



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**“EFECTO DEL IMATINIB EN EL SOPORTE
HEMATOPOYÉTICO DE LAS CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES Y OSTEÓBLASTOS DE PACIENTES
CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Biol. Karina Patricia Estrada González

TUTORA PRINCIPAL: Dra. Eugenia Flores Figueroa

COMITÉ TUTOR: Dr. Jesús Chimal Monroy
Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ESTRADA GONZÁLEZ KARINA PATRICIA** con número de cuenta **301139135** con la tesis titulada: **"EFECTO DEL IMATINIB EN EL SOPORTE HEMATOPOYÉTICO DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES Y OSTEÓBLASTOS DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA."** realizada bajo la dirección de: **DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA**

Presidente:	DR.	HÉCTOR MAYANI VIVEROS
Vocal:	DR.	ALFREDO HIDALGO MIRANDA
Secretario:	DR.	JUAN IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ
Suplente:	DR.	EDELMIRO SANTIAGO OSORIO
Suplente:	DR.	JESÚS CHIMAL MONROY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de septiembre de 2011



DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por todo el apoyo recibido durante este tiempo.
- Al CONACYT, por la beca y el apoyo recibido para la realización de este trabajo (CLAVE: FIS/IMSS/PROT/599).
- Al Programa para la Formación de Investigadores y al Fondo de Investigación en Salud IMSS, por el apoyo recibido para la realización de este trabajo (CLAVE: FIS/IMSS/PROT/291).
- A todos los miembros del Comité Tutoral, por su tiempo y esfuerzo en la asesoría brindada para la realización de este estudio.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por su apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

- A mis papás y a mi hermana, que son mi mejor y más grande ejemplo de perseverancia, fortaleza y amor incondicional. Gracias por ser mis mejores maestros, amigos y mi más grande apoyo.
- A mis mejores amigas: Rochi, Gis y Ross. Gracias por estar conmigo en TODO momento y no dejarme caer. Soy muy afortunada por tenerlas en mi vida y sobretodo por tener el privilegio de llamarlas amigas.
- A mis mejores amigos del laboratorio: Lalo, Lupita, Marta, Ileana y Sócrates. Porque sin ustedes todo hubiera sido más difícil. Gracias por su apoyo, por hacerme reír diariamente, por compartir su estrés conmigo y sobretodo por sus opiniones y consejos en las tardes de confusión.
- A mis compañeros y amigos: Martina, Jessi, Dafne, Karol, Elisa, Miguel, Adriana, Nachito, Moni, Luis, Mariel, Rubicel, Elsi, Dr. Mayani, Dra. Rossana, Dr. Juanjo y Dra. Tony. Porque aprendí a querer y a admirar profundamente a cada uno de ustedes. Fue un verdadero privilegio conocerlos y poder trabajar con todos.
- A mi tutora Kena, una de las personas más brillantes que conozco y de las que más he aprendido en todos los aspectos de mi vida. Gracias por todas las lecciones impartidas.

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado.

Albert Szent Gyorgi
(1893-1986)

ÍNDICE

Resumen en español.....	1
Abstract.....	3
I. Introducción.....	4
1 Hematopoyesis.....	4
1.1 Componente Hematopoyético.....	5
1.2 Componente Vascular.....	11
1.3 Componente Estromal.....	12
2 Microambiente hematopoyético.....	16
2.1 Componentes y distribución del microambiente hematopoyético.....	20
2.1.1 Zona endosteal.....	21
2.1.2 Zona vascular.....	25
2.1.3 Zona intertrabecular.....	28
2.1.4 Formación de un nicho dual.....	31
3 Leucemia mieloide crónica.....	32
3.1 Características clínicas de la LMC.....	33
3.2 Características biológicas y moleculares de la LMC.....	34
3.2.1 Cromosoma Filadelfia.....	34
3.2.2 Activación constitutiva de señales mitogénicas.....	36
3.2.3 Adhesión reducida al estroma celular y a la matriz extracelular.....	37
3.2.4 Inhibición de la apoptosis.....	37
3.3 Tratamientos utilizados en el manejo de la LMC.....	38
3.3.1 Imatinib: Mecanismo de acción y efectos biológicos.....	40
3.3.1.1 Inhibición de otras cinasas y su uso clínico en otros padecimientos.....	42
II. Antecedentes.....	44
1 Estudios sobre las MSC en la LMC.....	44
2 Efecto del Imatinib en las MSC.....	45
III. Planteamiento del Problema.....	49

IV. Hipótesis.....	49
V. Objetivo general.....	50
VI. Objetivos particulares.....	50
VII. Metodología general.....	51
1 Obtención de las muestras biológicas.....	51
2 Obtención de MSC.....	51
3 Cultivo de MSC.....	52
4 Evaluación del número de MSC por ensayos de CFU-F.....	53
5 Cuantificación de HPC por ensayo de Colonias en cultivos semisólidos.....	54
6 Evaluación del inmunofenotipo por citometría de flujo.....	54
7 Evaluación de la capacidad de diferenciación de las MSC.....	55
7.1 Diferenciación osteogénica.....	55
7.1.1 Tinción histoquímica de Fosfatasa alcalina.....	56
7.2 Diferenciación adipogénica.....	56
7.2.1 Tinción histoquímica de Rojo oleoso.....	57
7.3 Diferenciación condrogénica.....	57
7.1.1 Tinción histoquímica de Azul alciano.....	58
8 Evaluación de la capacidad funcional para soportar la hematopoyesis de las MSC por sistema de co-cultivos.....	58
8.1 Preparación de las capas de MSC.....	58
8.2 Obtención de CMN de sangre periférica movilizada.....	59
8.3 Enriquecimiento de HSC CD133+ CD34+ Lin- por selección Positiva y negativa.....	60
8.4 Ensayos de co-cultivos.....	63
9 Estadística.....	64
VIII. Resultados.....	66
1 Muestras biológicas.....	66
2 Obtención de MSC de MON, VLMC, IILMC y OLMC.....	67
3 Análisis de la frecuencia de MSC y contenido de HPC de MON, VLMC, IILMC y OLMC.....	68
4 Caracterización de las MSC de MON, VLMC, IILMC y OLMC.....	72

