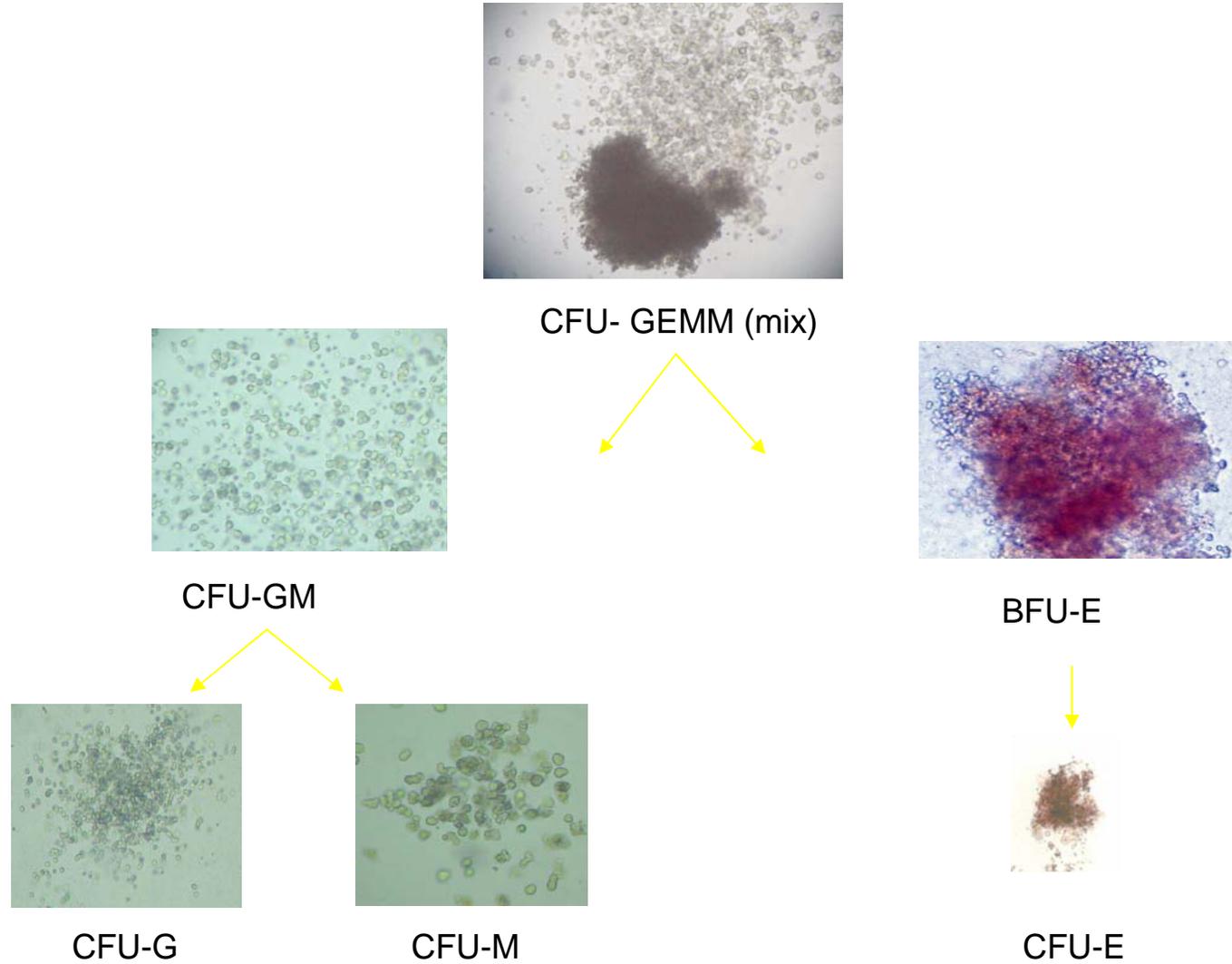
Dependiendo del día del cultivo, se adicionaron entre 5 y 50×10^3 células nucleadas a un tubo que contiene 1.3 mL de metilcelulosa (Stem Cell Technologies Inc), suero fetal de bovino, 2-mercaptoetanol, penicilina, estreptomycin y citocinas recombinantes: GM-CSF,, 10ng/mL; Eritropoyetina, 3u/mL (Epo); SCF, 50 ng/mL e IL-3, 10ng/mL. El cultivo se colocó en cajas petri de 100x20 mm y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂ y a una humedad relativa de 80 %. Después de 14-21 días se cuantificaron las colonias hematopoyéticas en el microscopio invertido. De acuerdo al tipo de células y tamaño de la colonia fueron cuantificados los progenitores mieloides (CFU-GM), eritroides (BFU-E) y mixtos (CFU-GEMM) (Esquema 6).

5.17 Estadística

Se utilizó la prueba t de student, la ANOVA de dos factores y el análisis de correlación utilizando el sistema estadístico del programa EXCEL versión 2000 y SPSS.



Esquema 5. Método para realizar un co-cultivo con células hematopoyéticas y células troncales mesenquimales.



Esquema 6. Micro-fotografías (100x) de los progenitores hematopoyéticos identificables en cultivos semisólidos de metilcelulosa. CFU-GEMM, progenitor multipotencial; CFU-GM, progenitor granulomonocítico; CFU-G, progenitor granulocítico; CFU-M, progenitor monocítico; BFU-E, progenitor de brote eritroide; CFU-E, progenitor eritroide.

VI Resultados y Discusión

6.1. Muestras biológicas

Se estudiaron 12 muestras de pacientes con SMD, las cuales correspondieron en su totalidad al subtipo de Anemia Refractaria (AR). Dentro de las citopenias en sangre periférica características de esta patología, la anemia es la alteración más constante y de acuerdo con la literatura se presenta en el 85% de los pacientes (Mayer y Canellos, 1996). El 58% de los pacientes incluidos en este estudio presentaron anemia, el 75% leucopenia y el 66% trombocitopenia, que en algunos pacientes fue muy severa (hasta menos de 10×10^3 plaquetas/ μ l de sangre). Dentro de las citopenias presentadas, encontramos que en el 42% de los pacientes se presentaron en las tres líneas, en el 17% bicitopenias, presentándose tanto anemia acompañada con leucopenia o leucopenia con trombocitopenia, y el 41% presentó anemia, leucopenia o trombocitopenia como alteración única. De acuerdo a nuestro trabajo anterior (Flores-Figueroa et al, 1999), encontramos diferencias en la distribución de las citopenias, en las cuales la anemia era la más frecuente, lo cual pueda deberse a que en el presente estudio se trabajó únicamente con pacientes con AR.

En cuanto al porcentaje de blastos, únicamente el 8 % de los pacientes presentaron blastos en sangre periférica, mientras que el 67% presentó blastos en médula ósea, pero en todos los casos el porcentaje fue menor a 3. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, ya que los subtipos de AR con exceso de blastos son los que presentan un mayor porcentaje de blastos tanto en sangre periférica como en médula ósea (Bennett, 2002).

La media de distribución de edades fue de 52 años, con un rango de 17 a 80 años. En el grupo de pacientes no encontramos predominio de acuerdo al sexo, siendo el 55% de los pacientes de sexo femenino.

Como controles se trabajó con cinco muestras de médula ósea normal obtenida de individuos adultos sanos, los cuales fueron donadores para transplante de médula ósea normal; para ser incluidos en el estudio debían de contar con parámetros hematológicos normales. Se trabajó con ocho muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas de partos a término.

Los parámetros hematológicos de los pacientes se muestran en la tabla 1.

Paciente	Sexo	Hb g/dl	LEUCOCITOS/ ul	PLAQUETAS/ ul	% BLA- SP	% BLA- MO
1	F	10.7	1600	35,000	0	2
2	F	9.7	5900	522,000	2	3
3	M	11.4	2600	145,000	0	0
4	F	14.8	3300	299,000	0	1
5	M	14.2	5000	53,000	0	0
6	F	15	3300	296,000	0	2
7	F	9.5	2400	69,000	0	1
8	M	9.4	3900	20,000	0	1.5
9	F	12.6	4000	63,000	0	2
10	M	6.4	4700	441,000	0	0
11	M	13.8	4300	91 000	0	2.5
12	M	7.4	2100	36000	0	0

Parámetros normales 12.3-17.5 4,400-11,300 172,000-450,000 0 0

Tabla 1. Parámetros hematológicos de los pacientes incluidos en el estudio (n=12). F, sexo femenino; M, masculino; Hb, hemoglobina; %BLA-SP, porcentaje de blastos en sangre periférica; %BLA-MO porcentaje de blastos en médula ósea.

6.2 Obtención de una población pura de células troncales mesenquimales (MSC)

Para obtener la población de MSC se compararon dos metodologías, la primera, a la cual denominamos como método estándar (Ficoll), se basa únicamente en las propiedades de adhesión de las MSC y la segunda, la cual denominamos como método de rosetas, se basa en una inmunoselección negativa.

El método estándar consistió en realizar una separación por un gradiente de densidad (Ficoll) de médula ósea total. Para realizar el procesamiento por el método de rosetas, se utilizó un mililitro de médula ósea tanto de pacientes como de donadores sanos.

Para comparar ambos métodos, se cuantificó el número de progenitores mesenquimales obtenidos en cada técnica, mediante el ensayo de CFU-F o unidades formadoras de fibroblastos. Encontramos que la frecuencia promedio de CFU-F en MON fue de 1:25,000 CMN cuando se sometía la muestra únicamente el método estándar y de 1:2,500 células cuando se utilizaba el proceso de rosetas, lo que indica un enriquecimiento promedio de 10 veces (rango de 1 a 39 veces). Para el caso de médula de pacientes con SMD el enriquecimiento promedio fue menor, siendo de 3 veces (rango de 1.2 a 21 veces). La frecuencia promedio de CFU-F en pacientes con SMD fue de 1:17,000 CMN cuando se utilizó el método estándar y de 1:6,250 células cuando se utilizó el método de rosetas. (Figura 1). Como se había reportado anteriormente (Flores-Figueroa et al, 2002), no encontramos diferencias significativas en el número de CFU-F entre MON y SMD. El método por rosetas demostró enriquecer la población hasta 39 veces, sin embargo el enriquecimiento mostró una gran variabilidad entre los pacientes y entre el tipo de muestra. La recuperación de CFU-F utilizando el método de rosetas fue del 65%, comparado con el método estándar. Estos resultados coinciden con lo especificado por el proveedor ($64\pm 24\%$), lo cual indica que el sistema enriquece la población pero se pierde un 35% de ella.

Una vez obtenidos los cultivos confluentes de células mesenquimales de pacientes con SMD y de médula ósea normal, tanto por el método estándar como por el método de rosetas, se evaluó la morfología de los cultivos mediante observación directa en el microscopio invertido. En la figura 2 A se muestra un ejemplo representativo de las capas de MSC de MON obtenidas por el método estándar. En las capas obtenidas mediante éste método se observó la presencia de células hematopoyéticas, las cuales se observan como

células refringentes, redondas, de menor tamaño que las MSC. Por su morfología, y debido a que se encontraban en la fracción adherente, se propuso que fueran macrófagos, lo cual se corroboró posteriormente mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo. No encontramos diferencia entre los cultivos de pacientes y de médula ósea normal.

Los macrófagos son el segundo componente más abundante en las células adherentes de médula ósea, por lo que se utilizó como una medida de pureza en los cultivos. El contenido de macrófagos se evaluó mediante la técnica de inmunocitoquímica, utilizando el anticuerpo CD68 y por citometría de flujo el anticuerpo CD14. Como se observa en la figura 2C, se corroboró la presencia de macrófagos en los cultivos realizados con células procesadas con el método de Ficoll tanto por la técnica de inmunocitoquímica como por la técnica de citometría, siendo de entre el 10 y 5%. A diferencia del método de Ficoll, los cultivos obtenidos por el método de rosetas mostraron una mayor homogeneidad (2A), así como se encontró que menos del 2% de las células en el cultivo, eran positivas para CD14 y CD68. Estos resultados fueron obtenidos tanto para médula ósea normal como para capas de células troncales mesenquimales de pacientes con SMD.

De acuerdo con los resultados anteriores, decidimos utilizar el método de rosetas, ya que permitía un enriquecimiento de los progenitores de células mesenquimales, así como la eliminación de contaminación por macrófagos en los cultivos. El método de rosetas permitió trabajar con capas de MSC con más de un 95% de pureza. Todos los estudios subsecuentes, fueron realizados con MSC obtenidas por el método de rosetas y cultivadas en la segunda resiembra.

De acuerdo a la metodología utilizada para obtener a las MSC podemos asegurar que se trabajó con una población pura de MSC, por lo que en este trabajo no existió contaminación por macrófagos.

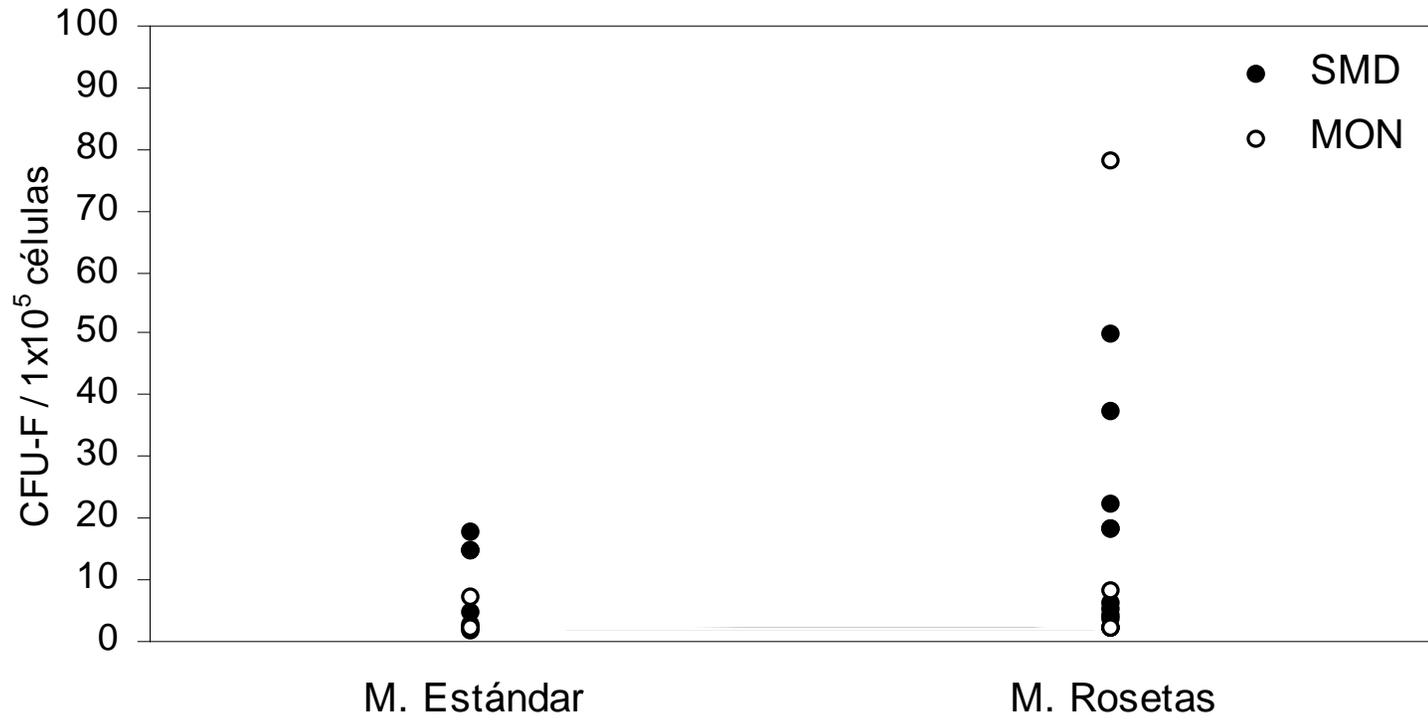
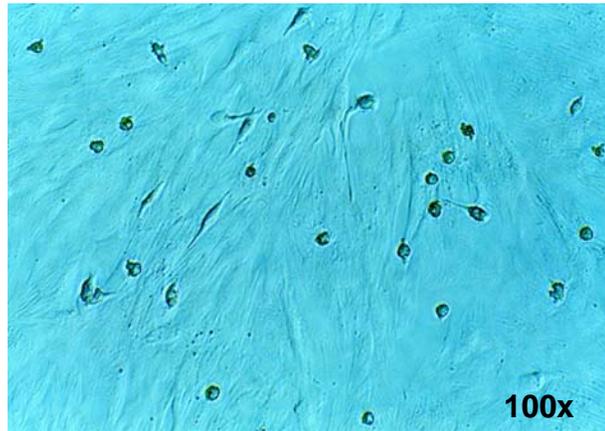
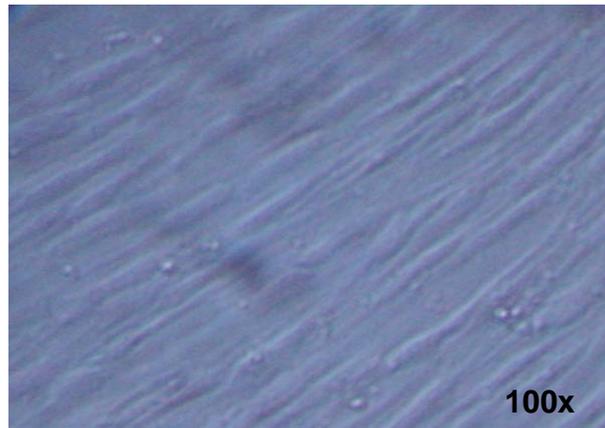


Figura 1. Comparación del contenido de progenitores de células mesenquimales recuperadas por el método estándar (M. Estándar) y por el método de rosetas (M. Rosetas). SMD, pacientes con síndrome mielodisplásico y MON, médula ósea normal.



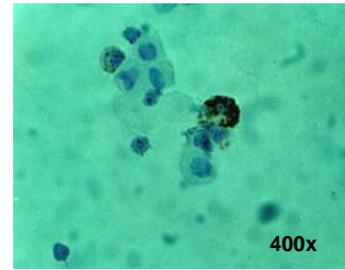
A. Capas de MSC obtenidas por el método Estándar



B. Capas de MSC obtenidas por el método de Rosetas

C

METODO ESTANDAR



Anti-CD68

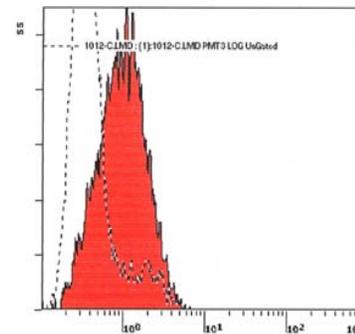
METODO ROSETAS



Anti-CD68

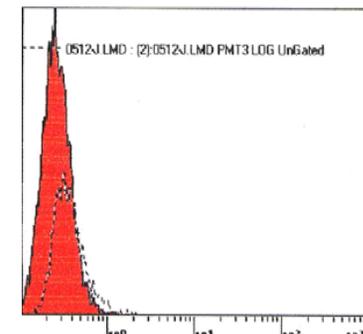
D

METODO ESTANDAR



CD14PE

METODO ROSETAS



CD14PE

Figura 2. Comparación de los métodos de obtención de MSC. Micro-fotografía de un cultivo de MSC de médula ósea normal obtenida mediante el método “Estándar” (A) y por el método de “Rosetas” (B). C, detección mediante inmunocitoquímica del antígeno CD68 en capas de MSC obtenidas por ambos métodos. D, detección por citometría de flujo del antígeno CD14-PE en capas de MSC normales obtenidas con el método estándar y por rosetas. X número de aumentos de la microfotografía.

6.3 Análisis Morfológico y Evaluación de Marcadores de las MSC de pacientes con SMD y MON

El análisis morfológico de las MSC fue realizado en cámaras con base desmontable en el 1er y 2do pasaje. En la figura 3A, se observa en campo claro, un cultivo de MSC de un paciente representativo en primera resiembra a los siete días de cultivo. Al comienzo del cultivo las células en su mayoría presentaron una morfología alargada, con forma de huso, muy espigadas. En la figura 3B se observan células en segundo pasaje al comienzo del cultivo; se observan células teñidas con el colorante Wright Giemsa, en donde se distinguen por lo menos dos tipos de morfología celular, las células largas y espigadas que se observan desde el primer pasaje, y células más grandes, triangulares, las cuales a mayor confluencia (3C) se observan formando una gran cantidad de contactos celulares con células mas alargadas. La frecuencia de las células más grandes, triangulares fue de aproximadamente 5-10%. En las fotografías 3B se aprecia que las MSC presentan un núcleo alargado, central, el cual contiene de dos a tres nucleolos. En la figura 3D se observa un cultivo en segundo pasaje en confluencia del 90%, se observan las células homogéneas que crecen unidireccionalmente. En este estudio no encontramos diferencias en la morfología de las MSC de pacientes y donadores normales, sin embargo el estudio en este aspecto no fue lo suficientemente extenso.