4.1	Determinación del Inmunofenotipo.....	72
4.2	Evaluación del potencial de diferenciación.....	74
5	Ensayos de co-cultivos.....	78
5.1	Descripción de la población hematopoyética inicial.....	78
5.2	Evaluación del soporte hematopoyético.....	80
6	Expresión de N-cadherina	86
6.1	Expresión de N-cadherina en la población hematopoyética.....	86
6.2	Expresión de N-cadherina en las MSC.....	90
IX. Discusión.....		92
X. Conclusión.....		99
XI. Perspectivas.....		99
XII. Bibliografía.....		101

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG-1	Angiopoyetina 1
BMPs	Proteínas morfogénicas de hueso
CAR	Células reticulares abundantes en CXCL12
CB	Crisis blástica
CCR	Respuesta citogenética completa
CFU-C	Unidades formadoras de colonias
CFU-E	Progenitores eritroides
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
CFU-GM	Progenitores monocíticos/granulocíticos
CFU-Meg	Progenitores megacariocíticos
CHR	Remisión hematológica completa
c-Kit	Receptor del factor de células troncales
CMN	Células mononucleares
CN	Células nucleadas
DTR	Receptor de la toxina diftérica
EPO	Eritropoyetina
FA	Fase acelerada
FC	Fase crónica
Flt-3	Tirosina de hígado fetal 3
Flt3-L	Ligando de la tirosina de hígado fetal 3
g	Gravedades
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HPC	Célula progenitora hematopoyética
HSC	Célula troncal hematopoyética
IFN- α	Interferón alfa
IL	Interleucina
ILMC	Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Lin-	Linaje negativo
LMC	Leucemia mieloide crónica
LSK	Células troncales hematopoyéticas de ratón Lin- Sca-1+c-kit+
LTC-IC	Células iniciadoras de cultivos a largo plazo
M-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos
MH	Microambiente hematopoyético
MO	Médula ósea
MON	Médula ósea normal
MSC	Célula troncal mesenquimal
NOD/SCID	Ratones inmunodeficientes diabéticos no-obesos
OLMC	Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos
PBS	Buffer de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

Ph	Cromosoma Filadelfia
PI3K	Vía fosfadilinositol-3 cinasa
R1	Primera resiembra
rpm	Revoluciones por minuto
SCF	Factor de células troncales
SCU	Sangre de cordón umbilical
SFB	Suero fetal bovino
SLAM	Familia de receptores de moléculas señaladoras de la activación linfocitaria
SPM	Sangre periférica movilizada
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TPO	Trombopoyetina
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR2	Receptor para el factor de crecimiento vascular endotelial 2
VLMC	Leucemia mieloide crónica sin tratamiento

RESUMEN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo crónico, caracterizado por la presencia del cromosoma Filadelfia que se da como producto de la translocación de los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, llevando a la síntesis de la proteína quimérica BCR-ABL con actividad de cinasa de tirosina. Para contrarrestar los efectos de este síndrome se desarrolló el Imatinib, el primer inhibidor de la proteína cinasa de tirosina que bloquea la función de BCR-ABL. Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado un impacto de este fármaco en la hematopoyesis normal y en la homeostasis ósea, debido a su efecto en las células BCR-ABL negativas, como en las células hematopoyéticas normales y en las células troncales mesenquimales (MSC), a través de la inhibición de los receptores c-kit y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) respectivamente, que podrían estar afectando la expresión de moléculas de adhesión como la N-cadherina.

Las MSC regulan la localización, supervivencia, diferenciación y potencial de las células hematopoyéticas primitivas, sin embargo el tratamiento *in vitro* con Imatinib modifica su potencial de diferenciación hacia osteoblastos. Considerando que dichas células juegan un papel crítico en el mantenimiento de la hematopoyesis normal, el efecto de este fármaco se podría ver reflejado en la alteración de la funcionalidad de las mismas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la capacidad funcional para mantener la hematopoyesis de las MSC de pacientes tratados con Imatinib.

Para esto se obtuvieron y caracterizaron MSC de médula ósea normal (MON n=5), pacientes sin tratamiento (VLMC n=3), tratados con Imatinib (ILMC n=5) y con otros fármacos (OLMC n=4). Evaluamos la capacidad funcional para mantener la hematopoyesis de las MSC después de su cultivo *in vitro*, mediante un ensayo de co-cultivo con células troncales hematopoyéticas (HSC) de sangre periférica movilizada (CD133+ CD34+ Lin-) evaluando la proliferación y expansión de las HSC, así como el mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos y finalmente la expresión de N-cadherina en nuestra población.