Aunque algunos autores han reportado que las capas de MSC contienen células homogéneas en su morfología (Pittenger et al, 1999), existe una mayor evidencia de que las capas de MSC no son homogéneas y contienen células morfológicamente y al parecer funcionalmente distintas. Desde los primeros estudios del grupo de Owen y colaboradores (1980), se observó que las colonias de progenitores de células mesenquimales (CFU-F) contenían varios tipos de células. Estos autores describieron colonias que contenían células tipo fibroblastos, fusiformes, las cuales formaban colonias compactas y colonias abiertas; otro tipo de células a las cuales denominaron de tipo epitelial eran células más pequeñas, con núcleos más intensamente teñidos y morfológicamente semejantes a células epiteliales. Un año más tarde, el trabajo publicado por Mets y Verdonk (1981) enfatizó la presencia de dos tipos celulares, uno denominado como tipo I, en el que las células eran pequeñas, fusiformes y la tipo II, las cuales eran células más grandes, aplanadas, las cuales proliferaban más lentamente. Recientemente, los estudios realizados por el grupo de

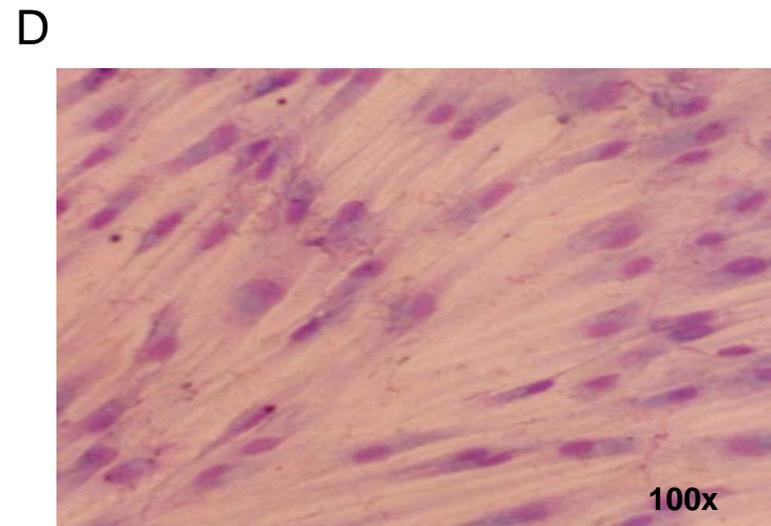
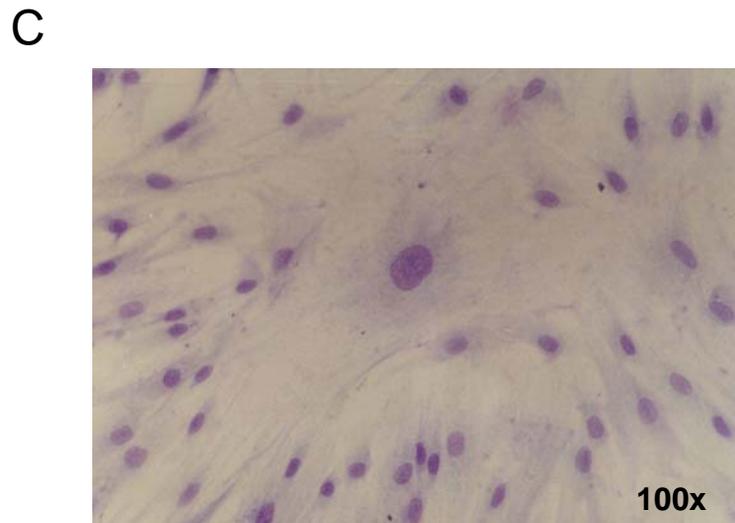
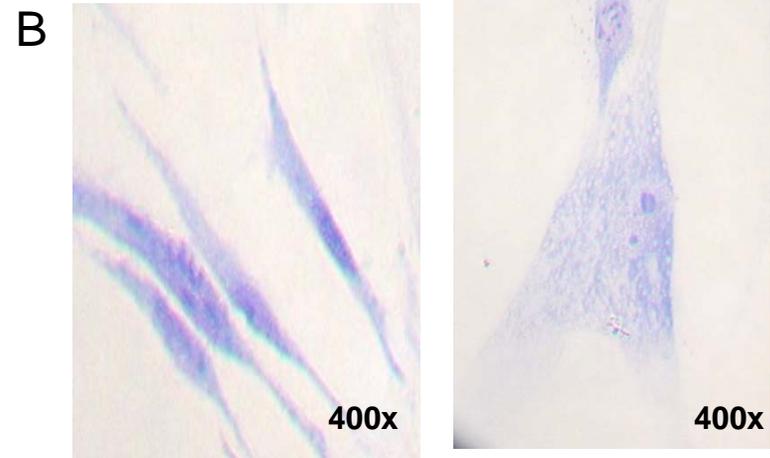
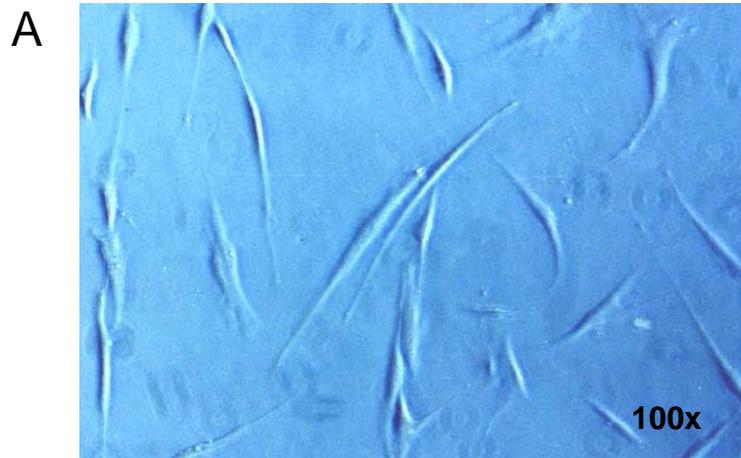


Figura 3. Morfología de las MSC. A, MSC de médula ósea normal en campo claro en día 7 de cultivo. B, MSC en segundo pasaje teñidas con Wright-Giemsa. C y D, cultivos confluentes de MSC de médula ósea de pacientes con SMD en segundo pasaje teñidas con Wright-Giemsa en donde se evidencia la presencia de células grandes y células fusiformes. X número de aumentos de la microfotografía.

Prockop (Colter et al, 2000; 2001; Sekiya et al, 2002) han descrito tres tipos de células en los cultivos de MSC. Realizando estudios por citometría de flujo, este grupo identificó tres subpoblaciones, una de células pequeñas, fusiformes, agranulares a la cual denominó RS-1, otra de células pequeñas granulares denominada como RS-2 y la última conformada por células más grandes y granulares a las cuales denominó como células mesenquimales maduras o mMSC (por sus siglas en inglés “mature mesenchymal stem cells”). Estos autores postularon que las células RS-1 corresponden a MSC progenitoras, con un índice de proliferación elevado, que dan origen a las células RS-2 y éstas últimas a las mMSC. Sin embargo es necesario realizar estudios funcionales que permitan demostrar su hipótesis.

En el presente estudio también se encontraron células de diferentes tamaños, encontramos que la mayor parte de las células en cultivo eran células fibroblastoides, fusiformes, que podrían corresponder a las poblaciones de células pequeñas RS-1 o RS-2 antes descritas. La otra población celular encontrada puede corresponder a las células tipo II o mMSC, pero a diferencia de los estudios anteriores, ésta población fue la menos abundante en los cultivos en segundo pasaje. Esto puede deberse a que el tipo de medio utilizado para expandir a las MSC permitía su proliferación pero no su diferenciación. Será necesario realizar estudios más profundos que analicen tanto la morfología como la funcionalidad de los distintos tipos celulares presentes en las capas de MSC tanto de donadores sanos como de pacientes con SMD.

Para conocer el inmunofenotipo de las MSC se utilizaron tres técnicas. Por medio de la técnica de inmunocitoquímica fueron analizados los antígenos CD68, el cual reconoce una glicoproteína transmembranal expresada en monocitos/macrófagos, células dendríticas y granulocitos; y el CD34, el cual es el ligando de CD62L (L-selectina), expresado en células del endotelio vascular, progenitores y células troncales hematopoyéticas. Como control positivo se utilizaron laminillas con macrófagos y células progenitoras hematopoyéticas obtenidos de médula ósea. Los macrófagos mostraron una tinción citoplásmica muy fuerte para CD68. Las células progenitoras hematopoyéticas mostraron una tinción membranal moderada para el antígeno CD34. Las MSC tanto de donadores como de pacientes con SMD fueron negativos para ambos antígenos (tabla 2), lo cual indica que las capas de MSC no contenían macrófagos, células endoteliales ni progenitores hematopoyéticos.

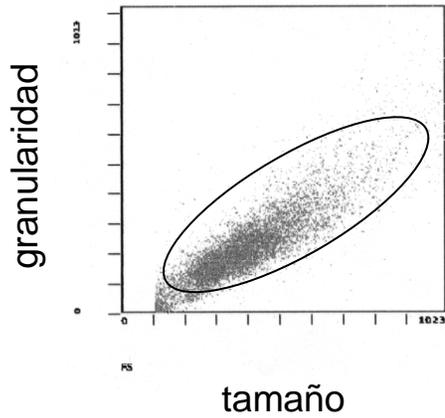
marcador	MON (n=5)	SMD (n=9)
CD14 *	-	-
CD29 *	+	+
CD34 †	-	-
CD68 †	-	-
CD90 *	+	+
CD105 *	+	+
Fosfatasa Alcalina ¶	-	-

Tabla 2. Marcadores de las MSC de médula ósea normal (MON) y de pacientes con síndrome mielodisplásico (MDS) en segunda resiembra. Los marcadores fueron analizados mediante citometría de flujo (*), inmunohistoquímica (†) y por citoquímica (¶). Ausencia del marcador (-), presencia del marcador (+)

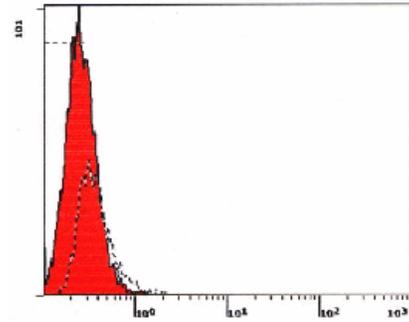
Mediante la técnica de citoquímica, analizamos la expresión de la fosfatasa alcalina (tabla 2). Como control fueron utilizadas células adherentes provenientes de cultivos a largo plazo. Únicamente entre el 5 y 10% de las MSC normales y de pacientes con SMD fueron positivas a la tinción para detectar fosfatasa alcalina (tabla 2), mientras que las células control, mostraron una marcada tinción color rojiza en el citoplasma celular. La fosfatasa alcalina es una enzima presente en MSC comprometidas al linaje de osteoblastos (Shih-Chieh et al, 2002), por lo que los resultados indican que las capas de MSC obtenidas para este estudio corresponden a células indiferenciadas.

Finalmente, analizamos mediante citometría de flujo, la expresión de cuatro antígenos, el CD14, CD29, CD90 y CD105. El anticuerpo para CD14, reconoce al receptor de lipopolisacáridos (LPS) y la proteína de unión a LPS presente en células de linaje mielomonocítico y en menor proporción a células B humanas; el antígeno CD29, corresponde a la subunidad $\beta 1$ de la familia de las integrinas expresado por todos los leucocitos y en células troncales mesenquimales; el antígeno CD90, es una molécula unida al glicosil fosfatidil inositol (GPI), presente en células troncales tanto hematopoyéticas como mesenquimales y finalmente el antígeno CD105, que corresponde a la endoglina, es un receptor de matriz extracelular presente en células endoteliales y en células troncales mesenquimales. Los resultados se muestran en la figura 4. En el panel A se muestra el tamaño y la granularidad de las células. Este panel permite establecer la región de las células que vamos a analizar, eliminando los restos celulares y las células muertas. En el panel B se muestra un histograma representativo de cada anticuerpo. Menos del 5% de las MSC tanto de controles normales como de pacientes fueron positivas para CD14, lo cual corrobora los datos obtenidos mediante Inmunocitoquímica, en donde se estableció la ausencia de macrófagos en las capas de MSC. Los antígenos CD90 y CD29 mostraron una fuerte expresión en las MSC tanto de pacientes como los controles normales. También se observó la expresión de CD105 en las capas de MSC de pacientes y controles normales (tabla 2). Estos datos correlacionan con lo publicado anteriormente (Pitteneger et al, 1999; Deans y Moseley, 2000; Shih-Chieh et al, 2002), en donde se reporta que las MSC de médula ósea presentan los antígenos CD29, CD105 y CD90, siendo negativos para CD14, CD34 y CD45. En algunos pacientes encontramos una ligera disminución en la expresión de CD90, sin embargo de acuerdo a los datos obtenidos, no encontramos diferencia en la

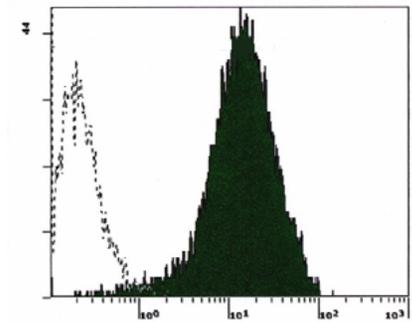
A



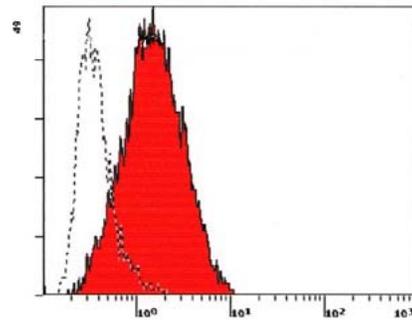
B



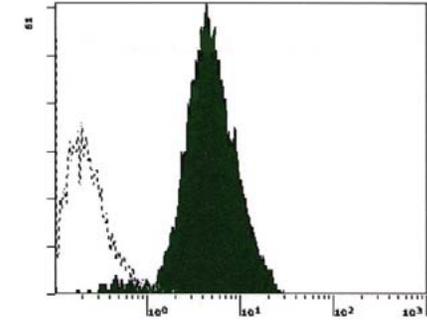
CD14- PE



CD90- FITC



CD105- PE



CD29- FITC

Figura 4. Inmunofenotipo de las MSC. A, gráfica de granularidad y tamaño de las MSC para definir el área de análisis; B, esquemas representativos del análisis por citometría de flujo de cuatro antígenos, CD14, CD90, CD105 y CD29 en MSC de segunda resiembra de médula ósea normal.

expresión de estos antígenos entre las capas de MSC de pacientes y normales. Será necesario realizar un estudio más extenso incluyendo un panel mas abundante de antígenos que incluyan moléculas de adhesión y receptores para citocinas, entre otros.

Como se observa en la tabla 2, las MSC tanto de pacientes con SMD como de donadores sanos, mostraron una expresión de antígenos compatibles a los expresados por las MSC antes descritas (Pittinger et al, 1999) siendo positivas para CD29, CD105 y CD90; así como no encontramos la expresión de células troncales hematopoyéticas (CD34), de macrófagos (CD14, CD68) o de MSC diferenciadas (fosfatasa alcalina). Por lo anterior, podemos concluir que trabajamos con una población de MSC.

6.4 Evaluación del cariotipo y ploidía en las MSC de MOn y pacientes con SMD

El análisis de cariotipo fue realizado con la colaboración de la M. en C. Rosa María Arana en el laboratorio de genética del Hospital General de México, tanto en las células hematopoyéticas (11 pacientes con SMD) como en las MSC en segunda resiembra de 5 donadores normales y de 9 pacientes con SMD. Se encontraron alteraciones cromosómicas en las células hematopoyéticas en 7 casos de pacientes con SMD (58%), siendo más frecuentes las alteraciones complejas, las cuales se presentaron en el 57% de los pacientes. La presencia de cariotipos complejos en los SMD generalmente involucra la ganancia o pérdida de más de 3 cromosomas y se observa en alrededor del 20% de los pacientes (Olney y Le Beau, 2002). En este sentido, uno de los pacientes presentó trisomía 8, la cual se encuentra reportada en aproximadamente el 10% de los pacientes con SMD (Olney y Le Beau, 2002), y otro presentó la translocación (2:22) (tabla 3).

Se realizó el análisis de cariotipo en las MSC de segunda resiembra tanto de pacientes como de donadores sanos. En los casos analizados de donadores sanos, no se encontraron alteraciones en el cariotipo. En la figura 5A se muestra un caso representativo del análisis del cariotipo por bandeado de un donador sano. El 25% de las MSC de pacientes no fueron analizadas debido a que no pudieron obtenerse las metafases (tabla 3). De los casos de pacientes analizados, el 55% de las MSC presentaron alteraciones en el cariotipo. Todas las alteraciones correspondieron a cariotipos complejos; 4 de 5 pacientes presentaron hipodiploidía y únicamente un paciente presentó cariotipo hiperdiploide (tabla 3). En la figura 5B se presenta un caso representativo de un cariotipo en bandas G de MSC de un paciente con SMD.

Al comparar en cada paciente el cariotipo de las células hematopoyéticas y de las MSC encontramos que, en todos los casos en que se presentaron anormalidades en el cariotipo de las MSC también las células hematopoyéticas se encontraban alteradas. Encontramos un caso en donde las MSC tenían un cariotipo normal a pesar de que su contraparte hematopoyética presentaba una translocación. En ninguno de los casos analizados, con excepción de una clona del paciente 4, se encontraron las mismas alteraciones cromosómicas en las MSC y en las células hematopoyéticas (tabla 3).

Pac.1	Cariotipo células hematopoyéticas	Cariotipo células troncales mesenquimales
1	46,XX[20]	Sin metafase
2	46,XX[15]/ 46,XX,del(5q)(q31-34)[8]	45,XO[3]/40,XX,-10,-12,-14,-15, -16,-19[3]
3	46,XY[22]	46,XY[8]
4	46,XX[10]/ 43,XX,-5,-8,-20[5]/40,XX,-3,-5,-12,-14,-16,-22,[3]	40,XO,-3,-12,-14,-16,-17[5]/40,XO,-3,-12,-14,-16,-17,-22[1]/46,XX[10]
5	46,XY[25]/ 48,XY,+8,+22[5]	46,XY[12]
6	46,XX[30]/ 48-52,XX,del(7)(q33)[5]/46,XX,del(7),+3,+12,+16,+20,+21[8]	Hiperdiploide (58-68 cromosomas) [5]/46,XX[15]
7	46,XX[30]	46,XX[19]
8	46,XY[10] /Hipodiploide [8]	Sin metafase
9	46,XX[12]/ 46,XX,t(2;22)[6]	44,XX,-1,-20[4]/42,XX,-2,-10,-13,-20[5]/40,XX,-1,-2,-10,-13,-19,-20[2]
10	46,XY[17]	Sin metafase
11	46,XY[17]	46,XY[7]
12	46,XX[18]/ 48-4,XXX,+1,+4,+5,+7,+10,+12,+18[10]	46,XX[5]/40,XX,-5,-8,-11,-13,-17,-22[4]/38,XX,-3,-5,-12,-17,-19,20,-21,22[1]/35,XX,-3,-5,-8,-10,-12,-15,-17,-19,-20,-21,-22[1]

Tabla 3. Cariotipo de las células hematopoyéticas y de las células troncales mesenquimales de pacientes con síndrome mielodisplásico. [] número de metafases analizadas.

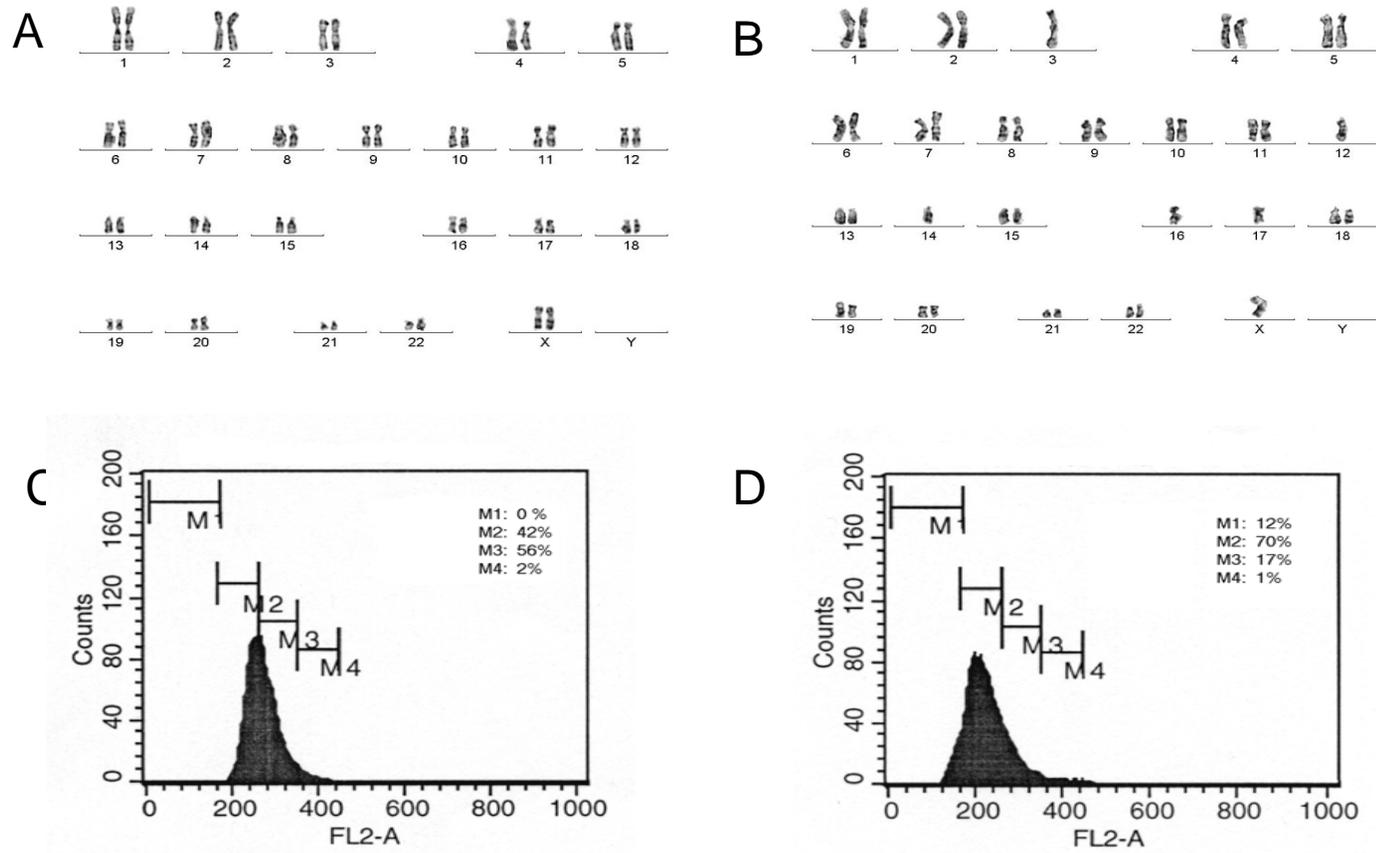


Figura 5. Análisis de cariotipo y contenido de ADN en las células troncales mesenquimales. Cariotipo representativo de MSC de médula ósea normal (A) y de MSC del paciente 4 (B). Análisis por citometría de flujo del contenido de ADN de MSC de médula ósea normal (C) y del paciente 4 (D). M1, región de hipodiploidía; M2, región de células en fase Go/G1 del ciclo celular; M3, en fase de síntesis de ADN; M4, región de hiperdiploidía.

El paciente 4 presentó hipodiploidía tanto en la parte hematopoyética como en las MSC. Una de las clonas del paciente 4, compartía algunos de los cromosomas perdidos entre la parte hematopoyética (40,XX,-3,-5,-12,-14,-16,-22) y la parte mesenquimal (40,XO, 3,-12,-14,-16,-17,-22). Sin embargo, no puede concluirse que pertenezcan a la misma clona ya que la parte hematopoyética también sufrió la pérdida del cromosoma 5 y la parte mesenquimal del cromosoma X y del 17 (tabla 3), probablemente ambas clonas sean subclonas de una célula mas primitiva.

Para corroborar los datos obtenidos por la técnica de bandedo, y debido a que las alteraciones involucraban un cambio en la ploidía de las células, se decidió evaluar el contenido de ADN mediante la técnica de citometría de flujo. Como se esperaba, las muestras de médula ósea normal mostraron un contenido de ADN normal, no encontrándose células con contenido hipodiploide ni hiperdiploide (figura 5C). En todos los casos analizados de pacientes con SMD con cariotipo anormal, se pudo corroborar alteraciones en el contenido de ADN por la técnica de citometría de flujo. En la figura 5D, se observa que las células del paciente con SMD número cuatro, presentó el 12% de las células en la región M1-hipodiploide, así como un cariotipo hipodiploide (figura 5B).

La presencia de alteraciones citogenéticas en las células estromales de pacientes con SMD es un tema controversial. Algunos reportes indican que no existen alteraciones cromosómicas en las células estromales, como en el trabajo de Awaya y colaboradores (2001) y más recientemente el trabajo de Soenen-Cornuu y colaboradores (2005). En ambos trabajos se analizó la presencia de alteraciones en el cariotipo de las células estromales y de las células troncales mesenquimales mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés) y no se encontraron ninguna de las anormalidades citogenéticas que se buscaron. Es importante mencionar que en estos trabajos se analizaron únicamente alteraciones muy específicas (trisomía 8, deleción 7 y 15q), por lo que no descartaron la presencia de otro tipo de alteración diferente al de la clona hematopoyética.

Por otra parte, existen trabajos en donde utilizando la misma metodología que en los trabajos anteriores (FISH), sí se encontraron alteraciones en el cariotipo en un grupo de pacientes. En el trabajo de Devetten y colaboradores (2002) se describió a un paciente con trisomía 8, el cual presentaba la alteración en el 0.75-1.5% de las células estromales, en

donde se descartó que las células estromales fueran de origen hematopoyético (macrófagos). En el trabajo realizado por Alvi y colaboradores (2000) encontraron que una pequeña proporción de fibroblastos estromales eran positivos para algunos de los marcadores de alteraciones citogenéticas.

A excepción del trabajo publicado por Soenen-Cornuu y colaboradores (2005), todos los estudios en relación a las alteraciones presentes en las MSC o en la parte mesenquimal del estroma (fibroblastos estromales) han sido publicados en resumen de congresos, por lo que es difícil conocer en detalle los trabajos. Algunos de ellos concluyen que el estroma no presenta alteraciones citogenéticas y que no es parte de la clona anormal de los pacientes con SMD, sin embargo el análisis del cariotipo fue únicamente parcial mediante sondas específicas a ciertos marcadores (trisomía 8) y no fue posible conocer el cariotipo total de las MSC. El presente trabajo es el primero en analizar mediante dos técnicas (cariotipo y contenido de ADN) las alteraciones en el cariotipo/ploidía de las MSC en pacientes con SMD. Las alteraciones que describimos en las MSC no son las mismas que las presentes en la contraparte hematopoyética, lo cual explicaría porqué no fueron encontradas las mismas alteraciones citogenéticas por medio de FISH en los trabajos anteriores.

Este trabajo permite establecer claramente que el compartimiento de células troncales mesenquimales de pacientes con SMD presenta alteraciones cromosómicas, pero no permite dilucidar la causa de las mismas. Se han reportado también en otras enfermedades la presencia de células derivadas de las MSC con alteraciones cromosómicas. En leucemia mieloide aguda se reportó que una pequeña proporción de fibroblastos estromales presentaban las mismas alteraciones que las células hematopoyéticas (Zhang et al, 1999). En enfermedades no hematológicas también han sido detectadas células estromales mesenquimales con alteraciones cromosómicas, e incluso se postula que jueguen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Valent et al, 2001). Por otra parte, no ha sido posible detectar células estromales derivadas de MSC involucradas en la leucemia mieloide crónica, ya que no se ha encontrado la presencia del cromosoma Filadelfia en este tipo celular (Bianchi et al, 1983, Castro-Malaspina et al, 1982).

Existen varias alternativas para explicar las alteraciones presentes en las MSC de los pacientes con SMD. La primera es que ambos tipos celulares tengan un progenitor común,

el cual sea el inicio de la clona displásica. Anteriormente se pensaba que la alteración inicial displásica surgía en un progenitor comprometido al linaje mieloide (Heaney y Golde, 1999) ya que las alteraciones clínicas en los SMD generalmente involucran únicamente el linaje mieloide. Sin embargo, un estudio realizado por Nilsson y colaboradores (2002) demostró que la alteración se encuentra a nivel de un progenitor más inmaduro, un progenitor linfo-mieloide. Este progenitor más inmaduro presentaba alguna de las alteraciones presentes en los progenitores mieloides, por lo que los autores concluyeron que los progenitores linfo-mieloides sí pertenecen a la clona anormal, aunque no presenten todas las alteraciones.

Diversos grupos se han dado a la tarea de conocer si la alteración inicial ocurre incluso, en un progenitor más primitivo, anterior al progenitor linfo-mieloide, que pueda dar origen tanto al compartimento estromal (a las MSC) como a las células hematopoyéticas (Devetten et al, 2000; Alvi et al, 2000). Utilizando marcadores cromosómicos o análisis de clonalidad (HUMARA) estos trabajos han concluido que tanto las células hematopoyéticas como MSC provienen de la misma clona displásica. Sin embargo los resultados no pueden ser considerados concluyentes ya que hasta la fecha no se ha descrito con certeza la existencia de un progenitor común entre el estroma y el sistema hematopoyético (Golde et al, 1980). Nuestros resultados no permiten apoyar esta hipótesis debido a que no encontramos las mismas alteraciones en ambos compartimientos (mesenquimal y hematopoyético), a excepción de un caso en el que compartían la pérdida de algunos cromosomas. Una posibilidad sería que sí exista una alteración común pero que ésta no pueda ser detectada por el método de citogenética y sea necesario analizar las alteraciones en ambos tipos celulares con una metodología más sensible (ej. microarreglos de ADN).

La segunda explicación es que el agente causante de las alteraciones en el compartimento hematopoyético también haya afectado al mesenquimal, pero que las clonas sean independientes. A pesar de desconocerse la etiología de los SMD y la evolución entre una lesión genómica inicial y el desarrollo de la enfermedad, existe una clara asociación entre agentes citotóxicos y el desarrollo de la misma. La acumulación de anormalidades en el cariotipo promueve la transformación maligna y la progresión leucémica (West et al, 2000). Dentro de los agentes citotóxicos asociados se encuentran el

benceno, pesticidas, solventes, radiación, polvos inorgánicos (asbestos, silica) y agentes alquilantes utilizados en la quimioterapia, entre otros (West et al, 2000; Aul et al, 1998). El mecanismo de acción de estos agentes es muy diverso, induciendo la generación de radicales libres, afectando los mecanismos de reparación del ADN, o induciendo directamente daño genético (West et al 2000). Frachiolla y colaboradores (2003) encontraron que los niveles incrementados de metabolitos de oxígeno en pacientes con SMD estaban asociados con la presencia de alteraciones cromosómicas complejas. La exposición de los individuos a estos u otros agentes pudo haber ocasionado un daño no solamente en las células troncales hematopoyéticas, sino también a las células troncales mesenquimales. Esto no significaría que provinieran de la misma clona o tuvieran un progenitor común, sino que ambas fueron afectas por el mismo agente.

Finalmente, otra alternativa para explicar el hecho de que las MSC de pacientes con SMD tengan alteraciones cromosómicas es que dichas alteraciones no tengan relación con la enfermedad y sean producto de su manipulación *in vitro*. Sin embargo, dichas alteraciones no fueron encontradas en las MSC de donadores sanos, por lo que posiblemente las MSC de los pacientes si tengan una mayor susceptibilidad a transformarse *in vitro*. El grupo de Bernand (Rubio et al, 2005) publicó recientemente un trabajo en donde describen la transformación espontánea de las MSC adultas. Estos autores reportaron que MSC obtenidas de tejido adiposo de pacientes pediátricos y adultos, eran capaces, después de un largo tiempo de cultivo, de superar la crisis de senescencia y de transformarse, adquiriendo varias alteraciones cromosómicas. Aunque los autores encontraron este efecto después de dos meses, y en el presente trabajo se utilizaron únicamente células en la segunda resiembra, es posible que las MSC de pacientes con SMD tengan una mayor susceptibilidad a adquirir alteraciones cromosómicas, lo cual ha sido demostrado en células hematopoyéticas de éstos pacientes (Kanamaru y Tamura, 1993). Este grupo japonés encontró que las células hematopoyéticas de pacientes con SMD adquieren nuevas alteraciones cromosómicas al ser cultivadas *in vitro* en cultivos a largo plazo tipo Dexter e incluso algunas de las clonas desarrolladas *in vitro* coincidían con las clonas encontradas en la evolución leucémica de estos pacientes. Es por lo anterior que es posible considerar que tanto las MSC como las células hematopoyéticas de los pacientes con SMD tengan una

susceptibilidad a transformarse *in vitro*, lo cual puede traducirse como alteraciones en genes involucrados con la reparación del ADN o con la citocinesis.

No existen evidencias suficientes en el presente trabajo que apoyen alguna de las hipótesis anteriores, por lo que será necesario desarrollar nuevos estudios que permitan dilucidar la causa de las alteraciones cromosómicas presentes en las células troncales mesenquimales de los pacientes con SMD.

6.5 Niveles de citocinas y moléculas de la matriz extracelular en las MSC de MOn y pacientes con SMD

Como parte de la caracterización funcional de las células troncales mesenquimales de pacientes con SMD, se evaluaron los niveles de producción de seis citocinas importantes en la hematopoyesis como IL-6, SCF, IL-1 β , VEGF, GM-CSF y TNF α , así como de dos moléculas de la matriz extracelular (fibronectina y colágeno).

Se realizó la cuantificación de citocinas por medio de un kit comercial, utilizando la técnica de ELISA. Se cuantificaron los niveles de citocinas en el medio condicionado de 48 horas de cultivos confluentes de MSC, en segunda resiembra, de donadores y pacientes con SMD. Las MSC fueron cultivadas a confluencia en pozos de 24, una vez obtenido el medio condicionado, se contó el número de células por cada pozo y se normalizó a un número estándar. Las concentraciones se reportaron por 1 ml de medio condicionado por 100,000 MSC. Como se muestra en la tabla 4, los niveles de TNF α se encontraron muy bajos tanto en médula ósea normal como en los pacientes con SMD. La producción de GM-CSF por parte de las MSC tanto normales como de pacientes fue también baja, apenas en los niveles detectables. Los niveles para ambas muestras fueron de menos de 1 pg/ml. Estos resultados concuerdan con los reportados por Caldwell y Emerson (1994) y Haynesworth y colaboradores (1996), quienes encontraron que los niveles de GM-CSF se encuentran por debajo de los niveles detectables cuando los cultivos no son estimulados, pero al estimular los cultivos con IL-1 α o TNF α se incrementa la producción de esta citocina. A pesar de la baja concentración de GM-CSF detectada, se encontró que las MSC de pacientes producían 5.5 veces más GM-CSF (0.08 ± 0.07 pg/ml en MOn y 0.44 ± 0.5 pg/ml en SMD). En cuanto a los niveles de TNF α , no se encuentran reportes en MSC. Sin embargo, en capas enriquecidas de fibroblastos estromales reportamos que las capas normales expresan tanto

(n=10)	MON (n=5)	MDS
TNF α pg/ml/ x10 ⁵ MSC	0.13 (0.09)	0.27 (0.19)
IL-6 x10 ng/ml/ x10 ⁵ MSC	5.7 (3.8)	2.8 (2.8)
IL-1 β pg/ml/ x10 ⁵ MSC	0.22 (0.13)	0.52 (0.2) *
SCF pg/ml/ x10 ⁵ MSC	8.6 (3.5)	11.4 (7.4)
GM-CSFpg/ml/ x10 ⁵ MSC	0.19 (0.3)	0.61 (0.62)*
VEGFx10 ng/ml x10 ⁵ MSC	8.3 (5.6)	12 (18.0)

Tabla 4. Niveles de citocinas en el medio condicionado de células mesenquimales de individuos normales (MON) y de pacientes con Síndrome Mielodisplásico (MDS). Los resultados representan la media y desviación estándar del número de muestras que se indica. * p< 0.05 t-student.

IL-6 como TNF α y que las capas enriquecidas de fibroblastos estromales de pacientes con SMD expresan una mayor cantidad de ambas citocinas (Flores-Figueroa et al 2002).

La diferencia encontrada en los niveles de TNF α en el presente estudio puede deberse a que en el trabajo anterior se utilizó una población enriquecida de fibroblastos estromales, por lo que posiblemente las MSC no secreten TNF α antes de diferenciarse a fibroblastos estromales, o a que los niveles detectados de ésta citocina estén relacionados con la presencia de otra población no mesenquimal en los cultivos enriquecidos (ej. macrófagos).

Se observó que las células mesenquimales son fuertes productoras de IL-6, SCF y VEGF y que dicha producción es constitutiva, debido a que los cultivos no habían sido previamente estimulados (tabla 4). No se encontró diferencia entre los niveles de IL-6, SCF ni VEGF entre pacientes y controles. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Majumdar y colaboradores (1998), en donde reportan que las MSC normales expresan el RNA mensajero de IL-6 y SCF, entre otros. En nuestro trabajo encontramos concentraciones más bajas de IL-6 y SCF que en el estudio de Haynesworth y colaboradores (1996). Esta diferencia podría estar relacionada con la presencia de suero fetal bovino en el medio condicionado de las MSC en el estudio de Haynesworth o al método de obtención de la población. Los niveles de VEGF en MSC normales han sido reportados previamente entre 5.6 y 10 ng /ml (Kögler et al, 2005), lo cual es semejante a lo encontrado en este estudio. En el otro caso en que se encontró una diferencia en la producción de citocinas fue para IL-1 β en donde los pacientes produjeron en promedio dos veces más que los controles de médula normal. Los niveles encontrados fueron bajos comparados con los niveles reportados en el trabajo de Kögler y colaboradores (2005).

La evaluación de la producción de las moléculas de matriz extracelular por parte de las MSC se llevó a cabo mediante técnicas cualitativas. La producción de fibronectina fue evaluada mediante la técnica de RT-PCR. Como se muestra en la figura 6A, se obtuvo el RNA mensajero de capas confluentes de MSC en segundo pasaje, tanto de médula ósea normal como de pacientes con SMD. La cantidad de RNA total obtenida fue en promedio de 1.8 μ g / 1×10^5 células. En el panel B de la figura 6 se muestra un resultado representativo en donde se observan los productos del RT-PCR para los genes de fibronectina y GAPDH en MSC de un paciente con SMD y otra de MOn. El tamaño del amplificado para

fibronectina es de 639 pb y el tamaño del amplificado del GAPDH es de 451 pb. En todas las muestras trabajadas se observaron ambos productos de amplificación (fibronectina y el control GAPDH) por lo que concluimos que las MSC tanto normales como de pacientes con SMD producen fibronectina.

La cuantificación de la producción de colágeno fue realizada de una manera indirecta por inmunocitoquímica, mediante un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo en la subunidad beta de la enzima prolil-4-hidroxilasa. Ésta es una enzima que cataliza la formación de 4-hidroxiprolina en el colágeno. En la figura 6C se muestra una fotografía representativa de una laminilla de células mononucleares de médula ósea teñidas con el anticuerpo. Las flechas indican células del linaje mieloide las cuales fueron negativas. Por su parte, las MSC en la figura 6D muestran una muy fuerte tinción con el anticuerpo. Todas las muestras analizadas de MSC fueron positivas mostrando una fuerte tinción en las regiones perinucleares, tanto normales como de pacientes con SMD. No encontramos diferencias en la producción de estas moléculas de matriz entre los controles y los pacientes, sin embargo la metodología utilizada no permite evaluar los niveles de manera cuantitativa. Estos resultados son apoyados por los publicados anteriormente (Prockop, 1997) en donde se reporta que la MSC normales producen fibronectina y colágena tipo I y IV. Así podemos concluir que las MSC normales y de pacientes con SMD producen fibronectina y colágena.

Las MSC permiten el crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células hematopoyéticas a través de varios mecanismos. En este trabajo evaluamos un panel de 6 citocinas y 2 moléculas de la matriz extracelular fundamentales en la regulación de la hematopoyesis. No encontramos diferencias marcadas en la expresión de éstas moléculas entre las MSC normales y de pacientes con SMD. Las únicas citocinas que encontramos con una diferencia estadística fueron GM-CSF e IL-1 β , por lo que será necesario evaluar si se traduce en un cambio en la Biología de las MSC y su papel para estimular la hematopoyesis.

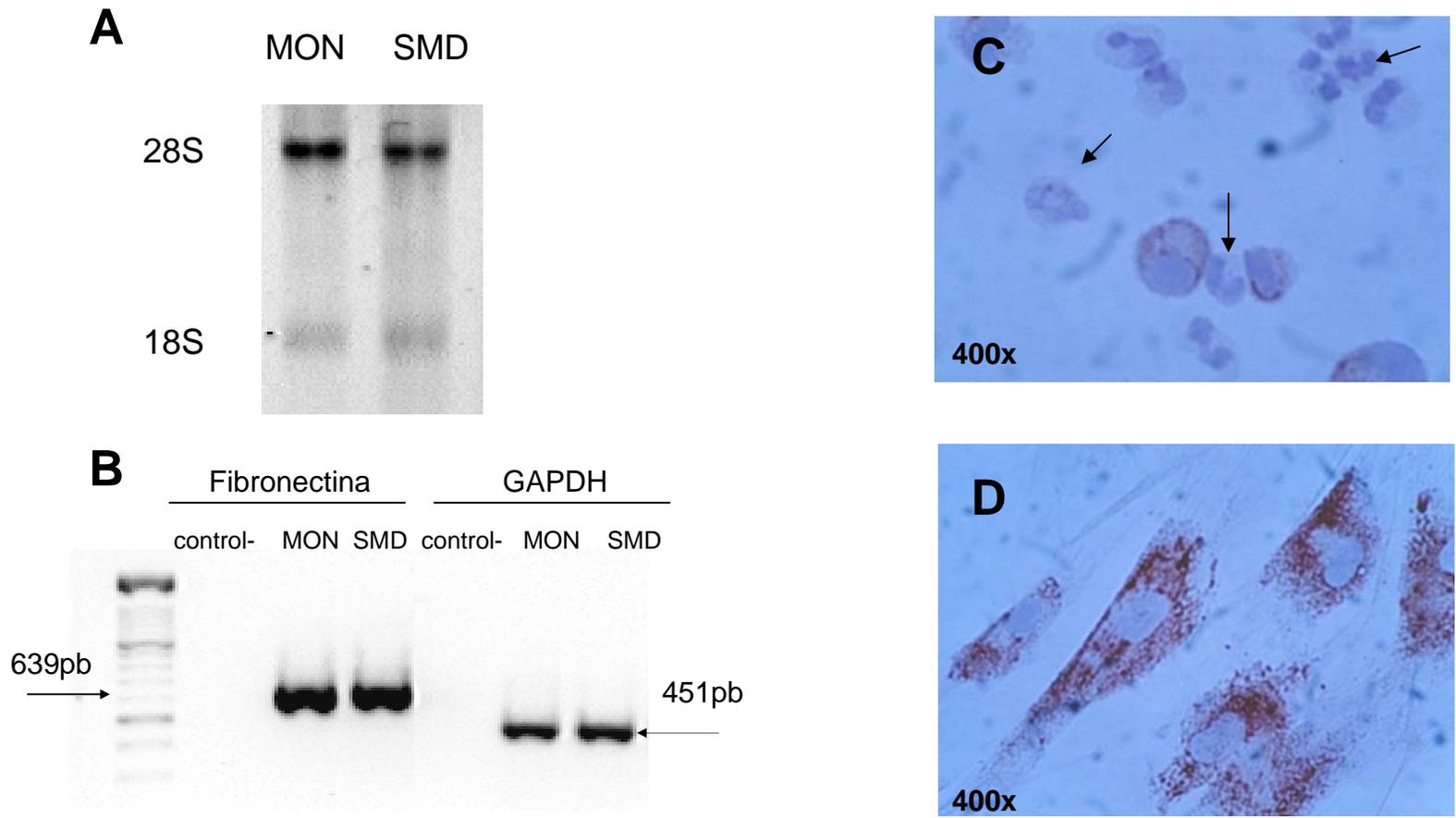


Figura 6. Expresión de fibronectina y colágena en MSC. A, electroforesis del ARN obtenido de MSC de médula ósea normal (MON) y de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD); B, electroforesis de los productos de RT-PCR del mensajero para fibronectina y para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control; C, laminilla representativa de una reacción negativa de inmunocitoquímica de células mononucleares de médula ósea y de una reacción positiva de MSC de médula ósea (D) para la enzima proli-4-hidroxilasa. X número de aumentos de la microfotografía.

6.6 Adhesión de células progenitoras hematopoyéticas a capas de MSC de pacientes con SMD y MOn.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de adhesión a capas de MSC de las células progenitoras hematopoyéticas, fue necesario establecer cultivos confluentes de MSC que no continuaran proliferando pero que mantuvieran su estado metabólico normal. La radiación es la técnica más utilizada para detener la proliferación de las células estromales y fibroblastos (Lemieux e Eaves, 1996). Sin embargo es costosa, elaborada y la capa de células adherentes queda muy susceptible al desprendimiento (Ponchio et al, 2000). En el presente estudio utilizamos una técnica alternativa que involucra el uso de un agente químico. La mitomicina es un agente antitumoral que evita la separación de la doble cadena de ADN durante la replicación, formando enlaces covalentes entre las cadenas complementarias. Utilizada en dosis definidas, la mitomicina inhibe la síntesis del ADN pero no interfiere en la síntesis del ARN ni de las proteínas, por lo que la célula continua siendo viable pero incapaz de dividirse (Ponchio et al, 2000).

Realizamos una curva dosis respuesta, para encontrar la concentración óptima de mitomicina en la cual la célula no continuara proliferando, pero sin causarle muerte celular. Evaluamos tanto la proliferación celular como la apoptosis en capas semi-confluentes de MSC. En la figura 7 se muestra el promedio de 3 muestras de MSC de médula ósea normal. Para evaluar la proliferación de las MSC se utilizó un kit comercial (5'-Bromo-2'-deoxyuridine labeling and detection kit II Boehringer Mannheim) que evalúa la incorporación de bromodeoxi-uridina (BrdU) en las cadenas de ADN en las células que se encuentran proliferando. Los niveles de proliferación se reportan como unidades de absorbancia. Como se muestra en la figura 7A, desde la concentración de 0.2 µg de mitomicina se encontró una inhibición en la proliferación de las MSC, al compararlo con células sin tratar (0 µg mitomicina). La muerte celular fue evaluada mediante un kit comercial (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche) basado en la detección de fragmentos ADN-nucleosomas, los cuales son liberados como parte del mecanismo de apoptosis. Los resultados se muestran en unidades de absorbancia. El control positivo y negativo fue incluido por el proveedor. Como se observa en la figura 7B a la concentración de 0.2 µg no encontramos evidencias de muerte celular, siendo la misma absorbancia que en 0.0 µg. A partir de 1 µM se observa un incremento en la muerte celular, siendo su pico máximo en 5 µM. De acuerdo a los

resultados anteriores, decidimos utilizar la concentración de 0.2 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

Una vez establecida la concentración de mitomicina, se realizaron los ensayos de adhesión. Fueron obtenidas células progenitoras hematopoyéticas de la sangre de cordón umbilical utilizando una inmunoselección negativa (Flores-Guzmán et al, 2005). Los progenitores hematopoyéticos fueron cultivados en presencia de MSC, tanto de pacientes con SMD como de donadores normales. En la figura 8 se muestra el número de progenitores hematopoyéticos mieloides (CFU-GM), eritroides (BFU-E) y multipotenciales (CFU-MIX) adheridos a la capa de MSC a los 14 días de cultivo. Los progenitores mieloides adheridos a la capa de MSC de médula ósea normal fueron más abundantes que los eritroides, mientras que los progenitores multipotenciales se encontraron por debajo de los niveles detectables. En el caso de los progenitores adheridos a las capas de MSC de pacientes con SMD, encontramos el mismo patrón que en médula ósea normal, siendo más abundantes los progenitores mieloides que los eritroides y multipotenciales. Al comparar el número de progenitores adheridos en las capas de MSC normales y de pacientes, encontramos que hubo una mayor adhesión de los progenitores a capas de MSC de pacientes con SMD. Estos resultados sugieren que las capas de MSC no tienen una deficiencia en la capacidad para permitir la adhesión de progenitores hematopoyéticos, lo cual concuerda con lo publicado por Gidáli y colaboradores (1996), quienes, en su estudio analizaron la capacidad de adhesión de células primitivas a capas de estroma total de pacientes con SMD y de donadores normales, y encontraron que no existe diferencia en el número de progenitores hematopoyéticos adheridos en pacientes con respecto a las capas de estroma de donadores sanos. A pesar de que en nuestro estudio se analizaron MSC y en el estudio de Gidáli células estromales, las cuales además de contener a las MSC contienen otro tipo de células adherentes, se demuestra en ambos estudios que las células estromales y MSC no tienen deficiencias en la capacidad de adhesión a progenitores hematopoyéticos.