Las MSC obtenidas de ILMC, OLMC y VLMC presentaron un inmunofenotipo y capacidad de diferenciación similares a las obtenidas de MON. Además las MSC de los cuatro grupos de estudio soportaron la proliferación de células hematopoyéticas y de progenitores de manera similar a su contraparte normal. La expansión de las HSC se incrementó 1.5 veces en

las capas de MON mientras que en las capas de VLMC, ILMC y OLMC se incrementó 3.2, 3.5 y 2.1 veces respectivamente. Finalmente, la expresión de N-cadherina disminuyó en las HSC CD133+ CD34+ al ser co-cultivadas con las MSC de todos los grupos de estudios con excepción de las HSC co-cultivadas con las MSC de VLMC, que mantuvieron la expresión de N-cadherina en la fracción adherente.

Con este trabajo podemos concluir que la capacidad funcional para mantener la hematopoyesis de las MSC obtenidas de pacientes tratados con Imatinib y cultivadas *in vitro* no se encuentra alterada, lo que sugiere que el Imatinib tiene un efecto reversible, abriendo la oportunidad para el uso de las MSC de estos pacientes en la terapia celular.

ABSTRACT

In spite of having been designed as a specific BCR-ABL kinase inhibitor for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML), Imatinib also inhibits the kinases of other receptors like c-kit, c-fms and platelet derived growth factor receptor (PDGFR). *In vitro* reports have shown that Imatinib inhibits proliferation and enhances differentiation of MSC towards the osteoblastic lineage, and one report also showed an altered hematopoietic supportive capacity. CML long term Imatinib treated patients showed an altered mineral metabolism and increase in bone mass.

In order to elucidate whether *in vivo* Imatinib treatment may affect the functional properties of bone marrow MSC, and if the alterations remain after their *in vitro* expansion, we obtained MSC from normal bone marrow (n=5), from CML untreated patients (n=3), from CML patients treated for 6 months to 2 years with Imatinib (ICML; n=5) and CML patients with other treatments (OCML=4). After the second passage, we corroborated MSC immunophenotype by flow cytometry, assessed their ability to differentiate towards mesenchymal lineages and assessed their hematopoietic supportive capacity by a 35 day co-culture with CD133+CD34+ Lin- mobilized peripheral blood cells from normal donors (n=5).

MSC showed a fibroblastic morphology, and a CD45-CD14-CD31-CD90+CD105+CD73+ immunophenotype in all groups. The osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation potential was unchanged in ICML in comparison to CML and normal-derived MSC.

MSC were able to increase the proliferation, progenitor content and CD34+ CD133+ expansion. No statistical differences were observed between the groups. N-cadherin expression was higher on CD34+CD133+ cells that were co cultured with MSC from CML patients.

The results suggest that although Imatinib treatment seems to affect the biology of MSC *in vivo* -after an early *in vitro* expansion- their functional properties remained unimpaired, which suggest that Imatinib effect on MSC *in vivo* might be reversible when discontinuing the drug. The results also open the possibility for MSC from untreated and Imatinib treated patients to be used in cell therapy protocols.

I. INTRODUCCIÓN

1. Hematopoyesis

Cada día el cuerpo humano produce un estimado de 5 mil millones de células sanguíneas que permiten mantener la homeostasis en el organismo y responder a una mayor demanda de células en respuesta a infecciones o traumas (Fliedner y cols., 2002). El proceso de producción de células sanguíneas es denominado hematopoyesis; éste ocurre, principalmente en la médula ósea (MO) (Smith, 2003) y su correcto funcionamiento asegura la producción de las células responsables del transporte de oxígeno (eritrocitos), la coagulación sanguínea (plaquetas) y la inmunidad (granulocitos, macrófagos, linfocitos B y T). En adultos, el 4.6% del peso corporal se debe a la MO distribuida en las vértebras, costillas, pelvis, escápula y las terminales proximales de los huesos largos (Nair y cols., 2010).

Para que la hematopoyesis ocurra, es necesaria la interacción de distintos componentes celulares que coexisten en la MO: el componente hematopoyético, formado por las células troncales hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés) y su progenie; el componente vascular generado a partir de células progenitoras endoteliales; y por último, el componente estromal que se encuentra conformado por distintos tipos de células que provienen de una célula troncal mesenquimal (MSC por sus siglas en inglés) y otras células de origen hematopoyético como son los osteoclastos y los macrófagos (Gasper, 2000) (Figura 1).

Para que se lleve a cabo la hematopoyesis de manera normal, todos los componentes celulares deben estar en equilibrio, de tal manera que el organismo cuente con las células sanguíneas necesarias y tenga la capacidad de responder ante una mayor demanda, por lo que alteraciones en alguno de estos componentes pueden resultar en el desarrollo y progresión de enfermedades hematológicas (Lund, 2000).

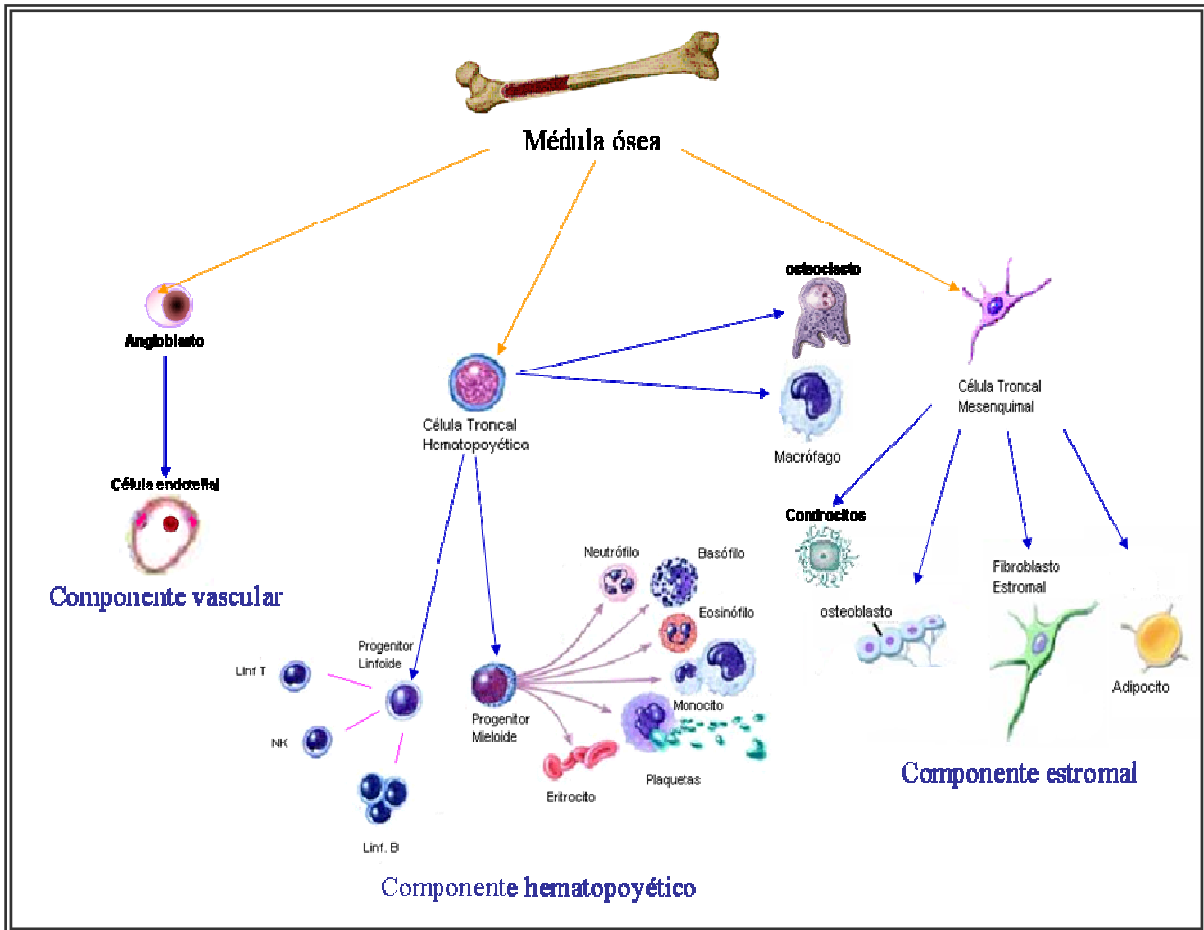


Figura 1. Representación esquemática de los tres componentes celulares de la médula ósea que participan en la hematopoyesis.

1.1 Componente Hematopoyético

El componente hematopoyético es probablemente el más estudiado dentro de la MO. Este sistema está organizado jerárquicamente por células con diferentes capacidades de autorrenovación, proliferación y diferenciación, por lo que las poblaciones hematopoyéticas se han subdividido para su estudio en cuatro compartimentos (Figura 2): las HSC; los progenitores hematopoyéticos (HPC por sus siglas en inglés); precursores comprometidos; y células maduras (Orkin y Zon, 2008; Mayani y cols., 2007; Szilvassy, 2003; Orkin, 2000).

Las HSC se encuentran en baja proporción con respecto al total de las células de la MO (0.01-0.005%) (Szilvassy y Hoffman, 1995). Estas células se definen por tres características fundamentales: 1) Multipotencialidad, caracterizada por el potencial para diferenciarse a los

distintos tipos celulares que se encuentran en la sangre periférica (linfoide, mieloide y eritroide); 2) Alto potencial proliferativo, siendo capaces de repoblar completamente un sistema hematopoyético dañado; 3) Autorrenovación, proceso por el cual las HSC pueden producir células idénticas a ellas mismas, asegurando así un número mínimo de células troncales que permita sustentar la hematopoyesis del individuo a lo largo de toda su vida (Schroeder, 2010; Orkin y Zon, 2008; Sauvageau y cols., 2004; Szilvassy, 2003; Uher y cols., 2003; Wognum y cols., 2003; Mayani, 2003). Debido a estas características, una sola HSC es capaz de generar hasta 10^{13} células maduras durante la vida de un hombre (Metcalf, 2001).