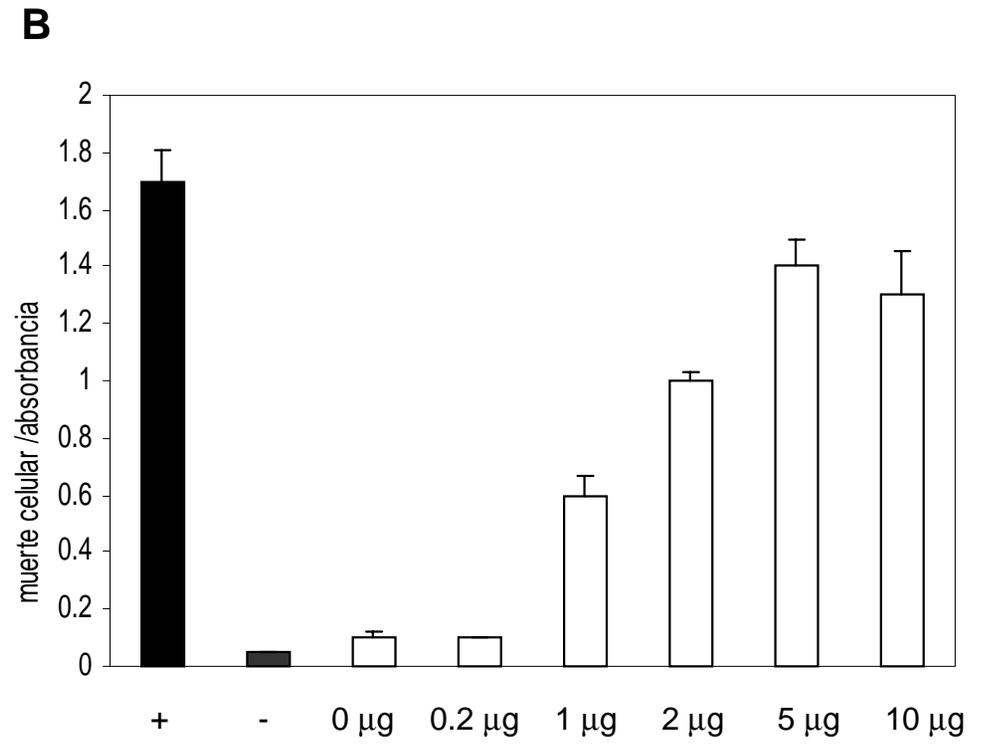
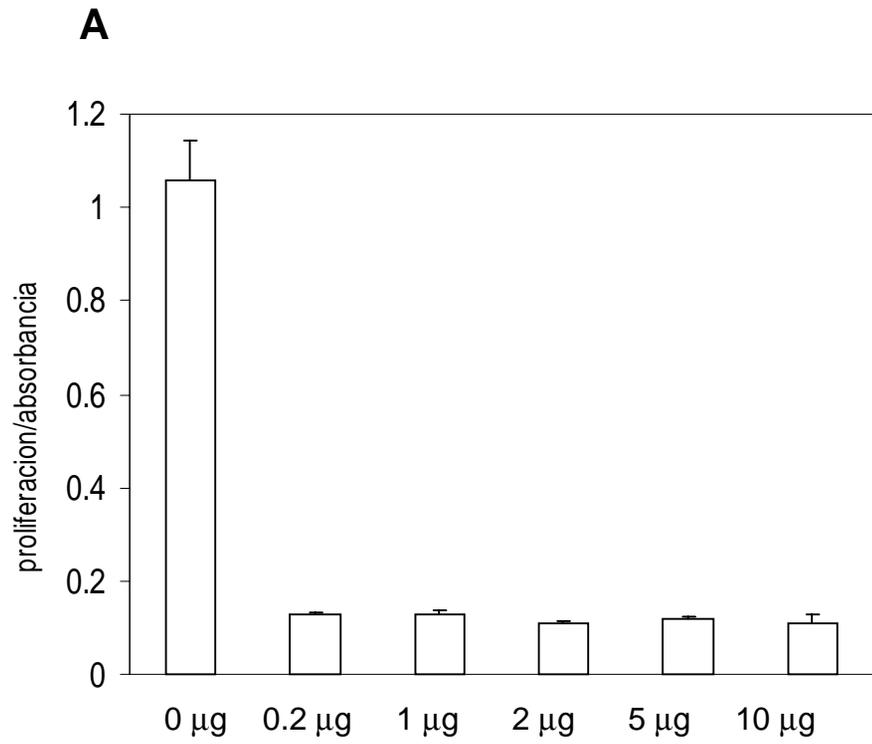


Figura 7. Efecto de la mitomicina (MM) en la proliferación (A) y muerte celular (B) de células troncales mesenquimales de médula ósea normal.

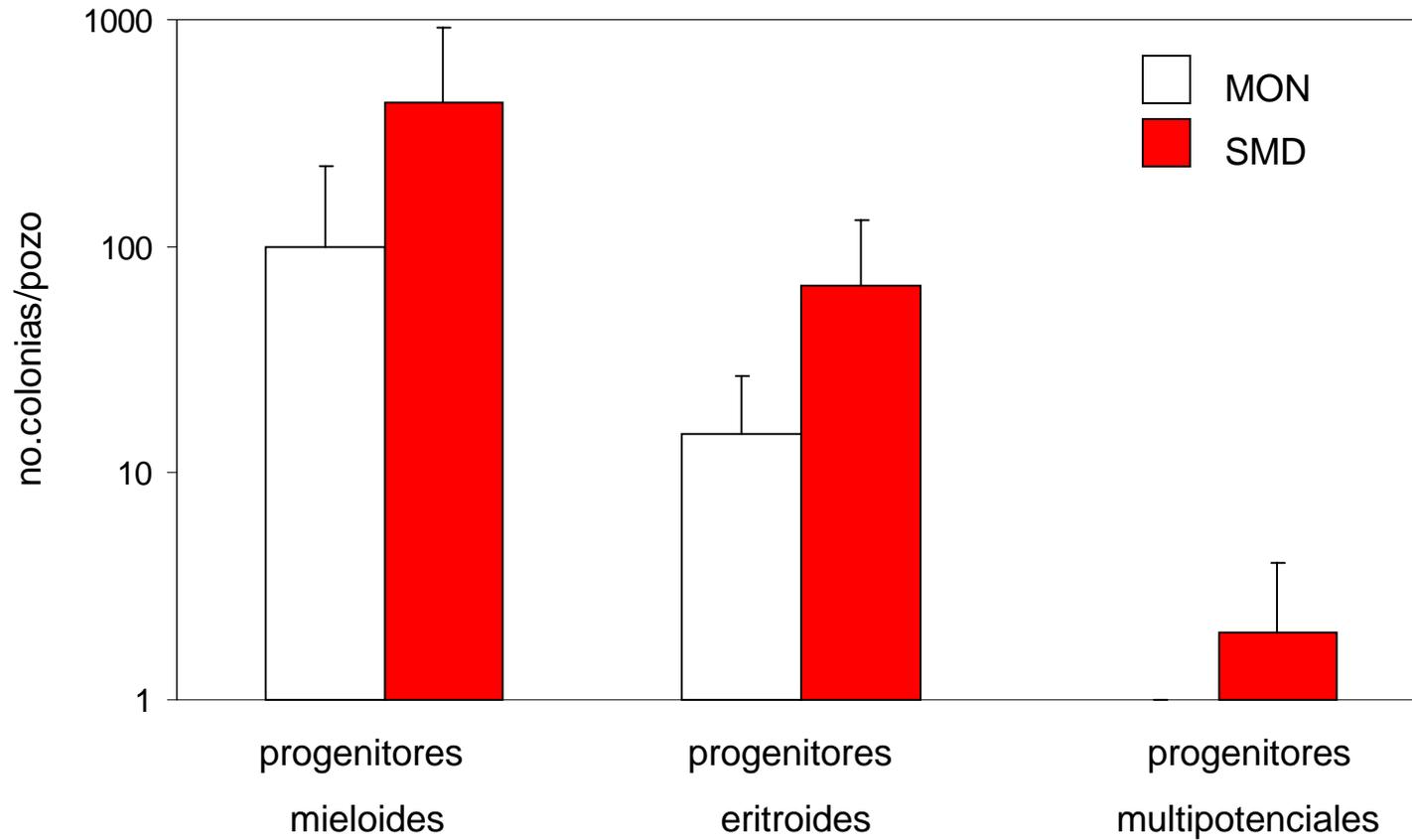


Figura 8. Capacidad de adhesión a capas de células troncales mesenquimales de pacientes (MDS) y médula ósea normal (MON) de distintos tipos de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical en día 14 de cultivo.

6.7 Capacidad de las células troncales mesenquimales de pacientes con SMD para sostener la hematopoyesis normal.

Para poder conocer la capacidad de las células troncales mesenquimales de pacientes con SMD para sostener la hematopoyesis normal, se utilizó el sistema de co-cultivo. El sistema de co-cultivo consiste en mantener en cultivo una capa de células adherentes, la cual provee las señales necesarias para permitir la proliferación, diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas, sin la adición de citocinas recombinantes. A la capa de MSC confluyente se adicionó 0.2 µg /ml de Mitomicina de acuerdo a las condiciones estandarizadas previamente en este estudio. Posteriormente se agregaron las células hematopoyéticas primitivas con el siguiente inmunofenotipo CD34+ CD38- linaje- obtenidas mediante inmunoselección (Flores-Guzmán et al, 2005). Se siguió la cinética de proliferación tanto de las células mononucleares totales y de progenitores hematopoyéticos. Se realizó el cambio de medio cada 7 días durante 5 semanas, tomando la mitad del medio de cultivo y agregando la misma cantidad de medio fresco. En la figura 9 podemos observar dos microfotografías de co-cultivos de células hematopoyéticas primitivas y células troncales mesenquimales de donadores sanos (9A) y de células troncales mesenquimales de pacientes con SMD (9B). Se observa en ambos casos un cultivo confluyente de células adherentes de morfología fusiforme, formando una capa estrecha de células sobre las cuales se encuentran células hematopoyéticas, las cuales se observan como células redondas, de menor tamaño y refringentes.

En la figura 10 se observan las cinéticas de las células hematopoyéticas primitivas (CD34+ CD38- lin-) en co-cultivo con las MSC de pacientes (círculos rojos) y donadores sanos (triángulos verdes) normalizadas a 10,000 células iniciales por pozo. Como se muestra en la gráfica 10A, no encontramos diferencias significativas en la cinética de células nucleadas (CN) en capas de donadores y pacientes con SMD. Tanto las capas de MSC de donadores como de pacientes mantuvieron la proliferación de las CN durante 35 días. En ésta gráfica observamos la proliferación de las CN, las cuales incluyen a todas las células hematopoyéticas -tanto progenitoras como células maduras, por lo que posteriormente se realizó la cinética de los progenitores hematopoyéticos. Los progenitores hematopoyéticos fueron evaluados mediante un ensayo de colonias y fueron

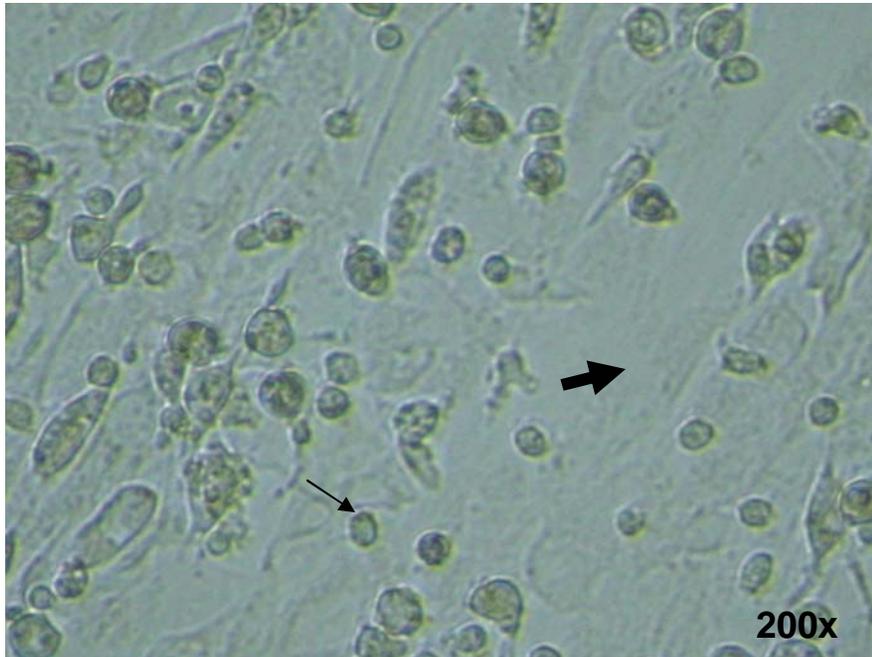
A**B**

Figura 9. Co-cultivos de células troncales mesenquimales de médula ósea normal (A) y de pacientes con síndrome mielodisplásico (B) y células hematopoyéticas primitivas en día 35 del cultivo. La flecha gruesa indica a las células troncales mesenquimales y la flecha delgada a las células hematopoyéticas. X.- número de aumentos de la microfotografía.

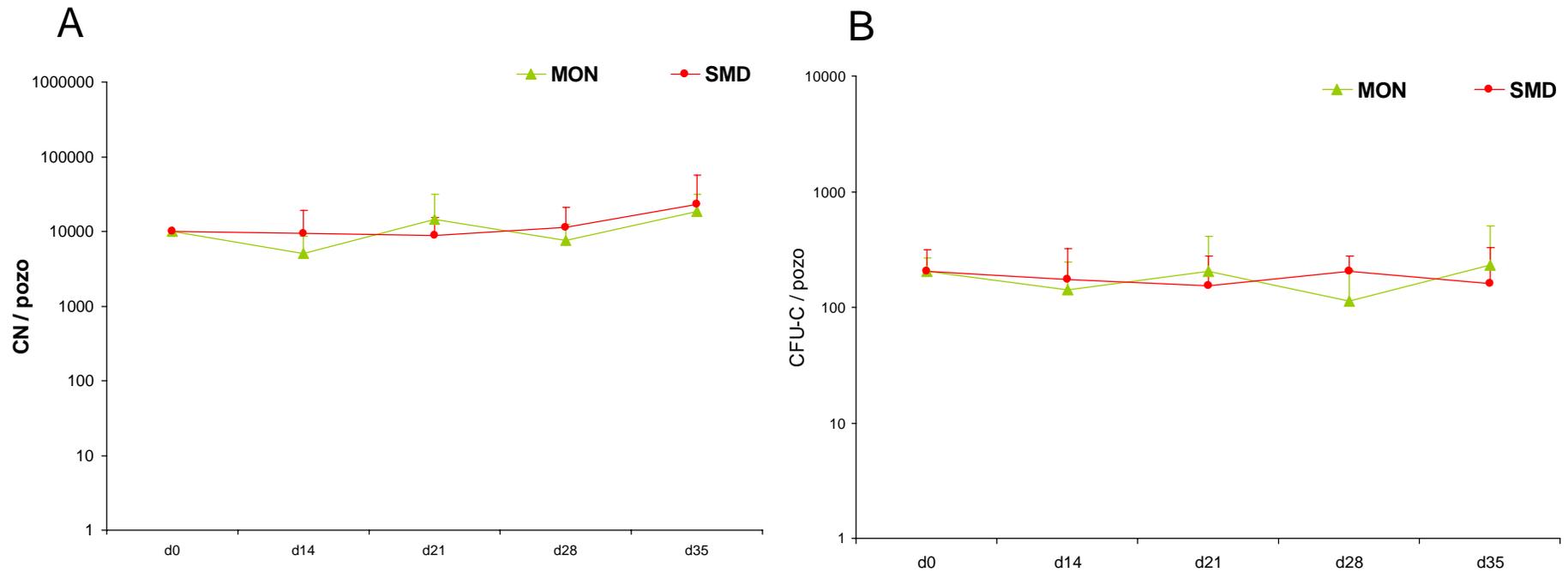


Figura 10. Cinética de células nucleadas (CN) y progenitores hematopoyéticos (CFU-C) en co-cultivos de células de cordón umbilical (CD34+ CD38- lin-) y células mesenquimales de médula ósea normal (MON) y de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD).

incluidos progenitores mieloides, eritroides y mixtos. En la figura 10B observamos que no existe diferencia en la cinética de proliferación de los progenitores hematopoyéticos creciendo en capas de MSC de donadores o pacientes. Como se observa en la gráfica, el crecimiento de los progenitores hematopoyéticos se mantuvo hasta por 5 semanas de cultivo, lo cual indica que las MSC tanto de donadores sanos como de pacientes, fueron capaces de mantener el crecimiento y proliferación tanto de progenitores maduros (los cuales se encontraban presentes en las primeras semanas de cultivo), como de progenitores más inmaduros, los cuales fueron generados por células más inmaduras y por lo tanto se encontraron en el cultivo hasta la quinta semana. Esto es, los progenitores hematopoyéticos evaluados en las últimas semanas del cultivo no se encontraban presentes en las primeras semanas, sino que fueron originados por células muy inmaduras incapaces de producir colonias en metilcelulosa, pero que al madurar dieron origen a progenitores hematopoyéticos capaces de producir colonias en cultivo semisólido de metilcelulosa.

Al utilizar progenitores hematopoyéticos primitivos de sangre de cordón umbilical en el sistema de co-cultivo, evitamos que en la muestra existan además de las células hematopoyéticas, células troncales mesenquimales que contaminen los cultivos de MSC de médula ósea. De acuerdo al inmunofenotipo de las células de sangre de cordón utilizadas y a la frecuencia de MSC en la sangre de cordón umbilical, la probabilidad de que en la muestra existan células mesenquimales de cordón umbilical es sumamente baja (Goodwin et al, 2001), a diferencia de otros estudios en donde se han utilizado células hematopoyéticas de médula ósea normal en donde existe una mayor probabilidad de encontrar MSC.

Con la finalidad de evaluar la capacidad de regulación humoral por parte de las MSC, se realizó un tipo de co-cultivo modificado. Este tipo de co-cultivo consistió en colocar un filtro entre la capa adherente de MSC y las células hematopoyéticas, para que no exista el contacto directo entre ellas, pero que pudieran difundir libremente los factores humorales. Como se observa en la figura 11A las capas de MSC fueron capaces de sostener la hematopoyesis aún en ausencia del contacto directo entre ambas poblaciones, ya que la cinética de células nucleadas se mantuvo durante 5 semanas. Sin embargo, en las últimas semanas la cinética de crecimiento se observó ligeramente por debajo de la cinética en co-cultivos con contacto, lo que aparece mas evidente en la cinética de crecimiento de

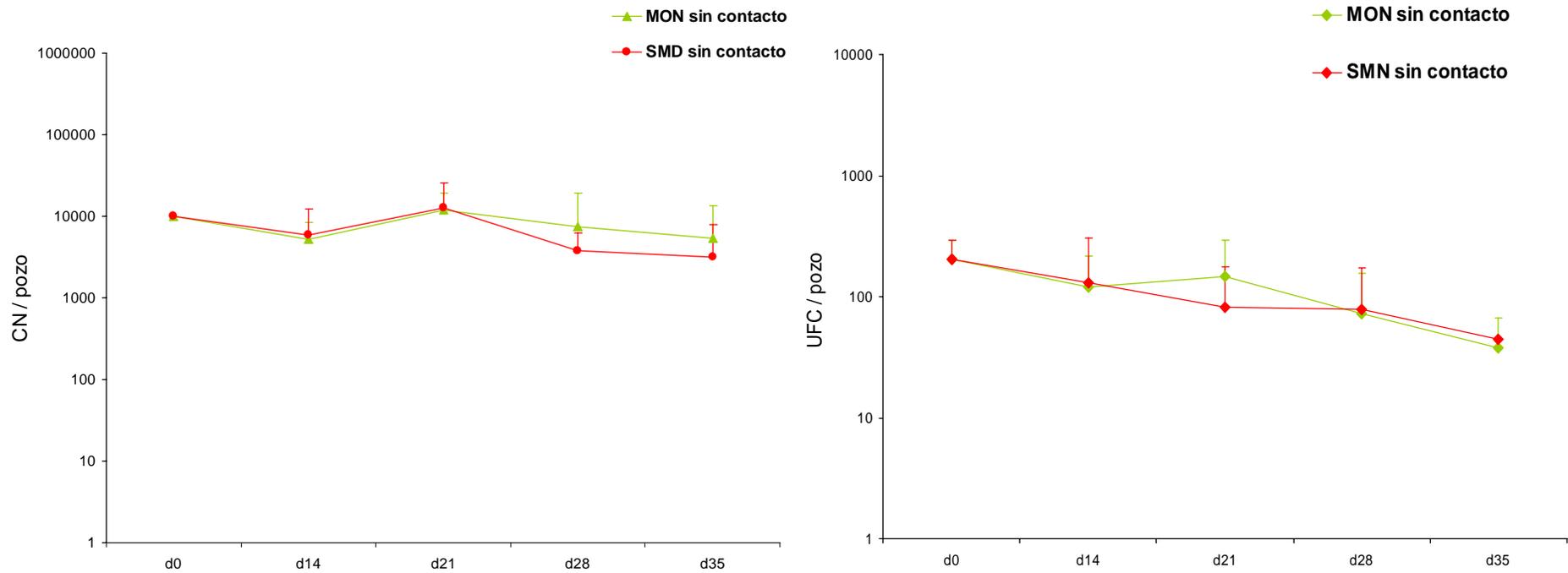


Figura 11. Cinética de células nucleadas (CN) y progenitores hematopoyéticos (UFC) en co-cultivos de células de cordón umbilical (CD34+ CD38- lin-) y células mesenquimales de médula ósea normal (MON) y de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) sin contacto.