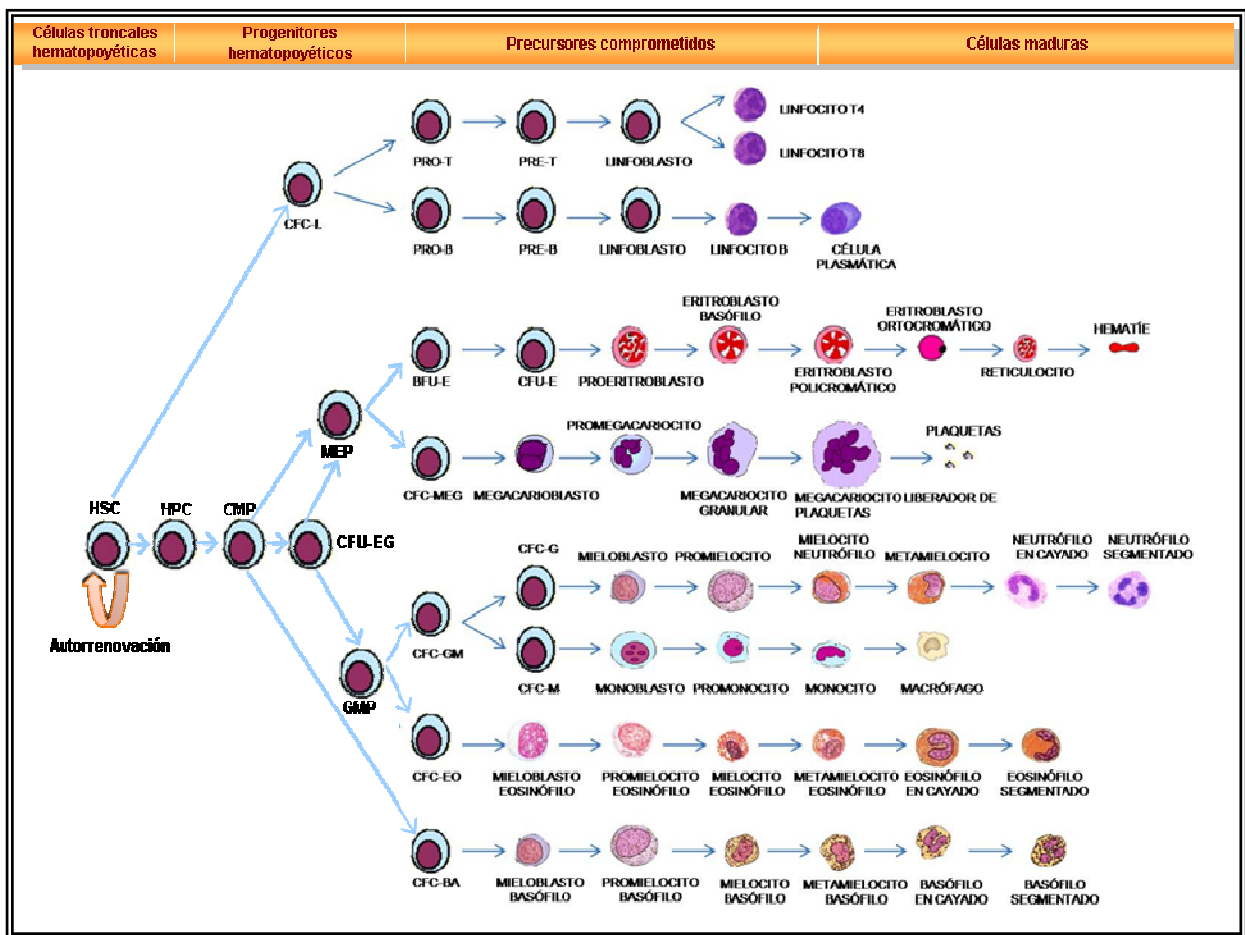


Figura 2. Representación esquemática del componente hematopoyético y su organización jerárquica en: Células troncales hematopoyéticas, progenitores hematopoyéticos, precusores comprometidos y células maduras (Modificado de Santa María del Pilar, 2011).

Por otra parte, se han diseñado diversos ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* para el estudio de las HSC. Los primeros ensayos *in vivo* fueron realizados en ratones previamente irradiados para eliminar la hematopoyesis endógena, a los que se les inyectaron células de MO murina, y lo que se observó fue la anidación de las células hematopoyéticas en el bazo del receptor, donde proliferaron y dieron lugar a colonias macroscópicas de células mieloides y eritroides. A estas colonias se les nombró como Unidades formadoras de colonias en bazo (CFU-S por sus siglas en inglés) (Till y McCulloch, 1980; Till y McCulloch, 1961); dichas colonias provienen de un HPC, pues no son capaces de sostener la hematopoyesis a largo plazo (Jones y cols., 1989). Otro de los ensayos *in vivo* para evaluar la capacidad de repoblación de las HSC fue realizado en modelos de ratones inmunodeficientes diabéticos no-obesos (NOD/SCID por sus siglas en inglés) previamente irradiados, a los que se les trasplantaron HSC humanas y se evaluó su capacidad para reconstituir los tres linajes sanguíneos en la MO murina (Figura 3) (citado en Mayani, 2003; citado en Szilvassy, 2003).