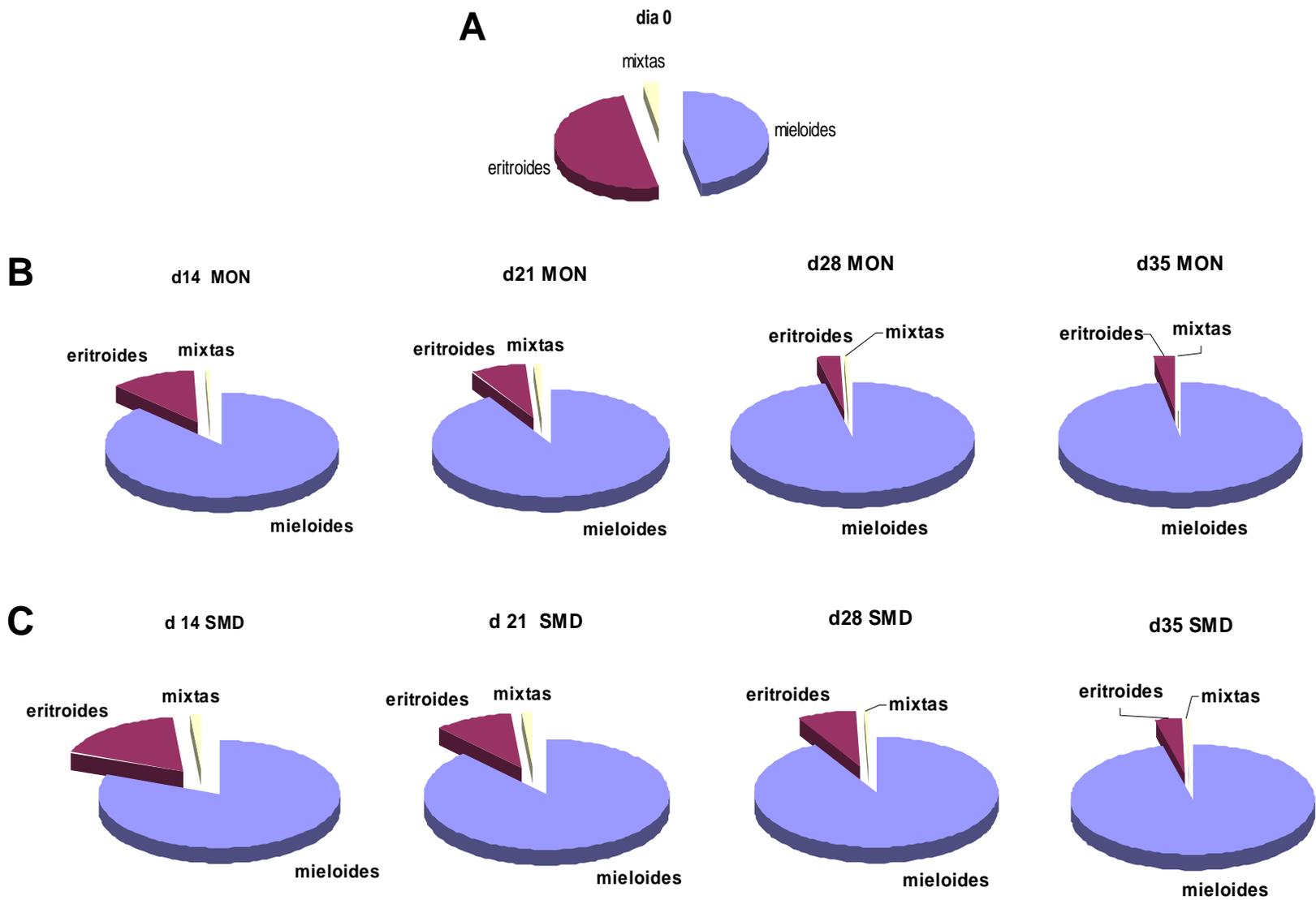


Figura 12. Tipo de progenitores presentes en los co-cultivos de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical y MSC de donadores de médula ósea normal (MON) y de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) durante 5 semanas con contacto.

los progenitores en la figura 11 B. Aunque en ambos casos se observó el mismo comportamiento, tanto para MSC de médula ósea normal como para MSC de pacientes con SMD, es evidente la importancia de la regulación directa de las MSC, ya que al estar presente el contacto directo entre MSC y células hematopoyéticas, se generan un mayor número de progenitores hematopoyéticos en el cultivo.

Finalmente, se comparó el tipo de progenitor hematopoyético presente en los co-cultivos de MSC de pacientes con SMD y donadores normales. Los progenitores fueron clasificados como progenitores mieloides, cuando contenían colonias de granulocitos, monocitos o ambos, los progenitores eritroides incluyeron progenitores maduros (CFU-E) e inmaduros (BFU-E) y finalmente los progenitores mixtos incluían colonias multipotenciales con contenido tanto mieloides como eritroide. En la figura 12A se muestra la distribución de los progenitores en la muestra al inicio del cultivo (día 0). El 51% lo constituyen los progenitores eritroides, el 46% los progenitores mieloides y el 3% los progenitores multipotenciales. Al cultivar los progenitores hematopoyéticos sobre las capas de MSC de médula ósea normal y pacientes con SMD se observa una disminución en los progenitores eritroides a partir del día 14 de cultivo, siendo de 12 y 18%, respectivamente (Figura 12B y C). A lo largo del co-cultivo existe un predominio de los progenitores mieloides, llegando a ser más del 95% de los progenitores totales observados en el día 35. Cabe resaltar que no encontramos diferencias significativas en la distribución de los distintos tipos de progenitores hematopoyéticos en los co-cultivos de MSC de donadores y pacientes con SMD.

De acuerdo a los resultados de co-cultivo podemos concluir que las MSC de pacientes con SMD son capaces de mantener la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas primitivas normales a largo plazo (Figura10), incluso en ausencia de un contacto directo con las células hematopoyéticas (Figura 11).

Este sistema *in vitro* nos permitió evaluar la capacidad de las MSC para mantener la hematopoyesis de linaje mieloides, ya que este tipo de cultivos no favorecen el crecimiento de progenitores linfoides (Flores-Figueroa et al, 1999; Flores-Guzmán et al, 2002)

La capacidad de las MSC para sostener la hematopoyesis normal ya ha sido demostrado previamente (Kadereit et al, 2002; Kögler et al, 2005). En cuanto al papel de las MSC de pacientes con SMD para mantener la hematopoyesis, existe únicamente un

trabajo publicado recientemente (Soenen et al, 2005). Al igual que en nuestro estudio, en el trabajo de Soenen y colaboradores se concluye que las MSC de los pacientes tienen capacidad para soportar la hematopoyesis a corto y a largo plazo, sin embargo existen varias diferencias en su diseño experimental. En el estudio del grupo francés, utilizan como control a una línea celular murina para comparar el crecimiento de las células hematopoyéticas, lo cual no es adecuado debido a que el tipo de interacciones célula-célula no son comparables y se trata de células transformadas provenientes de fibroblastos estromales y no de MSC. En nuestro estudio utilizamos MSC de donadores normales, obtenidas con la misma metodología que las MSC de pacientes y que mostraron el mismo inmunofenotipo. En el estudio de Soenen utilizan células hematopoyéticas CD34+ CD38- que han sido expandidas previamente en cultivos líquidos en presencia de citocinas, por lo que las poblaciones evaluadas son heterogéneas y no corresponden a la población inicial CD34+ CD38- debido a que no realizan una segunda selección de las células expandidas. En nuestro estudio trabajamos con células CD34+ CD38- lin- obtenidas en día cero, sin expandir por lo que representan a una población más homogénea (Flores-Guzmán et al, 2005). Finalmente, una de las diferencias más importantes es que en el estudio del grupo francés utilizan como fuente de células hematopoyéticas, células del propio paciente y no células normales, por lo que su conclusión se limita a que las MSC de pacientes son capaces de soportar la hematopoyesis de pacientes con SMD y no pueden demostrar la capacidad para soportar la hematopoyesis normal.

VII Discusión General

De acuerdo a los resultados anteriores, el presente trabajo es el primero en establecer que las MSC de pacientes con SMD tienen la capacidad de mantener a células hematopoyéticas inmaduras (CD34+ CD38-) a largo plazo, lo que correlaciona con la secreción de niveles normales de varias citocinas importantes para la hematopoyesis y de dos moléculas de matriz extracelular. Estos resultados son importantes ya que permiten establecer que las alteraciones encontradas en estudios anteriores en el estroma de los pacientes con SMD (Coutinho et al, 1990; Aizawa et al, 1999; Flores-Figueroa 2002), no son debidas a alteraciones de las células troncales mesenquimales. Estos estudios describieron que el estroma de los pacientes con SMD no tiene la capacidad de mantener la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas en cultivos, induce apoptosis a las células hematopoyéticas y secreta niveles elevados de citocinas pro-apoptóticas e inflamatorias, por lo que será necesario realizar más estudios que permitan conocer si la alteración ocurre en las células mesenquimales maduras (fibroblastos estromales, osteoblastos) o es debida a la interacción anormal entre células estromales y macrófagos. Esta última alternativa parece ser la mas viable debido a que se han realizado estudios con macrófagos aislados y no se han encontrado alterados (Mencoboni et al, 1996), por lo que posiblemente es necesaria la interacción entre ambos componentes del estroma: mesenquimal y hematopoyético para hacer evidentes éstas anormalidades, ésta hipótesis es apoyada por estudios que demuestran que los macrófagos *in vivo* (Shetty et al, 1996; Kitagawa et al, 1997) secretan mayor cantidad de citocinas pro-apoptóticas e inflamatorias y que capas compuestas por fibroblastos estromales y macrófagos también producen niveles incrementados de éstas citocinas (Flores-Figueroa et al, 2002).

Sin duda, uno de los hallazgos más interesantes del trabajo fue la descripción de alteraciones cromosómicas en las células troncales mesenquimales de pacientes con Síndrome Mielodisplásico, lo que sugiere que a pesar de que éstas células parecían ser normales en cuanto a sus propiedades funcionales, pueden tener una mayor susceptibilidad a transformarse *in vitro*, y por lo tanto ser mas riesgosas que las células normales para ser utilizadas en la terapia celular como había sido propuesto por Soenen-Cornuu (2005). Este es uno de los primeros trabajos en describir que las células troncales mesenquimales de

pacientes con SMD presentan alteraciones cromosómicas. En el 2005 se publicaron tres estudios en donde se describe la susceptibilidad de las células troncales mesenquimales para adquirir alteraciones *in vitro*. El trabajo de Miura y colaboradores (Miura et al, 2005) describe que las células troncales mesenquimales murinas se transforman espontáneamente *in vitro* acumulando alteraciones cromosómicas, e incluso al ser transplantadas son capaces de generar un tumor del tipo fibrosarcoma. Al igual que en nuestro trabajo, estos autores reportaron que las células troncales mesenquimales de individuos normales no mostraron transformación espontánea bajo las mismas condiciones experimentales. Sin embargo, otros dos grupos reportaron que las células troncales mesenquimales humanas presentan alteraciones cromosómicas bajo ciertas condiciones. El grupo de Bernand (Rubio et al, 2005) publicó un trabajo en donde describen la transformación espontánea de las MSC humanas adultas provenientes de tejido adiposo después de permanecer mas de dos meses en cultivo, y el grupo del Ian McNiece (Wang et al, 2005) reportó que una subpoblación de células troncales mesenquimales presentaba translocaciones y aneuploidía en su cariotipo, altos niveles de telomerasa y que al ser transplantadas generaban tumores en ratones inmunodeficientes. No se encuentra descrito que los pacientes con SMD tengan una mayor incidencia de sarcomas, lo que nos indica que posiblemente estas alteraciones encontradas *in vitro* no se presentan *in vivo* y/o que el sistema inmune se encarga de eliminar a estas clonas o no permitir que proliferen.

El hecho de que las MSC de pacientes aparentemente sean mas susceptibles de transformarse *in vitro* correlaciona con los datos encontrados en células hematopoyéticas, las cuales ha sido reportado que se transforman en cultivo (Tamura et al, 1993) y presentan mutaciones en genes de reparación del ADN como el gen CHK2 (Hofman et al, 2001).

Recientemente un grupo japonés (Ogata et al, 2005) reportó la presencia de una población celular con inmunofenotipo inmaduro (CD45-CD34-CD38-linaje-) involucrada en la clona displásica en pacientes con SMD, en esta población pueden estar presentes tanto células hematopoyéticas inmaduras como células troncales mesenquimales, por lo que no se descarta la posibilidad de que la alteración inicial esté presente en un progenitor común de células troncales hematopoyéticas y células troncales mesenquimales.

En nuestro estudio no encontramos las mismas alteraciones cromosómicas en ambos tipos de células, sin embargo no se descarta la posibilidad de que existan alteraciones que

no sean detectadas mediante cariotipos y que sí sean compartidas entre ambos tipos celulares.

VIII Conclusiones y Perspectivas

Nuestro estudio nos permitió establecer que las células troncales mesenquimales, las cuales dan origen al componente mesenquimal del estroma (fibroblastos estromales, adipocitos, osteoblastos) presentan una morfología y marcadores inmunológicos similares a las observadas en células de sujetos sanos. Encontramos que las células troncales mesenquimales de pacientes con SMD son capaces de sostener la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas primitivas de sangre de cordón umbilical, a pesar de contener alteraciones cromosómicas. Es importante hacer énfasis en que el número de parámetros analizados para evaluar la funcionalidad de las MSC no fue exhaustivo, por lo que será necesario analizar un panel más amplio de citocinas, moléculas de matriz extracelular, moléculas de adhesión, receptores de citocinas y marcadores inmunofenotípicos.

De acuerdo a la evidencia encontrada en nuestro estudio podemos concluir que las alteraciones previamente reportadas en capas de estroma total en cultivos *in vitro* de médula ósea de pacientes con SMD pueden deberse a la interacción entre distintos elementos del estroma con las MSC, debido a que a pesar de presentar alteraciones cromosómicas, de acuerdo con los parámetros analizados, las MSC de pacientes con SMD tuvieron la capacidad de sostener la hematopoyesis.

Es necesario establecer la causa de las alteraciones en capas de estroma completas que no fueron encontradas en cultivos de células troncales mesenquimales, por lo que se deben realizar cultivos de células estromales en ausencia de macrófagos, mediante su eliminación con una selección inmunomagnética. Así como realizar co-cultivos de células troncales mesenquimales en presencia y ausencia de distintos porcentajes de macrófagos.

Este trabajo apoya los recientes hallazgos sobre la susceptibilidad de las células troncales mesenquimales de adquirir alteraciones cromosómicas en cultivo, por lo que es importante considerar este aspecto para hacer uso de estas células en la clínica como parte de la terapia celular. Se propone que sea obligatorio el analizar el cariotipo de las células que sean infundidas en los pacientes, algo que no se hace en la actualidad.

Para poder conocer si las alteraciones cromosómicas encontradas en las MSC de los pacientes fueron adquiridas en cultivo, será importante analizar su cariotipo antes de

cultivarlas y analizarlo en distintas resiembras. Para conocer si las MSC de pacientes son mas susceptibles que las MSC normales de adquirir alteraciones cromosómicas en cultivo *in vitro*, se propone probar distintos agentes genotóxicos y evaluar su efecto sobre estas células a distintas concentraciones.

Será importante evaluar el mecanismo por medio del cual estas células adquieren anormalidades cromosómicas *in vitro* y si las células de los pacientes con SMD presentan una mayor susceptibilidad debido a que presentan alteraciones en genes de reparación del ADN.

Bibliografía

1. Abboud CN, Lichtman MA. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. En Chapter 4. Beutler E. 2001. Williams Hematology 6^o edition. Mc Graw Hill. International edition.
2. Aizawa S, Nakano M, Iwasw O, Yaguchi M, Hiramoto M, Hoshi H, Nabeshima R, Shima D, Handa H, Toyama K. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leukemia Research*. 1999; 23:239-246.
3. Aizawa S, Hiramoto M, Hoshi H, Toyama K, Shima D, Handa H. Establishment of stromal cell line from and MDS RA patient which induced and apoptotic change in hematopoietic and leukemic cells in vitro. *Experimental Hematology*. 2000; 28: 148-155.
4. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*. 2000;95:3620-3627
5. Alvi S, Henderson B, Shafer A. Determination of clonality in stromal and parenchymal cells pre and post thalidomide treatment in Myelodysplasia. *Blood*. 2000; 96(Suppl 1): 1536a.
6. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118:149-161.
7. Ascensao, J. L., Vercellotti, G. M., Jacob, H. S., and Zanjani, E. D. Role of endothelial cells in human hematopoiesis: modulation of mixed colony growth in vitro. *Blood*.1984; 63:553-558.
8. Ashton BA. Phil B, Allen TD. Howlett CR. Eaglesom CC. Hattori A. Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clinical Orthopaedics & Related Research*.1980. 151:294-307.
9. Aul C, Bowen DT, Yoshida Y. Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998; 83:71-86

10. Awaya N, Rupter K, Bryant E. et al. Marrow stromal cells are not derived from the malignant clone in myelodysplastic syndromes (MDS) *Blood*. 2001;98 (Suppl. 1):1487a.
11. Bab I, Ashton BA, Gazit D, Marx G, Williamson MC, Owen ME. Kinetics and differentiation of marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Journal of Cell Science*. 1986. 84:139-51.
12. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89:2804-2808
13. Baines P, Bowen D, Jacobs A. Clonal growth of haemopoietic progenitor cells from myelodysplastic marrow in response to recombinant hematopoietins. *Leukemia Research*. 1990;14:247-253.
14. Bathia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Medicine*. 1998; 4:1038-1045.
15. Bennet J.M., World Health Organization classification of the acute leucemias and myelodysplastic syndromes. *Int. J. Hematol*. 2000; 72:131-133.
16. Bennet J.M. Myelodysplastic syndromes: historical aspects and classification. En *The Myelodysplastic Syndromes. Pathobiology and clinical management*. Ed. Bennet J.M. 2002. Editorial Marcel Dekker Inc. pp: 1-14.
17. Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science*. 1995;267:104-108.
18. Bernasconi P, Alessandrino EP, Boni M, Bonfichi M, Morra E, Lazzarino M, Campagnoli C, Astori C. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical evolution and survival. *American Journal of Hematology*. 1994; 46:270-277.
19. Bianchi S, Barresi R, Ajmar F, Garré C, Ravazzolo R, Sessarego M. Fibroblastoid colony-forming cells in myeloproliferative disorders. *Acta Haematologica*. 1983; 70:349-356.
20. Bock TA. Assay systems for hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*. 1997;15: 185-195.

21. Bogdanovic AD, Trpinac DP, Jankovic GM, Bumbasirevic VZ, Obradovic M, Colovic MD. Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment. *Leukemia*. 1997;1:656-659.
22. Borbenyi Z, Cinkotai C, Harrison C, Testa N.G. The growth of myelodysplastic bone marrow in long-term cultures. *British Journal of Cancer*. 1987; 55:291-293.
23. Boudard D, Viallet A, Piselli S, Guyotat D, Campos L. In vitro study of stromal cell defects in myelodysplastic syndromes. *Haematologica/Journal of Hematology*. 2003;88: 827-829.
24. Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, Jondeau K, Viguiier F, Melle J, Picard F, Dreyfus F, Fontenay –Roupie M. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997;11:839-845.
25. Caldwell J, Emerson SG. IL-1 α act synergistically to stimulate production of myeloid colony-stimulating factors by cultures human bone marrow stromal cells and cloned stromal cell strains. *Journal of cellular physiology*. 1994; 159: 221-228.
26. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425:841-846.
27. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopedical Research*. 1991;9:641-650
28. Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, Hamilton JA, Chiarieri DR, Meyers PA, Gay S, Moore MAS. Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 1982;59: 1046-1054.
29. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic Syndromes: coping with ineffective hematopoiesis. *New England Journal of Medicine*. 2005;10:352-356.
30. Charbord P. The hematopoietic stem cell and the stromal microenvironment. *Therapie*. 2001;56:383-384.
31. Clark DM, Lampert IA. Apoptosis is a common histopathological finding in myelodysplasia: the correlate of ineffective hematopoiesis. *Leukemia and Lymphoma*. 1990; 2:415-418.

32. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2000; 97 (7): 3213-3218.
33. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2001; 98: 7841-7845.
34. Conget P, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal of cellular physiology*. 1999; 181:67-73.
35. Cortelezzi A, Cattaneo C, Cristiani S, Sarina B, Pomati M, Silvestris I, Ibatici A, Maiolo AT. Low plasma stem cell factor levels correlate with in vitro leukemic growth in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 1999; 23:271-275.
36. Coulombel L., Auffray I., Gaugler M-H., Roseblatt M. Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematologica*. 1997; 97:13-21.
37. Coutinho LH, Geary CG, Chang J, Harrison C, Testa NG. Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). *British Journal of Haematology*. 1990; 75:16-25.
38. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*. 2000;28:875-884.
39. Deeg J, Beckham C, Loken MR, Bryant E, Lesnikova M, Shulman HM, Gooley T. Negative regulator of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia and Lymphoma*. 2000;373: 405-414.
40. Delforge M. Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *The Hematology Journal*. 2003;4:303-309.
41. Deryugina E. Müller-Sieburg. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development?. *Critical Reviews in Immunology*. 1993;13:115-150.
42. Devetten MP, Wenger SL, Wang L, Solveig E, Gibson L. Trisomy 8 in bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2002; 100:4913a.
43. Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annual Review of Immunology*. 1990;8:111-137.

44. Dührsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Annals of Hematology*. 1996;73:53-70.
45. Eaves CJ, Sutherland HJ, Cashman JD, Otsuka T, Lansdorp PM, Humphries RK, Eaves AC, Hogge DE. Regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term marrow culture. *Seminars in Hematology*. 1991;28:126-131.
46. Emerson SG, Taichman RS, Adams S. The role of osteoblasts in hematopoietic stem cell biology. En *Hematopoiesis a developmental approach*. Zon LI. Ed. Oxford. 2001:476-483.
47. Flores-Figueroa E, Gutiérrez-Espíndola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chávez J, Mayani H. Hemopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: in vitro growth and long-term proliferation. *Leukemia Research*. 1999; 23:385-394.
48. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Montesinos JJ, Arana-Trejo RM, Mayani H. In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*. 2002;26:677-686.
49. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leukemia Research*. 2005; 29:215-224.
50. Flores-Figueroa E, Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Espíndola G, Montesinos JJ, Castillo S, Mayani H. Mesenchymal Stem Cells from Myelodysplastic Syndrome Patients support normal hematopoiesis. En preparación.
51. Flores-Guzman P, Gutierrez-Rodriguez M, Mayani H. In vitro proliferation, expansion, and differentiation of a CD34+ cell-enriched hematopoietic cell population from human umbilical cord blood in response to recombinant cytokines. *Archives of Medical Research*. 2002;33:107-114.
52. Flores-Guzmán P, Flores-Figueroa E, Martínez-Jaramillo G, Mayani H. In vitro characterization of two lineage-negative CD34+ cell-enriched hematopoietic cell populations from human UC blood. *Cytotherapy*. 2005;7:334-344.
53. Fracchiolla NS, Catena FB, Novembrino C, Ippolito S, Maisonneuve P, Cortelezzi A. Possible association between reactive oxygen metabolites and karyotypic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2003; 88:594-597.

54. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6:230-47.
55. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403
56. Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R. K., Latsink, N. V., Panasyuk, A. F., and Keiliss-Borok, I.V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissue. *Transplantation* 1974;17: 331-340.
57. Friedenstein, A. J: Precursor cells of mechanocytes, *Int. Rev. Cytol*. 1976;47:327-359.
58. Friedenstein AJ, Ivanov-Smolenski AA, Chajlakjan RK, Gorskaya UF, Kuralesova AI, Latzinik NW, Gerasimow UW. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Experimental Hematology*. 1978;6:440-444.
59. Galmiche MC, Koteliansky VE, Brière J, Hervè P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*. 1993. 82:66-76.
60. Gidáli J, Fehér I, Hollán SR. Blast colony forming cell-binding capacity of bone marrow stroma from myelodysplastic patients. *Stem Cells*. 1996; 14:577-583.
61. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2001; 7: 581-588.
62. Golde DW, Hocking SG, Quan RS, Sparkes RS, Gale RP. Origin of human bone marrow fibroblasts. *British Journal of Hematology*. 1980; 44:183-187.
63. Gordon M.Y. Extracellular matrix of the marrow microenvironment. *British Journal of Haematology*. 1988;70:1-4.
64. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J.

- International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 1997; 89: 2079-2088.
65. Guo Z, Yang J, Liu X, Li X, Hou C, Tang PH, Mao N. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chinese Medical Journal*. 2001;114:950-953.
 66. Hasle H, Niemeyer CH. Myelodysplastic Syndrome and Juvenile Myelomonocytic Leukemia in Children. En *The Myelodysplastic Syndromes. Pathobiology and clinical management*. Ed. Bennet J.M. Editorial Marcel Dekker Inc. 2002: 299-344.
 67. Haynesworth SE, Goshima H, Golberg VM, Caplan I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992. 13: 81-88.
 68. Haynesworth S, Baber M, Caplan A. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 α . *Journal of cellular physiology*. 1996;166:585-592.
 69. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340:1649-1660.
 70. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth. Bone marrow delivers software not hardware. *Circulation Research*. 2004. 94:573-574.
 71. Hodgson GS, Bradley TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment. *Clinical Haematology*. Second edition. Sandoz Atlas. 1979:124-140
 72. Hofmann WK, Miller CW, Tsukasaki K, Tavor S, Ikezoe YT, Hoelzer D, Takeuchi S, Koeffler PH. Mutation analysis of the DNA-damage checkpoint gene CHK2 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leukemia Research*. 2001;25:333-338.
 73. Hofmann WK, Lubert M, Hoelzer D, Koeffler P. Myelodysplastic syndromes. *The Hematology Journal*. 2004;5:1-8.
 74. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells*. 2002;20:249-58.
 75. Huss R. Isolation of primary and immortalized CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources. *Stem Cells* 2000.18: 1-9

76. Huss R, Moosmann S. The co-expression of CD117 (c-kit) and osteocalcin in activated bone marrow stem cells in different diseases. *British Journal of Haematology*. 2002;118:305-312.
77. Javanzon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental Hematology*. 2004. 32: 414-425.
78. Kadereit S, Deeds LS, Haynesworth SE, Koc ON, Kozik MM, Szekely E, Daum-Woods K, Goethicus GW, Fu P, Welniak LA, Murphy WJ, Laughlin MJ. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. *Stem Cells*. 2002;20:573-82.
79. Kanamaru A, Tamura S. Application of long-term bone marrow cultures for studying the leukemic transformation of myelodysplastic syndromes. *Leukemia and Lymphoma*. 1993; 11:345-352.
80. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Kamiyama R, Hirokawa K. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN)- γ by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1997; 11:2049-2054.
81. Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Hirokawa K, Kamiyama R. Localization of Fas and Fas-Ligand in bone marrow cells demonstrating Myelodysplasia. *Leukemia*. 1998;12:486-492.
82. Kouides PA, Bennett JM. Understanding the Myelodysplastic Syndromes. *The Oncologist*. 1997;2: 389-401.
83. Kögler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fisher J, Sorg RV, Wernet P. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Experimental Hematology*. 2005; 33:573-583.
84. Kroef MJ, Fibbe WE, Mout R, Jansen RP, Haak HL, Wessels JW, Van Kamp H, Willemze R, Landegent JE. Myeloid but not lymphoid cells carry the 5q deletion: polymerase chain reaction analysis of loss of heterozygosity using mini-repeat sequences on highly purified cell fractions. *Blood*. 1993; 81:1849-1854.
85. Kuznetsov S, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form

- bone after transplantation in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12:1335-1347.
- 86.** Lataillade J.J., Clay D., Bourin P., Hérodin F., Dupuy C., Jasmin C, Le Bousse-Kerdilès M.C. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting Go/G1 transition in CD34+ cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood*. 2002;99(4)1117-1129.
- 87.** Lemieux ME, Eaves CJ. Identification of properties that can distinguish primitive populations of stromal-cell-responsive lympho-myeloid cells from cells that are stromal-cell-responsive but lymphoid-restricted and cells that have lympho-myeloid potential but are also capable of competitively repopulating myeloablated recipients. *Blood*. 1996;88:1639-48.
- 88.** Li,K., Sensebé, L., Hervé P., y Charbord P. Non transformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrow. III. The maintenance of hematopoiesis from CD34+ cell populations. *Experimental Hematology*. 1997; 25:582-591.
- 89.** Lichtman MA, Brennan JK. Myelodysplastic disorders (indolent clonal myeloid diseases and oligoblastic leukemia). En *Williams Hematology Sixth Edition*. Ed. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U. McGraw-Hill. 2001:1029-1046
- 90.** Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of cellular physiology*. 1998;178:57-66.
- 91.** Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*. 2000; 9: 841-848.
- 92.** Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science*. 2003; 10:228-241.

93. Maniatis AK, Amsel S, Mitus WJ, Coleman N. Chromosome pattern of bone marrow fibroblasts in patients with chronic granulocytic leukaemia. *Nature*. 1969;222:1278-9.
94. Martinez-Jaramillo G, Flores-Figueroa E, Sanchez-Valle E, Gutierrez-Espindola G, Gomez-Morales E, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Chavez-Gonzalez A, Alvarado-Moreno JA, Mayani H. Comparative analysis of the in vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors from patients with aplastic anemia and myelodysplasia. *Leukemia Research*. 2002;26:955-963.
95. Mayani H, Baines P, Bowen DT, Jacobs A. In vitro growth of myeloid and erythroid progenitor cells from myelodysplastic patients in response to recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Leukemia*. 1989;3:29-32.
96. Mayani H. La producción de las células sanguíneas. A treinta años del primer encuentro con las CFU-S. *Ciencia y Desarrollo*. 1992; 104:54-59
97. Mayani H, Guilbert L, Janowska-Wiwczorek. Biology of the hemopoietic microenvironment. *European Journal of Hematology*. 1992;49: 225-233.
98. Mayani H, Dragowska W. and Lansdorp PM. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood*. 1993;81:3252-3258.
99. Mayani H. Human Preleukemia: cellular, molecular and clinical aspects. *Archives of Medical Research* 1993; 4:317-325
100. Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of Medical Research* 2003; 34:3-15.
101. Mayani H. Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996; 10:1041-1047.
102. Mayer JR, Canellos GP. Primary myelodysplastic syndrome and secondary disorders. *Leukemia*. 1996. Chapter 26. Sixth edition. Saunders Company.
103. Mets T y Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1981; 16, 81-89
104. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine*. 2001;226 :507-520.

- 105.** Miura M, Miura Y, Padilla-Nash H, Molinolo A, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng J, Baker C, Chen W, Ried T, Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2005. Published online november 10.
- 106.** Monette FC, Gilio MJ, Chalifoux P. Separation of proliferating CFU from Go cells of murine bone marrow. *Cell and Tissue Kinetics*. 1974;7:443-50
- 107.** Moreau, I., Duvert, V., Caux, C., Galmiche, M.C., Charbord, P., Bancereau, J., y Saeland, S. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B lymphoid cells. *Blood*. 1993; 82:2396-2405.
- 108.** Mundle S, Iftikhar A, Shetty V, Dameron S, Wright-Quinones V, Marcus B, Loew J, Gregory S, Raza A. Novel in situ double labeling for simultaneous detection of proliferation and apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.1994; 42: 1533-1537.
- 109.** Mundle SD, Venugopal P, Cartlidge JD, Pandav DV, Broady-Robinson L, Gezer S, Robin EL, Rifkin SR, Klein M, Alston DE, Hernandez BM, Rosi D, Alvi S, Shetty VT, Gregory SA, Raza A. Indication of an involvement of Interleukine-1 β converting enzyme-like protease in intramedullary apoptotic cell death in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1996;88:2640-2647.
- 110.** Nilsson L, Astrand- Grundström I, Arvidsson I, Jacobsson B, Hellstrom-Lindberg E, Hast R, Jacobsen SEW. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q –deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. *Blood*. 2000; 96: 2012-2021.
- 111.** Nilsson L., Åstrand-Grundström I., Anderson K., Arvidsson I., Hokland P., Bryder D., Kjeidsen L., Johansson B., Hellström E., Hast R., Jacobsen S.E.W. Involvement and functional impairment of the CD34+CD38- Thy-1+ hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. *Blood*. 2002; 100: 259-267.
- 112.** Ogata K, Satoh Ch, Tachibana M, Hyodo H, Tamura H, Dan K, Kimura T, Sonoda Y, Tsuji T. Identification and hematopoietic potencial of CD45- clonal cells

- with very immature phenotype (CD45-CD34-CD38-lin-) in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem Cells*. 2005;23:619-630.
- 113.** Ohmori S, Ohmori M., Yamagishi M., Okuma M. MDS-macrophage derived inhibitory activity on myelopoiesis of MDS abnormal clones. *British Journal of Haematology* 1993; 83:388-391.
 - 114.** Olney HJ, Le Beau MM. The cytogenetics and molecular biology of myelodysplastic syndromes. En *The Myelodysplastic Syndromes. Pathobiology and clinical management*. Ed. Bennet J.M. 2002. Editorial Marcel Dekker Inc. pp: 89-109.
 - 115.** Owen M. Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium*.1988;136:42-60.
 - 116.** Padua RA, West RR. Oncogene mutation and prognosis in the myelodysplastic syndromes (MDS). *British Journal of Haematology*. 2000; 111. 873-874.
 - 117.** Parker JE, Fishlock KL, Mijovix A, Czepulkowski B, Pagliuca A, Mufti GJ. Low risk myelodysplastic syndrome is associated with excessive apoptosis and an increased ratio of pro-versus anti-apoptotic bcl-2-related proteins. *British Journal of Hematology*. 1998;103:1075-1082.
 - 118.** Piersma AH. Ploemacher RE. Brockbank KG. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *British Journal of Haematology*. 1983. 54(2):285-90.
 - 119.** Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JE, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
 - 120.** Ponchio L, Duma L, Oliviero B, Gibelli N, Pedrazzoli P, Robustelli della Cuna G. Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. *Cytotherapy*. 2000;2:281-6.
 - 121.** Prockop D. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276:71-74.
 - 122.** Quirici N, Soligo D, Bossalasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental Hematology*. 2002. 30: 783-791.

- 123.** Rafii S, Shapiro F, Rimarachin J, Nachman RL, Ferris B, Weksler B, Moore MA, Asch AS. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood*.1994;84:10-19.
- 124.** Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell. R., Ferris, G., Nachman, R.I., Moore, A.S., and Asch, A. S. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood*. 1995;86: 3353-3363.
- 125.** Rafii Shahin. Regulation of hematopoiesis by bone marrow microvascular endothelium. En *Hematopoiesis: developmental approach*. Ed Leonard I Zon. Oxford. 2001; Chapter 64: 774-783.
- 126.** Rajapaska R, Ginzton N, Rott LS, Greenberg PL, Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic marrow cells. *Blood*. 1996;88:4275-4287.
- 127.** Raza A, Gezer S, Mindle S, Gao XZ, Alvi S, Borok R, Rifkin S, Iftikhar A, Shetty V, Parcharidou, Loew J, Marcus B, Khan Z, Channey C, Showel J, Greogry S, Preisler H. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1995; 86:268-276.
- 128.** Rubio D, García-Castro J, Martín M, de la Fuente R, Cigudosa J, Lloyd A, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Research*. 2005; 65:3035-3039.
- 129.** Sánchez-Valle E. Síndromes Mielodisplásicos. *Revista de Hematología*. 2004; 5: 45-57.
- 130.** Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Ochampally R, Jian-Guo C, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*. 2002; 20:530-541.
- 131.** Shetty V, Hussaini S, Broady-Robinson L, Allampallam K, Mundle S, Borok R, Broderick E, Mazzoran L, Zorat F, Raza A. Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high-density fraction of bone marrow aspirates. *Blood*. 2000. 96:1388-1392.

- 132.** Shih-Chieh H, Nien-Jung C, Shie-Liang H, Li H, Hsiao-Li M, Wai-Hee L. Isolation and characterization of size-sieved cells from human bone marrow. *Stem Cells*. 2002;20: 249-258.
- 133.** Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991. 78:55-62.
- 134.** Singer JW, Keating A, Cuttner J, Gown AM, Jacobson R, Killen PD, Moohr JW, Najfeld V, Powell J, Sanders J. Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its in vitro microenvironment: studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia. *Leukemia Research*. 1984;8:535-545.
- 135.** Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SCh, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells*. 2004. 22:823-831.
- 136.** Soenen-Cornuu V, Tourino C, Bonnet ML, Guiller M, Flamant S, Kotb R, Bernheim A, Bourhis JH, Preudhomme C, Fenaux P, Turhan AG. Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid of chromosomal markers and support short- and long term hematopoiesis in vitro. *Oncogene*. 2005;24:2441-2448.
- 137.** Suciú s, Kuse R, Weh HJ, Hossfeld DK. Results of chromosome-studies and their relation to morphology, course, and prognosis in 120 patients with de novo myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1990; 44:15-26.
- 138.** Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH et al. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1990;87:3584–3588.
- 139.** Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine*. 1994;179:1677-82.
- 140.** Taichman RS, Emerson S.G. The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells*. 1998;16:7-15.
- 141.** Taichman RG. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005; 105:2631-2639.

142. Tang JL, Tien HF, Lin MT, Chen PJ, Chen YC. p53 mutation in advance stage of primary myelodysplastic syndrome. *Anticancer Research*. 1998;18:3757-3761.
143. Tamura S, Kanamaru A, Takemoto Y, Kakishita E, Nagai K. Clonal evolutions during long-term cultures of bone marrow from de novo acute myeloid leukaemia with trilineage Myelodysplasia and with myelodysplastic remission marrow. *British Journal of Haematology*. 1993; 84:219-226.
144. Tauro S, Hepburn MD, Peddie CM, Bowen DT, Pippard MJ. Functional disturbance of marrow stromal microenvironment in the myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2002;16: 785-790.
145. Teixido J., Hemier M.E., Greenberger J.S., Ankiesaria P. Role of $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins in the adhesion of human CD34^{hi} stem cells to bone marrow stroma. *Journal of Clinical Investigation*. 1992; 9:358-367.
146. Tennant GB, Walsh V, Truran N, Edwards P, Mills KI, Burnett AK. Abnormalities of adherent layers grown from bone marrow of patients with Myelodysplasia. *British Journal of Haematology*. 2000;111:853-862.
147. Tsopou P, Kouraklis –Symeonidis A, thanopoulou E, Ziks P, Orphanaos V, Zoumnus NC, Apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes: differential involvement of marrow cells in good versus poor prognosis patients and correlation with apoptosis-related genes. *Leukemia*. 1999; 13:1554-1563.
148. Valent A, Venuat AM, Danglot G, Da Silva J, Duarte N, Bernheim A, Bénard J. Stromal cells and human malignant neuroblasts derived from bone marrow metastasis may share common karyotypic abnormalities: the case of IGR-N-91 cell line. *Medical and Pediatric Oncology*. 2001; 36:100-103.
149. Van Kamp H., Fibbe W.E., Cansen R.P. Clonal involvement of granulocytes and monocytes, but not T or B lymphocytes and natural Killer cells in patients with myelodysplasia: analysis by x-linked restriction fragment length polymorphisms and polymerase chain reaction of the phosphoglycerate kinase gene. *Blood*. 1992; 80:1174-1780.
150. Visser JW, Van Bekkum. Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: past and present. *Experimental Hematology*. 1990;18:248-256.

151. Wallace SR, Oken MM, Lunetta KL, Panoskaltis-Mortari A, Masellis AM. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients. *Cancer*. 2001;91:1219-30.
152. Wang Y, Huso D, Harrington J, Jeong D, Turney J, McNiece I. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*. 2005;7:509-519.
153. West RR, Stafford DA, Jacobs A. Occupational and environmental exposures and Myelodysplasia- a case control study. *Leukemia Research*. 1995;19:127-
154. Weston BS, Wahab NA, Roberts T, Mason RM. Bacitracin inhibits fibronectin matrix assembly by mesangial cells in high glucose. *Kidney International*. 2001; 60:1756-1764.
155. West RR, Stafford DA, White D, Bowen DT, Padua RA. Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood*. 2000; 95:2093-2097.
156. Wetzler M, Kurzrock R, Estrov Z, Estey E, Talpaz M. Cytokine expression in adherent layers from patients with myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Leukemia Research*. 1995;19:23-34.
157. Wognum A. W., Eaves C. A., Thomas T. E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research*. 2003;34: 461-475
158. Yoder. M.C., Williams D.A. Matrix molecule interactions with hematopoietic cells. *Experimental Hematology*. 1995;23:961-967.
159. Yoshida Y. Hypothesis: apoptosis may be responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 1993; 7:144-146.
160. Yu XF, Huang YF, Collin-Osdoby P, Osdoby p. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2003;18:1404-1418.
161. Zanjani E, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34⁻ cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes living rise to CD34⁺ cells. *Experimental Hematology*. 1998; 26: 353-360.

- 162.** Zanjani E, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. Reversible expresión of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*. 2003; 31:406-412.
- 163.** Zhang W, Knieling G, Vohwinkel G, Martinez T, Kuse R, Hossfeld DK, Duhrsen U. Origin of stroma cells in long-term bone marrow cultures from patients with acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*. 1999;78:305-314.
- 164.** Zhu GR, Zhou XY, Lu H, Zhou JW, Li AP, Xu W, Li JY, Wang CY. Human bone marrow mesenchymal stem cells express multiple hematopoietic growth factors. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2003; 11:115-119.
- 165.** Zohar R, Sodek J, McCulloch AG. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood*. 1997.90:3471-3481
- 166.** Zucker-Franklin, D., Stahl, C., and Hyde, P. Megakaryocyte ultraestructre. Its relationship to normal and pathologic thrombocytopoiesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987; 509:25-33.

Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization

Eugenia Flores-Figueroa^a, Rosa Maria Arana-Trejo^b, Guillermo Gutiérrez-Espíndola^c, Adrián Pérez-Cabrera^b, Hector Mayani^{a,*}

^a *Oncological Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico*

^b *Department of Genetics, Mexico City General Hospital, Faculty of Medicine, UNAM, Mexico*

^c *Department of Hematology, Bernardo Sepulveda Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City, Mexico*

Received 14 January 2004; accepted 22 June 2004

Abstract

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) have been defined as primitive, undifferentiated cells, capable of self-renewal and with the ability to give rise to different cell lineages, including adipocytes, osteocytes, fibroblasts, chondrocytes, and myoblasts. MSC are key components of the hematopoietic microenvironment. Several studies, including some from our own group, suggest that important quantitative and functional alterations are present in the stroma of patients with myelodysplasia (MDS). However, in most of such studies the stroma has been analyzed as a complex network of different cell types and molecules, thus it has been difficult to identify and characterize the cell(s) type(s) that is (are) altered in MDS. In the present study, we have focused on the biological characterization of MSC from MDS. As a first approach, we have quantified their numbers in bone marrow, and have worked on their phenotypic (morphology and immunophenotype) and cytogenetic properties. MSC were obtained by a negative selection procedure and cultured in a MSC liquid culture medium. In terms of morphology, as well as the expression of certain cell markers, no differences were observed between MSC from MDS patients and those derived from normal marrow. In both cases, MSC expressed CD29, CD90, CD105 and Prolyl-4-hydroxylase; in contrast, they did not express CD14, CD34, CD68, or alkaline phosphatase. Interestingly, in five out of nine MDS patients, MSC developed in culture showed cytogenetic abnormalities, usually involving the loss of chromosomal material. All those five cases also showed cytogenetic abnormalities in their hematopoietic cells. Interestingly, in some cases there was a complete lack of overlap between the karyotypes of hematopoietic cells and MSC. To the best of our knowledge, the present study is the first in which a pure population of MSC from MDS patients is analyzed in terms of their whole karyotype and demonstrates that in a significant proportion of patients, MSC are cytogenetically abnormal. Although the reason of this is still unclear, such alterations may have an impact on the physiology of these cells. Further studies are needed to assess the functional integrity of MDS-derived MSC.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Cytogenetics; Mesenchymal; Microenvironment; Myelodysplasia; Stroma

1. Introduction

Since the pioneer work by Wolf and Trentin [1], it has been clearly recognized that the hematopoietic microenvironment (HM) plays a key role in the physiology of the

hematopoietic system. Such a microenvironment regulates, via the production and secretion of cytokines and extracellular matrix molecules, the formation of blood cells both in vivo and in vitro [2,3]. Mesenchymal stem cells (MSC), in turn, are key components of the HM [4]. MSC were first described by Friedenstein et al. as bone marrow-derived adherent, non-phagocytic cells, capable of generating connective tissue when transplanted into mice [5], and able to produce colonies of fibroblasts in vitro [6]. Subsequent work by Owen suggested that MSC have the ability to self-renew and

* Corresponding author. Present address: Tallo 2, D-102, San Pablo Tepepetlapa, Coyoacan, Mexico, DF 04620, Mexico. Tel.: +52 55 5627 6959; fax: +52 55 5761 0952.

E-mail address: hmayaniv@prodigy.net.mx (H. Mayani).

to give rise to different cell lineages, including adipocytes, osteocytes, fibroblasts and chondrocytes [7]. More recently, evidence has been presented indicating that MSC can also give rise to myoblasts and neural cells [8,9].

Research on MSC is rapidly expanding, not only in terms of the characterization of their biological properties, which is important for our understanding of the biology of the HM, and hematopoiesis itself, but also towards their potential use in the development of both gene and cellular therapies for the treatment of a wide variety of human diseases [10,11]. It is noteworthy, however, that there are two major points of controversy within the field of MSC biology, particularly in regards to their role in hematopoiesis. The first one relates to their origin; some evidence has been presented indicating that MSC and hematopoietic stem cells arise from a common progenitor [12–15]; reports by others, however, suggest that both lineages derive from totally independent progenitors [16]. The second point relates to their possible involvement in the origin and/or progression of certain hematological disorders. Indeed, there is contrasting information on whether certain mesenchymal elements (i.e., fibroblasts) are altered, in their levels and/or function, in specific hematological disorders and such alterations may contribute to the progression of the disease [17–20].

The myelodysplastic syndromes (MDS) comprise a heterogeneous group of hematological disorders characterized by peripheral blood cytopenias, morphological dysplasias, impaired hematopoietic differentiation, and a high risk of transformation into acute myeloid leukemia (AML; [21]). MDS is a potentially fatal hematological neoplasia whose incidence has significantly increased during the last three decades, especially among people >50 years of age [22].