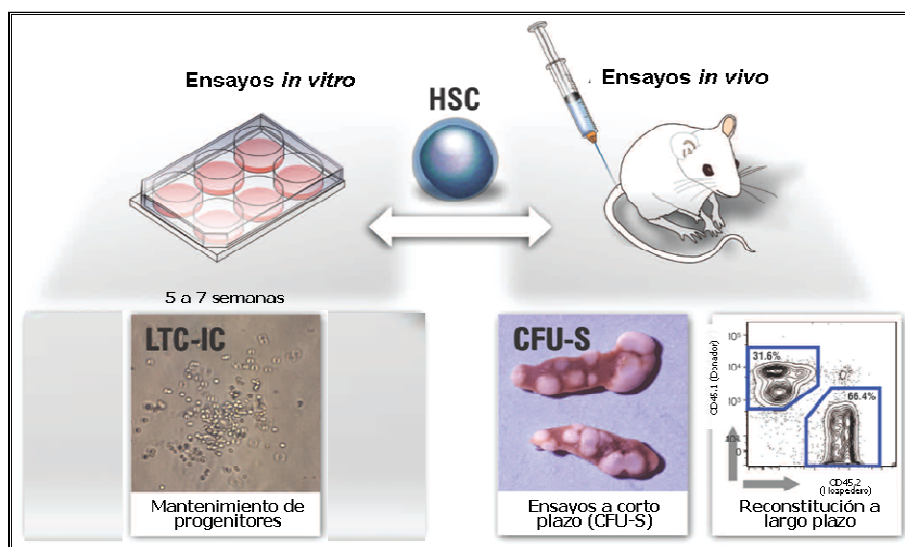


Figura 3. Ensayos utilizados para detectar células troncales hematopoyéticas (HSC). Los cultivos celulares, que son utilizados frecuentemente para probar las células humanas incluyen el ensayo de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC), donde se mide si los HPC aun están presentes después de 5-7 semanas de cultivo; los ensayos *in vivo* en ratones incluyen el ensayo de unidades formadoras de colonias en bazo (CFU-S) y el ensayo que involucra la búsqueda a largo plazo de células derivadas del donador en un hospedero reconstituido. El ejemplo muestra el reconocimiento hospedero-donador por anticuerpos que reconocen dos diferentes cepas de ratones con alelos CD45 distintos (Modificado de Domen y cols., 2006).

Por otro lado, dentro de los ensayos *in vitro* que identificaron a la población de las HSC, cabe destacar el de las células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC por sus siglas en inglés), donde se evalúa su capacidad para generar colonias en medio semisólido después de ser cultivadas cinco semanas en medio líquido (Figura 3) (Sutherland y cols., 1990).

Además de los ensayos funcionales, las HSC pueden ser identificadas y aisladas por su inmunofenotipo, utilizando citometría de flujo y técnicas de inmunoselección (positiva y negativa). En este sentido, uno de los marcadores más importantes ha sido el antígeno CD34, característico de las HSC y de los HPC (Simmons y cols., 1992). Este antígeno es una glicoproteína integral de membrana que regula la adhesión de las HSC al estroma (Mayani y cols., 2003; McSweeney y cols., 1996). Se expresa entre el 1 y 4% de células nucleadas obtenidas del aspirado de MO de un individuo sano, este pequeño porcentaje de células CD34+ incluye a la mayoría de células con capacidad de repoblar, todas las LTC-IC, a la mayoría de las unidades formadoras de colonias (CFU-C por sus siglas en inglés) y células progenitoras linfoides (Wognum y cols., 2003). La expresión de este antígeno en células hematopoyéticas está regulada durante el proceso de diferenciación perdiéndose a lo largo de este, por ello es posible distinguir subpoblaciones de células CD34+ utilizando la expresión de otros marcadores, por ejemplo: las HSC CD34+ más primitivas se caracterizan por la ausencia del marcador de diferenciación CD38 y la ausencia de antígenos específicos de linaje (Szilvassy, 2003). El hecho de que este marcador se pierda a lo largo del proceso de diferenciación, no permite dar un seguimiento a las HSC en ensayos a largo plazo, por lo que ha sido necesario utilizar antígenos característicos alternativos o en combinación con este marcador, como es el CD133 (Bellantuono, 2004).

El antígeno de superficie CD133 es importante para la identificación de los HPC y las HSC, aunque también se ha reportado su expresión en células con capacidad endotelial (Koutna y cols., 2011; Bhatia, 2001; Yin y cols., 1997). Este antígeno representa el homólogo humano de la glicoproteína Prolin 1 de ratón (Corbeil y cols., 1998). Las células CD133+ están presentes en la MO, en sangre periférica movilizada de donadores sanos (SPM), sangre periférica no movilizada y en sangre de cordón umbilical (SCU) (Summers y cols., 2004; Matsumoto y cols., 2000). Se ha reportado que la mayoría de las células reactivas para este marcador co-expresan el antígeno CD34 (Bhatia, 2001; Yin y cols., 1997), sin embargo,

existen resultados discordantes con respecto a las subpoblaciones existentes de CD133 y CD34, tanto en expresión como funcionalidad, lo que no ha permitido definir su jerarquía. Isidori y cols. (2007), reportaron que tras una segunda infusión de células CD133+ altamente purificadas en un paciente con leucemia linfocítica crónica con recaída, se observó una rápida y sostenida recuperación de la hematopoyesis después de un tratamiento mieloablativo, lo que sugiere que esta población contiene HSC y HPC funcionales capaces de reconstituir la hematopoyesis en humanos.

Recientemente, un estudio *in vitro* comparó la capacidad de proliferación y diferenciación de las poblaciones CD133+ y CD34+ en MO por citometría de flujo. Estos autores demostraron que la población CD133+ con respecto a la población CD34+, presenta una mayor expansión, una mayor cantidad de células quiescentes aun en presencia de factores de crecimiento y un mayor porcentaje de células CD38-. Además de que la población CD133+ contiene células CD34- que son capaces de expresar CD34+ a lo largo del cultivo, por lo tanto esta subpoblación podría referirse como un tipo de células más primitivas. Con respecto a los HPC, encontraron progenitores monocíticos/granulocíticos (CFU-GM), progenitores linfoides (CFU-L) y progenitores eritroides (CFU-E) en una proporción similar a la población CD34+ (Koutna y cols., 2011).