Interestingly, during the last few years MDS has emerged as a suitable model for the study of MSC. The reason is a two-fold. On the one hand, it has been observed that at the time of diagnosis, recurring chromosomal abnormalities are found in 40–70% of patients with primary MDS and in 95% of patients with therapy-related MDS [23]; thus it is theoretically possible to study the clonal origin of certain cell lineages based on genetic (chromosomal) markers. On the other hand, evidence exist that microenvironment cells from MDS marrow show qualitative and functional abnormalities *in vitro*, which may be relevant to the pathogenesis of such a disorder [24–27]. Thus, characterization of MDS-derived MSC may be important in our understanding of the biology of this disease and may also contribute to the development of novel therapies.

In this context, in the present study we have worked on the characterization of MSC from patients with MDS. As a first approach, we have quantified their numbers in bone marrow, and have focused on their phenotypic (morphology and immunophenotype) and cytogenetic properties. Our results show that although no significant differences were observed between MDS- and normal marrow-derived MSC in terms of their numbers or phenotype, cytogenetic alterations were de-

tected in MSC from some MDS patients. These abnormalities may have implications in their biology.

2. Materials and methods

2.1. Bone marrow samples

Bone marrow cells, collected according to institutional guidelines, were obtained from 11 adult MDS patients at the *Bernardo Sepulveda* Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City. Diagnosis was established by BM aspirate smears, BM biopsy, cytogenetic analyses and peripheral blood count criteria, according to the French–American–British (FAB) group [28]. All the patients were diagnosed as having refractory anemia (RA). None of the patients had received cytotoxic drugs during the preceding 3 months. Sixty six percent of the patients were females and the age range of the whole group was 17–80 years (median 52 years). Cytogenetic analysis was performed in all 11 patients; in seven cases (63%) chromosomal abnormalities were observed. As controls, normal bone marrow samples were obtained from five hematologically normal bone marrow transplant donors (18–42 years old), at the *Bernardo Sepulveda* Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City.

2.2. Isolation of mononuclear cells (MNC)

Buffy coat cells from MDS and normal marrow were obtained by centrifugation ($400 \times g$ for 7 min) and low-density MNC (<1.007 g/ml) were obtained using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Cells were then resuspended in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; StemCell Technologies Inc. [STI], Vancouver, BC, Canada). Total number of nucleated and viable cells were determined with a hemocytometer, using Turck's solution and trypan blue stain, respectively.

2.3. Isolation of MSC

In order to obtain a macrophage-free cell population enriched for MSC, a negative selection procedure (RosetteSep™ System; STI) was performed, according to the manufacturer's protocol. Briefly, we added 50 μ l Mesenchymal Cell Enrichment Cocktail (that includes monoclonal antibodies against the following antigens: CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b and Glycophorin A) per ml of non-diluted bone marrow aspirate. The sample was incubated for 20 min at room temperature, and then diluted with PBS containing 2% FBS (STI) and 1 nM EDTA. Afterwards, the diluted sample was layered on top of Ficoll-density medium (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and centrifuged for 25 min at $300 \times g$. The plasma interface was washed with PBS containing 2% FBS and 1 mM EDTA.

2.4. MSC adherent layers

The cells obtained after negative selection were re-suspended in a mesenchymal cell specific medium (MesenCult™; STI) containing MSC stimulatory supplements (STI) in a six well culture plate (Corning, Inc. Costar, New York, USA) at a concentration of $20\text{--}100 \times 10^5$ cells/well. After 4 days the non-adherent cells were removed by pipetting and fresh medium was added. Every 5 days, medium change was performed. When the cultures reached 80% confluence, they were trypsinized (0.05% Trypsin–0.53 mM EDTA; Gibco BRL®, New York, USA) and subcultured at 1×10^5 cells/75 cm² flask (Corning). At the second passage, cells were harvested and analyzed.

2.5. Fibroblast colony-forming unit (CFU-F) assay

Bone marrow-derived CFU-F were assayed according to the method described by Castro-Malaspina et al. [29]. We inoculated either 1.5×10^5 MNC/ml or $1\text{--}5 \times 10^4$ MSC in 35 mm petri dishes, containing 2 ml of MesenCult™ medium containing MSC stimulatory supplements. The cultures were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. After 3 days, the non-adherent cells were removed and the medium was changed. The cultures were returned to the incubator for a further 7 days. At the end of the period, the medium was discarded and the adherent cells were stained with Wright-Giemsa. Clones of >50 cells were scored as CFU-F.

2.6. Multipotent hematopoietic progenitor (CFU-GEMM) assay

Multipotent hematopoietic progenitor cells capable of forming mix colonies in vitro (CFU-GEMM) were assayed as previously described by our group [30]. Briefly, 1×10^5 MNC from the bone marrow aspirate on day zero were plated in methylcellulose-based semisolid cultures (MethoCult™; STI). The culture medium consisted of 0.9% methylcellulose, 30% FBS, 1% bovine serum albumin, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamin, 50 ng/ml rhSCF, 10 ng/ml rhIL-3, 10 ng/ml rhGM-CSF and 3 U/ml Epo. The cultures were incubated at 37 °C in an atmosphere at 5% CO₂ in air. After 14–17 days of culture, colonies were scored using an inverted microscope. The CFU-GEMM colonies were distinguished by their large size and their myeloid and erythroid cell content.

2.7. Morphological and cytochemical analysis

The morphology of MSC was examined every week under a phase-contrast microscope to identify structural differences (if any) between MDS and normal MSC layers. Cells were also grown on a chamber slide system (Nalgene Nunc International, Denmark) and stained with Wright-Giemsa (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO) for analysis under a light microscope. The cytochemistry analysis was performed on cells

growing on a chamber slide system; alkaline phosphatase expression was determined using naphthol AS-biphosphate as substrate, as previously described [31].

2.8. Cell surface antigen analysis

Analysis of cell surface molecules was performed on passage-two cultures of MSC using flow cytometry and immunocytochemistry. Harvested cells were washed with PBS containing 5% FBS. A total of 2×10^5 cells were suspended in 0.5 ml of PBS containing 2% FBS, and incubated for 30 min on ice in the dark with one or two of the following monoclonal antibodies (MoAbs): anti-CD14-PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), anti-CD29-FITC (Caltag Laboratories), anti-CD90-FITC (Immunotech, Marseille, France), and anti-CD105-PE (Caltag Laboratories). Cells incubated with their corresponding isotype control (Caltag Laboratories) were also included. The labeled cells were analyzed on a Coulter Epics Altra Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA) by collecting a minimum of 10,000 events.

Immunocytochemistry was performed directly on cells growing on a chamber slide system (Nalgene Nunc International) for cell surface antigen analysis. The antigen staining was performed with the super sensitive immunodetection system® (BioGenex, San Ramon, CA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, after reaching 60% confluence, cells were washed and fixed with cold acetone for 10 min, and then incubated for 30 min in a humidified chamber with anti-CD34 (DAKO, Carpinteria, CA) or anti-CD68 (DAKO). Prolyl-4-hydroxylase – an intracellular enzyme critical to the process of collagen biosynthesis – was also detected in this manner (using an anti-prolyl-4-hydroxylase antibody from DAKO).

2.9. Cytogenetic analysis

Hematopoietic cell karyotype was performed as previously described [32]. Briefly, bone marrow cells were collected in a sodium heparinized syringe and processed by direct technique and cultured for 48 or 72 h in RPMI 1640 medium with no mitotic stimulants. Chromosomes were identified by trypsin-giemsa banding. Whenever possible, we analyzed at least 15 metaphases from each sample. For MSC, second passage mesenchymal cell layers were trypsinized and subcultured on slides in RPMI 1640 medium. Chromosomes were also identified by trypsin-giemsa banding. Whenever possible, we analyzed at least 15 metaphases from each sample.

2.10. DNA analysis

To determine the DNA content of MSC from normal donors and MDS patients, second passage MSC layers ($0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ cells) were trypsinized (0.5% Trypsin–0.53 mM EDTA) and washed with PBS. The cells were centrifuged and the cell pellet fixed in 80% ice cold ethanol

(Sigma Diagnostics Inc.) at -20°C . Cells were then centrifuged, washed and resuspended in PBS, followed by incubation with 40 U/ml ribonuclease (Sigma Diagnostics Inc.) for 15 min at room temperature. The cells were incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (PI; Sigma Diagnostics Inc.) for 30 min and kept at 4°C in the dark until measured. The PI fluorescence of individual nuclei was measured using a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Histogram analyses were performed using the Cell Quest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

2.11. Statistics

Statistical analysis was performed by using the Student's *t*-test.

3. Results

3.1. Frequency of MSC

We first determined the frequency of MSC in the fraction of bone marrow MNC. The frequency of these cells in normal subjects was around 1 per 31,000 MNC. In MDS marrow, their frequency (1 per 17,000 MNC) was not statistically different from that in normal marrow. In trying to compare the frequency of MSC with that of primitive hematopoietic progenitors, we determined the frequency of CFU-GEMM in the same marrow samples. Interestingly, MSC frequencies in normal and MDS marrow were similar to those of CFU-GEMM in marrow from normal subjects (1 CFU-GEMM per 29,000 MNC); in contrast, the frequency of CFU-GEMM was extremely reduced (1 per 454,000 MNC) in MDS patients. This latter result was clearly expected based on previous studies by our own group and by others [33,34].

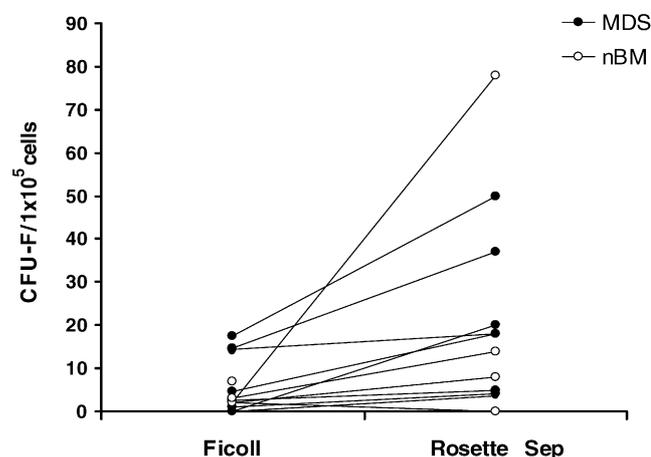


Fig. 1. Relative levels of fibroblastic progenitors (CFU-F) present in bone marrow-derived mononuclear cell (MNC) fractions and in MSC-enriched cell fractions obtained by the RosetteSepTM System from each normal subject (nBM; $n = 5$) and MDS patient ($n = 9$).

In trying to make more efficient our procedure for MSC isolation and to reduce the presence of macrophages in such cultures, we compared the CFU-F content in marrow samples that were enriched for MSC by the *RosetteSep* System versus bone marrow MNC isolated by the standard Ficoll-based procedure. Invariantly, the CFU-F content in MSC-enriched samples was significantly higher than in MNC fractions (Fig. 1). Although there was some variability in the actual numbers of CFU-F, such a number in normal marrow samples was six-fold (1- to 39-fold) higher in MSC-enriched fractions than in MNC, whereas in MDS samples, the increase corresponded to a mean of three-fold (1.2- to 20-fold). No differences in the morphology of the fibroblast colonies were observed in cultures established with any of these two methods; however, it is noteworthy that there were clearly less macrophages in the MSC-enriched fractions than in MNC. Based on the above results, we used the *RosetteSep* system throughout this study.

3.2. Development of MSC layers

MSC layers were established as described in Section 2. For normal marrow samples, confluent MSC layers were obtained in all five cases; for MDS, on the other hand, confluent MSC layers were observed in 9 out of 11 samples. It is noteworthy that whereas in all five control cultures confluence was reached by day 14, only five (55%) of MDS cultures were confluent by day 14; the other four cultures reached confluence by day 21. In all control and MDS cultures, MSC layers appeared as a well-defined population, consisting of fibroblast-like, spindle-shaped cells; no macrophages or hematopoietic cells were observed (Fig. 2A). Interestingly, among the cells developed in MSC cultures, two morphologically distinguishable types were identified: a subpopulation of very thin, spindle-shaped cells (which comprised $>95\%$ of the total adherent cells), and a rare subpopulation of thick, granular cells (Fig. 2B).

3.3. Phenotypic analysis of MSC

In order to characterize the phenotype of MSC from MDS patients we focused on the expression of certain well-recognized cell markers which were analyzed by immunocytochemistry, cytochemistry and flow cytometry. Our analyses revealed a wide expression of prolyl-4-hydroxylase (Fig. 2C; Table 1). Alkaline phosphatase, on the other hand, was expressed at low levels in less than 10% of the cells (Fig. 2D; Table 1). It is noteworthy that no significant differences were observed between control and MDS cells. By immunocytochemistry studies we confirmed the absence of macrophages, since no CD68-positive cells were detected; similarly, no expression of CD34 was observed (Table 1).

The expression of different cell surface molecules, including CD14, CD29, CD90 and CD105, was determined by flow cytometry. As shown in Fig. 3, MSC from normal and MDS marrow showed virtual absence of CD14, which is consistent

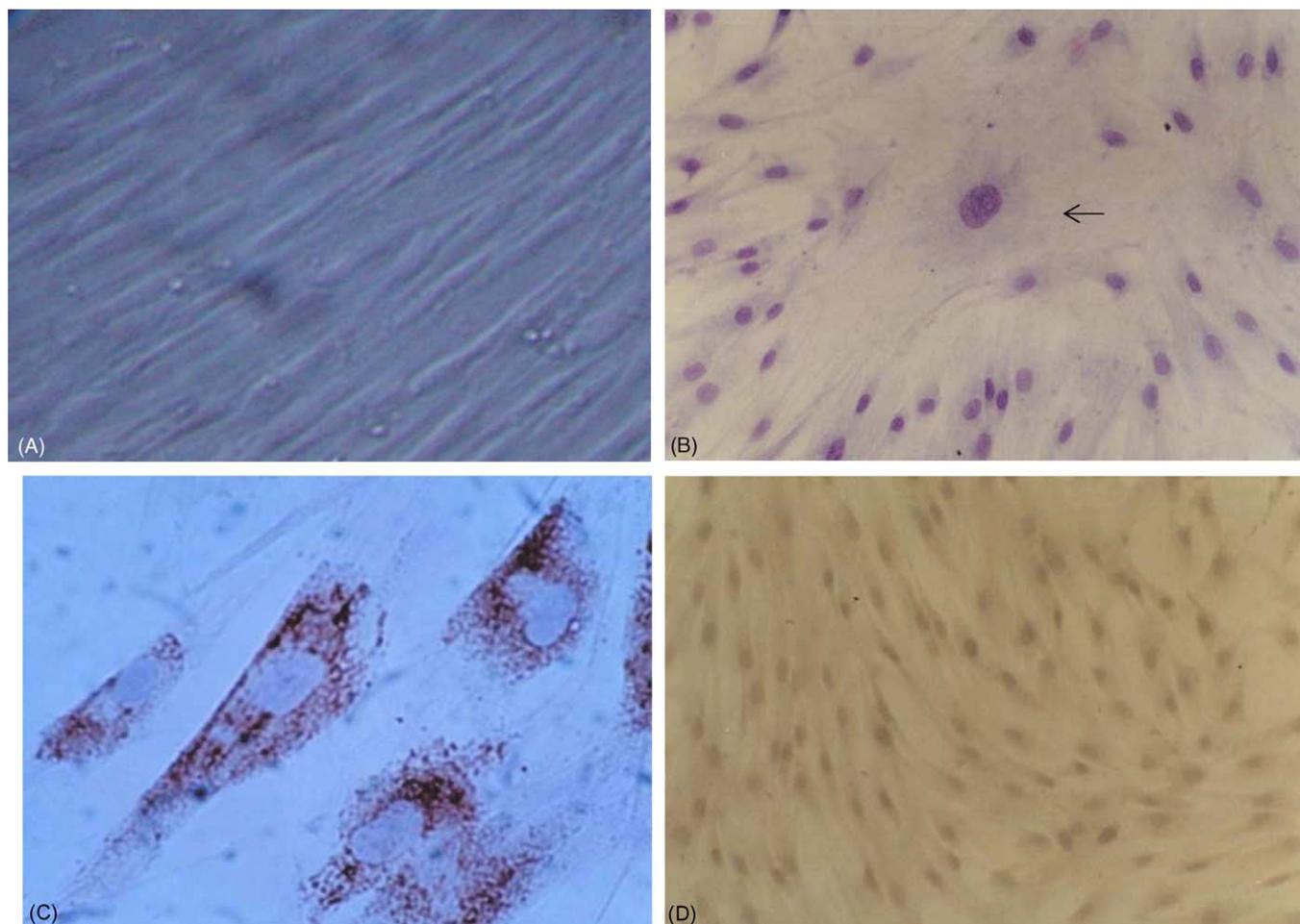


Fig. 2. Bone marrow-derived MSC developed in culture. (A) Appearance under the inverted microscope of a mesenchymal cell layer (100 \times) from a MDS marrow at second passage. (B) MDS-derived mesenchymal cells stained with Wright-Giemsa. Two morphologically distinct cell subpopulations are evident: small, thin, spindle-shaped cells, that comprise >95% of the total adherent cells, and large, thick, granular cells (arrow). (C) Expression of prolyl-4-hydroxylase by MDS mesenchymal cells, as demonstrated by immunocytochemistry. (D) Lack of expression of alkaline phosphatase by MDS mesenchymal cells, as demonstrated by cytochemistry.

with the absence of macrophages demonstrated by morphology and lack of CD68 expression. In contrast, expression of CD29 (β 2 integrin), CD90 (Thy-1) and CD105 (SH2, endoglin) was clearly evident both in normal- and MDS-derived MSC (Fig. 3; Table 1).

Table 1
Cell marker expression by MSC from normal subjects and MDS patients

Marker	Normal BM ($n = 5$)	MDS ($n = 9$)
CD14	–	–
CD29	+	+
CD34	–	–
CD68	–	–
CD90	+	+
CD105	+	+
Prolyl-4-hydroxylase	+	+
Alkaline phosphatase	–	–

Expression of cell markers was determined by cytochemistry (alkaline phosphatase), immunocytochemistry (CD34, CD68, and prolyl-4-hydroxylase) and flow cytometry (CD14, CD29, CD90, and CD105).

3.4. Karyotype analysis

Karyotype analysis was performed both in hematopoietic cells and MSC from all five normal samples. For MDS patients, karyotype analysis of hematopoietic cells was performed in all 11 cases; in contrast, cytogenetic analysis of MSC was performed in only nine cases (those in which a confluent adherent layer was developed). As expected, no chromosomal abnormalities were detected in either hematopoietic cells or MSC from any of the normal donors (Fig. 4). In MDS patients, on the other hand, cytogenetic alterations were observed in hematopoietic cells from 7 out of 11 patients (63%; Table 2). This finding is in keeping with previous reports indicating that a significant proportion of MDS patients show cytogenetic alterations [23]. In some cases, the chromosomal alterations observed were unusual and extremely complex, which correlate with the fact that chromosomal abnormalities involving virtually every chromosome have been noted in marrow cells from some MDS patients [23]. Interestingly,

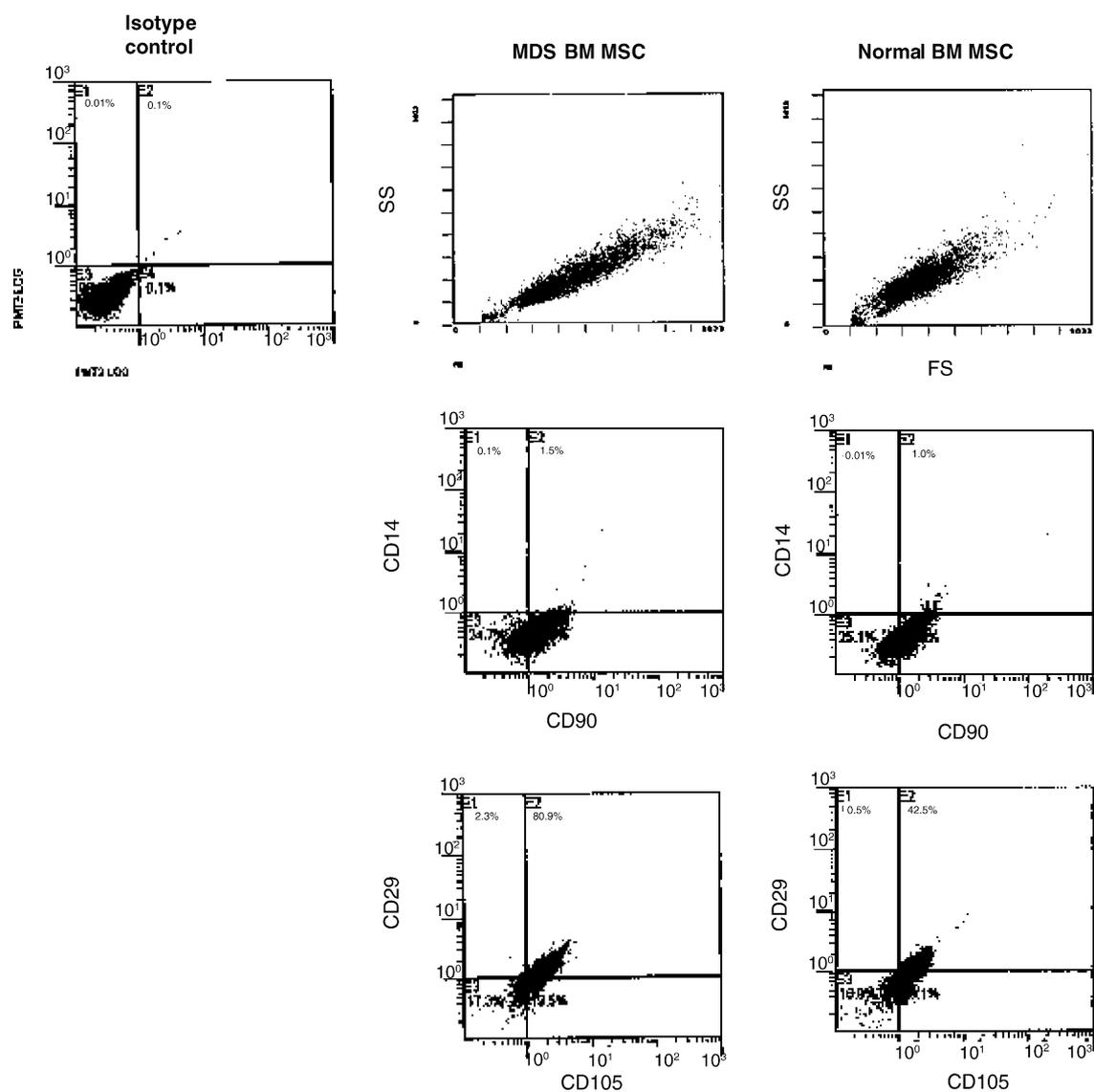


Fig. 3. Flow cytometry analysis of the expression of CD14, CD29, CD90 and CD105 by bone marrow (BM)-derived mesenchymal stem cells from normal subjects and MDS patients.