De acuerdo a lo reportado en la literatura la población CD133+ contiene tanto HSC como HPC funcionales y su jerarquía se podría establecer de acuerdo a la expresión del marcador CD34, iniciando con una población CD133+ CD34- que tiene la capacidad de reconstituir ratones NOD/SCID y que adquieren la expresión del marcador CD34+ durante la proliferación en cultivo refiriéndola como la subpoblación de células más primitivas, lo que nos lleva al siguiente nivel dentro de la jerarquía que sería la subpoblación CD133+ CD34+ con capacidad para reconstituir ratones NOD/SCID y con un gran número de LTC-IC así como de progenitores *in vitro*. Finalmente tendríamos la subpoblación CD133- CD34+ que tiene menor capacidad para repoblar ratones NOD/SCID, menor número de LTC-IC y progenitores más comprometidos hacia el linaje eritroide *in vitro* (Tabla 1).

Población	Reconstitución en ratones NOD/SCID	LTC-IC	Progenitores	Fuente	Observaciones	Bibliografía
CD133+CD34-	X	-	X	SCU, SPM	Expresan CD34 a lo largo del cultivo, No expresan marcadores de linaje.	Bhatia, 2001; Gallacher y cols., 2000 Yin y cols., 1997
CD133+CD34+	XX	XX	X	SCU, SP, SPM	Presentan un mayor porcentaje de colonias mieloides (70%).	De Wynter y cols., 1998; Matsumoto y cols., 2000; Gordon y cols., 2003; Handgretinger y cols., 2003
CD133-CD34+	X	X	X	SCU, SP, SPM	Presentan un mayor porcentaje de colonias eritroides (90%).	De Wynter y cols., 1998; Matsumoto y cols., 2000; Gordon y cols., 2003.

Tabla 1. Características funcionales de las subpoblaciones detectadas de acuerdo a la expresión de los marcadores CD133 y CD34. Las columnas en gris señalan la comparación entre si de esas subpoblaciones y el número de X indica qué población presentó una mayor respuesta en el ensayo correspondiente.

Conforme las HSC maduran, dan origen al segundo compartimento dentro de la jerarquía hematopoyética, formado por HPC multipotentes, bipotentes o monopotentes. Esta es una población celular muy heterogénea que constituye el 0.3% del total de las células presentes en la MO (Engelhardt y cols., 2002) y se caracterizan por poseer una capacidad de autorrenovación muy baja o nula, pero un gran potencial proliferativo. Dentro de este compartimento se engloban las células que ya están definidas hacia uno o dos linajes de diferenciación, es decir, se encuentran los progenitores megacariocíticos (CFU-Meg) (Chatelain y cols., 1988), los CFU-GM (Bradley y Metcalf, 1966), los CFU-E y los BFU-E (Gregory y Eaves, 1977). Fenotípicamente, los HPC adquieren la expresión de antígenos específicos de sus linajes y mantienen la expresión del antígeno CD34 (Mayani y cols., 2003; Astori y cols., 2001). Funcionalmente, estas células son capaces de formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos (Mayani y cols., 2007).

Los HPC a su vez, dan lugar al tercer compartimento, que incluye a los precursores hematopoyéticos que ya son reconocibles por su morfología. A diferencia de los otros

compartimentos, el potencial de proliferación de estas células es más limitado y se encuentran ya comprometidas a un solo linaje (Mayani y cols., 2007; Domen y cols., 2006).

Finalmente, los precursores maduran dando lugar a las células sanguíneas circulantes que conforman el cuarto y último compartimiento. Estas células son eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas capaces de realizar funciones biológicas específicas y esenciales en el organismo (Mayani y cols., 2007; Domen y cols., 2006).

1.2 Componente Vascular

El componente vascular está integrado por las células endoteliales y sus progenitores, denominados angioblastos o células progenitoras endoteliales (EPC por sus siglas en inglés). Se ha demostrado *in vitro* que células que expresan los antígenos CD133, el receptor para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR)2 y la molécula CD34 (CD34+ CD133+ VEGFR2+) tienen la capacidad de diferenciarse en células de linaje endotelial y contribuyen a la neovascularización en modelos animales de isquemia (Masuda y Asahara, 2003). Sin embargo, se ha relacionado la expresión de estos mismos antígenos a las HSC más primitivas (CD34+ CD133+ VEGFR2+), de las cuales pueden derivar tanto las células endoteliales como las hematopoyéticas (Lu y cols., 2007; Bryder y cols., 2006), por lo que se ha sugerido la existencia del hemangioblasto (progenitor común que puede dar origen a células hematopoyéticas y endoteliales). Pelosi y cols. (2002) demostraron que las células CD34+ VEGFR2+ procedentes de MO y de SCU son capaces de formar colonias mixtas hematopoyéticas-endoteliales *in vitro* que podrían representar hemangioblastos. Sin embargo, siguiendo la definición estricta de hemangioblasto se requiere la demostración de que estas células son capaces de formar células endoteliales y hematopoyéticas pero no de otros linajes, y principalmente la demostración de su funcionalidad tanto *in vitro* como *in vivo*. No obstante, hasta la fecha este progenitor común no ha sido demostrado en la MO del mamífero adulto (Péault, 2010; Yin y Li, 2006).