Table 2

Cytogenetic analysis of bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells from MDS patients

	Hematopoietic cells	Mesenchymal cells
MDS 1	46,XX,del(5q)(q31–34)[8]/46,XX[15]	45,XO[3]/40,XX,-10,-12,-14,-15,-16,-19[3]
– 2	Hypodiploidy(35–45 chromosomes)[8]/46,XY[10]	ND
– 3	43,XX,-5,-8,-20[5]/40,XX,-3,-5-12,-14,-16,-22,[3]/46,XX[10]	40,XO,-3,-12,-14,-16,-17[5]/40,XO,-3,-12,-14,-16,-17,-22[1]/46,XX[10]
– 4	48,XY,+8,+22[5]/46,XY[25]	46,XY[12]
– 5	46,XX,del(7)(q33)[5]/48-52,idem,+3,+12,+16,+20,+21,+22[8]/46,XX[15]	Hypotripleidy (58–68 chromosomes)[5]/46,XX[15]
– 6	46,XX[30]	46,XX[19]
– 7	46,XY[17]	46,XY[7]
– 8	46,XX,t(2;20)(p12;p12)[6]/46,XX[12]	44,XX,-1,-20[4]/42,XX,-2,-10,-13,-20[5]/40,XX,-1,-2,-10,-13,-19,-20[2]
– 9	46,XX[20]	ND
– 10	46,XY[22]	46,XY[8]
– 11	48-54,XXX,+1,+4,+5,+7,+10,+12,+18[10]/46,XX[18]	40,XX,-5,-8,-11,-13,-17,-22[4]/38,XX,-3,-5,-12,-17,-19,-20,-21,-22[1]/35,XX,-3,-5,-8,-10,-12,-15,-17,-19,-20,-21,-22[1]/46,XX[5]

Karyotypes were determined as previously described [32]. [n] is the number of metaphases that showed a particular karyotype. ND: not determined since no MSC layers were developed.

abnormal karyotypes were observed in MSC from five of the nine patients that developed a confluent cell layer (Table 2; Fig. 4).

It is noteworthy that all patients with normal karyotypes in their hematopoietic cells showed normal karyotypes in their MSC (patients 6, 7, and 10 in Table 2). On the other hand, except for one patient (patient 4), all patients with abnormal karyotypes in their hematopoietic cells showed chromosomal alterations in their MSC (patients 1, 3, 5, 8, and 11). Patient 4 showed cytogenetic alterations in his hematopoietic cells but his MSC were cytogenetically normal (Table 2).

3.5. DNA content

To further expand the results obtained by karyotype analysis, we determined the DNA content in MSC from normal (three samples) and MDS (patients 1, 3, 8, and 11 in Table 2) marrow. As expected, all normal marrow samples showed a normal DNA content, i.e., no hypodiploid or hyperdiploid cells were detected (Fig. 4). On the other hand, MSC from all MDS patients analyzed showed the presence of hypodiploid cells (Fig. 4).

3.6. Discussion

During the last few years, a great deal of interest has been generated around MSC. This has been not only because of their biological properties, including their capacity to give rise to different mesenchymal cell types (e.g., fibroblasts, adipocytes, chondrocytes, etc.; 7–10), but also because of their imminent use in cellular therapy protocols for a variety of human disorders [10,11].

Several studies reported in the last decade, including some from our own group, suggest that important quantitative and functional alterations are present in the stroma of patients with myelodysplasia [24–27]. However, in most of such studies the stroma has been analyzed as a complex network of different cell types and molecules, thus it has been difficult to identify and characterize the cell(s) type(s) that is(are) altered in MDS [35].

In the present study, we have focused on the biological characterization of MSC from MDS. As mentioned previously, MDS comprises clinically different hematological disorders, thus, in order to keep our population of study as homogeneous as possible all patients included here were adults,

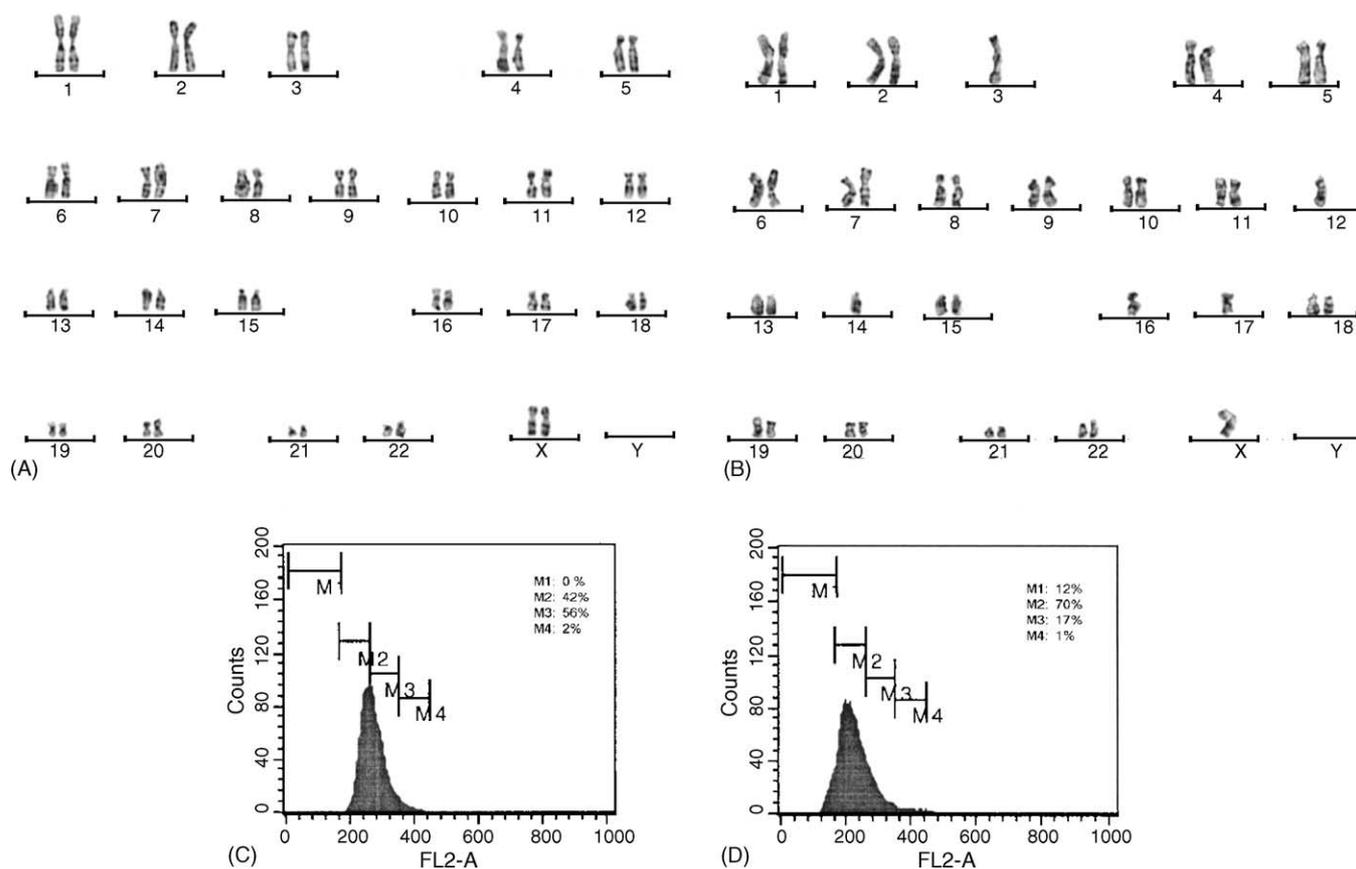


Fig. 4. Representative karyotypes of marrow-derived MSC from a normal subject (A) and a MDS patient (B). Note severe cytogenetic abnormalities (i.e., loss of several chromosomes) in MDS cells. Karyotype findings were confirmed by flow cytometry analysis of the DNA content in normal (C) and MDS (D) MSC. For these experiments, normal fibroblasts were used as controls in order to establish the M1–M4 gates, to indicate the presence of hypodiploid (M1), diploid (M2), cells in S-phase (M3) and hyperdiploid (M4) cells. Data in A and C are from the same normal subject and data in B and D from the same MDS patient (patient 3 in Table 2).

not taking cytotoxic drugs at the moment of the study, and diagnosed as having refractory anemia.

Throughout the present study, we enriched for MSC by using a method based on a negative selection (RosetteSepTM System; STI), followed by a culture period using a MSC liquid culture medium (MesenCultTM; STI). The results obtained in this manner were superior to those obtained by the standard Ficoll-based procedure, since a 2- to 39-fold increase in CFU-F numbers was observed with the former system, as compared to the latter. These results are of potential relevance considering that in most studies reported to date, Ficoll- or Percoll-based gradients are used to obtain MNC and then enrich for MSC [8,36–38]. Some groups have enriched for MSC by positive selection using specific monoclonal antibodies, such as STRO-1 and anti-nerve growth factor receptor [39,40]. In the study by Gronthos and Simmons [39], a nine-fold enrichment of MSC was observed in STRO-1⁺ cells as compared to MNC fractions. In the study by Quirici et al. [40], on the other hand, the enrichment was even greater (61-fold, as compared to MNC). Based on these reports, it seems that the method described here (negative selection) may be as efficient as the positive selection methods described above.

It is interesting that the relative number of MSC in the MNC fraction of normal subjects (3–8 MSC/10⁵ MNC) was similar to the number of multipotent hematopoietic progenitors (1–10 CFU-GEMM/10⁵ MNC). The relative numbers of MSC within the MNC fraction of MDS patients were similar to those in normal samples, which is in keeping with our previous studies [25]. In contrast, CFU-GEMM levels in MDS were significantly lower than in normal; this is also in keeping with previous reports [30,33,34]. Both observations support the notion that in MDS important quantitative alterations exist within the hematopoietic system whereas the microenvironment compartment shows normal levels of stromal cells.

In our MSC cultures, both from normal and MDS marrow, we observed the presence of two morphologically distinct cell types: a subpopulation of very thin, spindle-shaped cells, which comprised >95% of the total adherent cells, and a rare subpopulation of thick, granular cells. We did not attempt to characterize these cell subpopulations, however, our observation is in keeping with that by Prockop's group, who also found two morphologically distinct types of mesenchymal cells in bone marrow from normal subjects, i.e., large, slowly replicating cells and spindle-shaped, rapidly replicating cells [38,41]. Interestingly, these authors also described the presence of very small cells that very rapidly replicate. Such cells also had a greater capacity for multilineage differentiation.

In terms of immunophenotype, our results show that the MSC developed in our culture system express CD29, CD90, CD105 and prolyl-4-hydroxylase, whereas they lack the expression of CD14, CD34, CD68 and alkaline phosphatase. Except for CD90, which was expressed at higher levels in normal cells, no significant differences in antigen expression were observed between normal- and MDS-derived MSC. Such an antigen profile is in keeping with those described

by other groups. Indeed, several studies have demonstrated that MSC lack the expression of hematopoietic antigens such as CD14, CD33, CD34, CD45 and CD68, among others, whereas they do express CD29, CD44, CD90, CD105, CD106 and prolyl-4-hydroxylase [8,38,42–44].

Probably the most relevant finding derived from the present study was the fact that in a significant proportion of MDS patients, MSC developed in culture showed chromosomal abnormalities. Indeed, complex abnormal karyotypes – usually involving the loss of chromosomal material – were observed in five of the nine patients in which MSC cultures were established. These observations were in agreement with a subnormal (hypodiploid) DNA content in such cells, as determined by flow cytometry. It is noteworthy that in three out of those five cases, cells with non-altered karyotypes were also observed, thus indicating the coexistence of cytogenetically normal and abnormal MSC in individual patients.

In contrast, MSC cultures from all five normal marrow samples showed no chromosomal alterations. This is in keeping with previous reports indicating that MSC from normal bone marrow are cytogenetically normal [8,36]. It is noteworthy that the cytogenetic abnormalities in MDS-derived MSC were found only in those patients that also presented with cytogenetic alterations in their hematopoietic cells.

The presence of cytogenetic abnormalities in stromal cells from patients with hematological neoplasias is a controversial issue. Some reports indicate that stromal cells from MDS patients are devoid of chromosomal abnormalities and that they are functionally normal [45,46]. Others, on the other hand, have presented evidence suggesting that in certain cases, MDS stromal cells show chromosomal alterations [47,48]. Such discrepancies could be explained, at least in part, by differences in the experimental approaches and methodologies used by the different groups. In most studies, the stromal cells consisted of both macrophages and fibroblasts, thus, the possibility of “contamination” with hematopoietic cells cannot be ruled out. In the studies by Awaya et al. [45] and by Soenen et al. [46] in which FISH was used to look for specific cytogenetic alterations (e.g., deletion of 5q, +8, –7, deletion of MLL, etc.), the authors were unable to find those particular abnormalities in MSC. In those studies, however, the investigators did not analyze the cells' karyotype as a whole, so that it is not clear whether other chromosomal alterations were present in such cells. It is also noteworthy that the above mentioned studies included small numbers of patients, so that no general conclusions could be obtained.

To the best of our knowledge, the present study is the first in which a pure population of MSC from MDS patients is analyzed in terms of their whole karyotype and demonstrates that in a significant proportion of patients, MSC are cytogenetically abnormal. It is noteworthy that in those cases with chromosomal alterations, the karyotypes observed showed complex abnormalities which, in some cases, were totally different from those observed in their hematopoietic counterparts. The reason for this is not clear, however, one possible explanation is that the same agent that caused the initial

genetic damage in hematopoietic cells (radiation exposure, aromatic compounds, viruses, etc.) also affected MSC, although inducing different alterations. As a result of deficiencies in the DNA repair system, centrosome replication and genetic instability [49], both hematopoietic cells and MSC developed complex, yet different, chromosomal alterations. Based on this, our results cannot be considered as evidence that in MDS, MSC are derived from the neoplastic clone; however, at this moment, such a possibility should not be ruled out, since it is possible that hematopoietic stem cells and MSC shared a common genetic alteration that was undetectable by cytogenetic analysis.

The possibility that the chromosomal alterations observed in MSC might have arisen *in vitro* should also be considered. Unfortunately, we did not assess the cytogenetic status of MSC before and after several weeks of culture, thus, at the moment, we are unable to respond to this issue. It is noteworthy, however, that other groups have reported that MSC from normal bone marrow cultured for several weeks, retain a normal karyotype even after 40 cell doublings or at passage 12 [8,36,50]. Nevertheless, the possibility of chromosomal alterations produced in culture cannot be ruled out, especially for MSC from hematological disorders, since they might be more prone to such alterations.

It is important to mention that there was a considerable difference in the age of normal individuals and MDS patients included in this study. Some authors have demonstrated that CFU-F numbers and proliferation capacity do not vary significantly with age [51]. Thus, such an age difference may have nothing to do with our results. This, however, is still an open issue.

In summary, in the present study we have established cultures of bone marrow MSC from MDS patients, and demonstrated that these cells are morphologically and phenotypically similar to their normal counterparts. Interestingly, in a significant proportion of patients that presented with chromosomal alterations in their hematopoietic cells, MSC also showed cytogenetic abnormalities. Although the reason of this is still unclear, such alterations may have an impact on the physiology of these cells. Further studies are needed to assess the functional integrity of MDS-derived MSC.

Acknowledgements

This study was supported by grant no. FP-2003/204 from the Mexican Institute of Social Security (IMSS, Mexico), grant no. 30945M from the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico) and grant no. FP-0313 from Fundación Miguel Alemán (Mexico). We would like to thank Dr. Alejandro Zentella (UNAM) for his help in the analysis of the DNA content and Mónica Reynoso, BSc (IMSS) for her help in the flow cytometry analysis of cell markers. Eugenia Flores-Figueroa was the recipient of a Graduate Studies Scholarship from CONACYT and the IMSS. *Contribution.* E. Flores-Figueroa contributed to the

concept and design, interpreted and analyzed the data, provided drafting of the article, and gave final approval. R.M. Arana-Treio and G. Gutierrez-Espindola interpreted and analyzed the data, gave final approval, and provided study materials/patients. A. Perez-Cabrera gave final approval, collected and assembled the data. H. Mayani contributed to the concept and design, interpreted and analyzed the data, provided drafting of the article, provided critical revisions and important intellectual content, and gave final approval.

References

- [1] Wolf NS, Trentin J. Effects of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. *J Exp Med* 1968;127:205–14.
- [2] Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;49:225–33.
- [3] Charbord P. Microenvironmental cell populations essential for the support of hematopoietic stem cells. In: Zon LI, editor. *Hematopoiesis: A Developmental Approach*. Oxford University Press; 2001. p. 691–701.
- [4] Simmons PJ. The development of stromal cells. In: Zon LI, editor. *Hematopoiesis: A Developmental Approach*. Oxford University Press; 2001. p. 718–26.
- [5] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230–47.
- [6] Friedenstein AJ. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2:83–92.
- [7] Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:63–76.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–7.
- [9] Prockop D. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71–4.
- [10] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875–84.
- [11] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309–16.
- [12] Singer J, Keating A, Cuttner J, et al. Evidence for a stem cell common to hematopoiesis and its *in vitro* microenvironment: studies of patients with clonal hematopoietic neoplasia. *Leuk Res* 1984;8:535–41.
- [13] Huss R, Hong DS, McSweeney PA, et al. Differentiation of canine bone marrow cells with hemopoietic characteristics from an adherent stromal cell precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:748–52.
- [14] Zhan W, Knieling G, Vohwinkel G, Martinez T, Kuse R, Hossfeld DK, Dürhsen U. Origin of stroma cells in long-term bone marrow cultures from patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 1999;78:305–24.
- [15] Huss R, Moosman S. The co-expression of CD117 and osteocalcin in activated bone marrow stem cells in different diseases. *Br J Haematol* 2002;118:305–12.
- [16] Maniatis AK, Amsel S, Mitos WJ, Coleman N. Chromosome pattern of bone marrow fibroblasts in patients with chronic granulocytic leukemia. *Nature* 1969;1278–9.
- [17] Mayani. Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1041–7.
- [18] Dürhsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann Hematol* 1996;73:53–70.
- [19] Wallace SR, Oken MM, Lunetta KL, Panoskaltzis-Mortari A, Masellis AM. Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients. *Cancer* 2001;91:219–30.

- [20] Deeg HJ, Beckham C, Loken MR, Bryant E, Lesnikova M, Shulman HM, Golley T. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2000;37:405–14.
- [21] Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. *New Engl J Med* 1999;340:1649–59.
- [22] Hamblin TJ. Epidemiology of the myelodysplastic syndromes. In: Bennett JM, editor. *The Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management*. Marcel Dekker; 2002. p. 15–27.
- [23] Olney HJ, Le Beau MM. The cytogenetics, molecular biology of myelodysplastic syndromes. In: Bennett JM, editor. *The Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management*. Marcel Dekker; 2002. p. 89–119.
- [24] Aizawa S, Nakano M, Iwase O, et al. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leuk Res* 1999;23:239–45.
- [25] Flores-Figueroa E, Gutiérrez-Espíndola G, Montesinos JJ, et al. In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2002;26:677–86.
- [26] Tennant GB, Walsh V, Truran LN, et al. Abnormalities of adherent layers grown from bone marrow of patients with myelodysplasia. *Br J Haematol* 2000;111:853–62.
- [27] Tauro S, Hepburn MD, Bowen DT, et al. Assessment of stromal function, and its potential contribution to deregulation of hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2001;86:1038–45.
- [28] Bennett J, Catovsky D, Daniel MT, et al. The French–American–British (FAB) Cooperative Group Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982;51:189–99.
- [29] Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980;56:289.
- [30] Martínez-Jaramillo G, Flores-Figueroa E, Sánchez-Valle E, et al. Comparative analysis of the in vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors from patients with aplastic anemia and myelodysplasia. *Leuk Res* 2002;26:955–63.
- [31] Kaplow LS. Cytochemistry of leukocyte alkaline phosphatase: use of complex naphthol AS phosphate in azo dye coupling technique. *Am J Clin Pathol* 1963;39:439–49.
- [32] Arana RM, Paredes R, Nieto S, Kofman S. A t(1;22)(p13;q13) in four children with acute megakaryoblastic leukemia (M7), two with down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120:160–2.
- [33] Flores-Figueroa E, Gutiérrez-Espíndola G, Guerrero-Rivas S, et al. Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: in vitro colony growth and long-term proliferation. *Leuk Res* 1999;23:385–94.
- [34] Span LFR, de Witte TM. Biology of stem, myeloid progenitor cells in myelodysplastic syndromes. In: Raza A, Mundle S, editors. *Myelodysplastic Syndromes and Secondary Acute Myelogenous Leukemia*. Kluwer Academic Press; 2001. p. 45–63.
- [35] Raza A, Gezer S, Mundle S, et al. Apoptosis in bone marrow Biophys samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1995;86:268–76.
- [36] Haynesworth SE, Goshimam J, Goldberg M, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential. *Bone* 1992;13:81–8.
- [37] Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176:57–66.
- [38] Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3213–8.
- [39] Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995;85:929–40.
- [40] Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol* 2002;30:738–91.
- [41] Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* 2001;3:393–6.
- [42] Hung S-C, Chen N-J, Hsieh S-L, et al. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* 2002;20:249–58.
- [43] Campagnoli C, Roberts AG, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood* 98:2396–2402.
- [44] Goodwin HS, Bicknese AR, Chien S-N, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:581–8.
- [45] Awaya N, Rupter K, Bryant E, et al. Marrow stromal cells are not derived from the malignant clone in myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood* 2001;98(Suppl. 1):1487a.
- [46] Soenen V, Kotb R, Bonnet ML, et al. Mesenchymal cells (MC) from patients with myelodysplastic syndromes (MDS) are devoid of cytogenetic abnormalities and support short and long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 2001;98(Suppl. 1):3041a.
- [47] Alvi S, Henderson B, Shaher A, et al. Determination of clonality in stromal and parenchymal cells pre and post thalidomide treatment in myelodysplasia. *Blood* 2000;96(1):1536a.
- [48] Devetten MP, Wenger SL, Wang L, et al. Trisomy 8 in bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100(2):4913a.
- [49] Kramer A, Neben K, Ho AD. Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia* 2001;16:767–75.
- [50] Reyes M, Lund T, Aguiar D, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98:2615–25.
- [51] Stendurp K, Justen J, Eriksen EF. Number and proliferative capacity of osteogenic cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J bone Mineral Res* 2001;16:1120–9.

Agradecimientos

A mi tutor Dr. Héctor Mayani por tantos años de compartir y contagiarme su pasión por la hematopoyesis,

A mi comité tutorial, la Dra. Annie Pardo y el Dr. Eduardo García quienes siempre mostraron un gran interés por mi trabajo y lo enriquecieron en cada examen,

A mi comité de tesis por sus comentarios y correcciones para mejorar este trabajo,

A las instituciones que me apoyaron económicamente durante mi trabajo de doctorado, el CONACYT, DGEP y la Coordinación de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social,

Al Dr. Guillermo Gutiérrez por hacer posible que este trabajo se llevara a cabo, facilitándome los datos y las muestras de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico,

Al Dr. Alejandro Zentella y a la M. en C. Rosa Maria Arana, por su enorme apoyo metodológico,

A la Q.F.B. Mónica Reynoso por su apoyo en el citómetro de flujo,

Al Dr. Juan José Montesinos y la candidata a doctorado Patricia Flores, por haber sido parte importante de este proyecto,

A todos mis compañeros del laboratorio: Mónica Madrigal, Lupita Martínez, Ma. Antonieta Chávez, José Antonio Alvarado e Ignacio Valencia,

A los integrantes de la Unidad de Investigación Medica en Enfermedades Oncológicas,

Especialmente a los pacientes que participaron en este estudio,