El procedimiento de obtención de las EPC incluye su capacidad de adhesión al plástico o el uso de selección positiva utilizando anticuerpos contra marcadores como CD133, CD34 o CD31. Después de aislarlas, las células son expandidas en cajas de cultivo cubiertas con fibronectina o colágena tipo 1 y se utiliza un medio con factores de crecimiento específicos,

como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento epidermal (EGF por sus siglas en inglés), que facilitan el crecimiento de células endoteliales (Ishikawa y cols., 2006).

Las células endoteliales están involucradas en el desarrollo de los vasos sanguíneos, en un proceso regulado que involucra su proliferación, migración y remodelación. Los vasos arteriales entran en la MO y se dividen en arteriolas y capilares a través de todo el órgano; estos pequeños vasos suministran a los sinusoides, los cuales están distribuidos alrededor del seno central que a su vez sigue dentro de la vena emisaria y se une finalmente a la circulación venosa sistémica. Además, las células endoteliales forman una capa superpuesta para formar las paredes de los sinusoides de MO (Flidner y cols., 2002).

1.3 Componente Estromal

La mayoría de las células del componente estromal se originan a partir de una población de MSC. Éstas se definen como células adherentes, clonogénicas, no fagocíticas, multipotentes, con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como son: los osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Short y cols., 2003).

Morfológicamente, las MSC 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 nucléolos (Figura 4) (Flores-Figueroa y cols., 2006). La principal fuente de MSC es la MO, no obstante constituyen un pequeño porcentaje del número total de células en este órgano hematopoyético. Pittenger y cols. (1999), mostraron que solo el 0.01- 0.001% de células mononucleares aisladas en un gradiente de densidad dan origen a colonias fibroblastoides adherentes al plástico. Cabe mencionar que estas células también pueden localizarse en otros tejidos del cuerpo humano como SCU, placenta y tejido adiposo, entre otros (Igura y cols., 2004; Gronthos y cols., 2003). Se han logrado establecer cultivos siguiendo la metodología estandarizada a lo largo del tiempo, la cual consiste en cultivar células mononucleares (CMN) obtenidas en la fracción de baja densidad de un gradiente de Ficoll o Percoll, para después retirar todas las células en suspensión después de un día de cultivo y cultivar a las células adheridas a la caja de cultivo (Flores-Figueroa y cols., 2006).

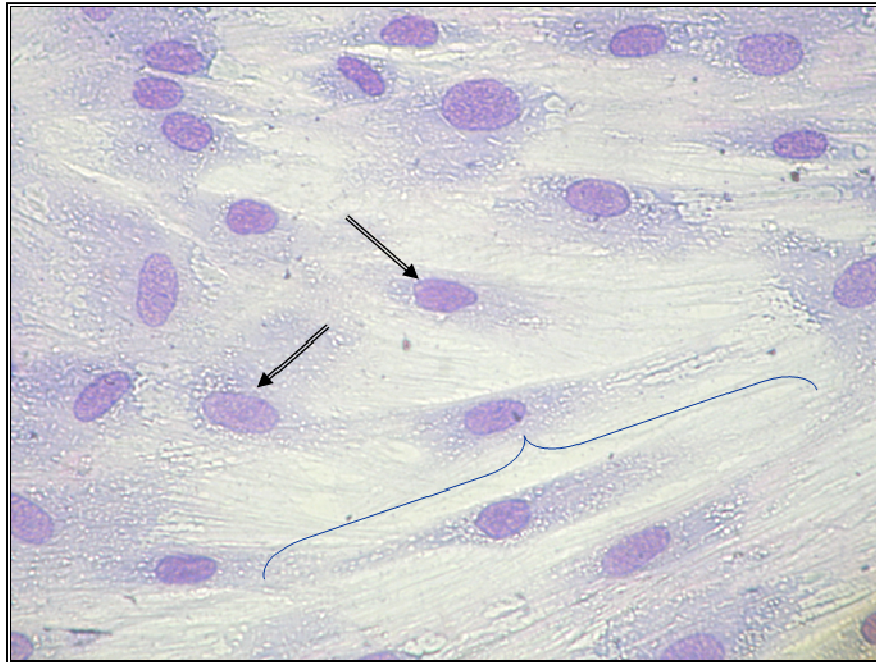


Figura 4. Microfotografía de una monocapa de MSC teñidas con Wright Giemsa (400 aumentos) donde se puede distinguir la morfoloía espigada, en forma de huso (corchete azul), con la presencia de un núcleo alargado (flechas negras).

Las MSC fueron caracterizadas inicialmente por Friedenstein y cols., (1976), quien las aisló a partir de MO de ratones y cobayos, y las describió como células adherentes que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Dichas células fueron denominadas Unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F, por sus siglas en inglés). Hasta la fecha, el ensayo de CFU-F es el más utilizado para evaluar la frecuencia de las MSC en la MO y consiste en sembrar células mononucleares en densidades muy bajas y cultivarlas durante 14 días para observar la formación de colonias de fibroblastos. En este ensayo cada colonia representa una MSC, lo que permite estimar su frecuencia. Por otra parte, para evaluar *in vitro* la capacidad de las MSC para sostener la hematopoyesis normal se utiliza el sistema de co-cultivo o sistema quimérico. Este ensayo consiste en mantener en cultivo una capa de células adherentes, la cual provee señales necesarias para permitir la proliferación, diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas (Figura 6) (Flores-Figueroa y cols., 2008).

Debido a la heterogeneidad para caracterizar a las MSC, en el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular ó ISCT (International Society Cellular Therapy) propuso tres

criterios mínimos para definir a estas células; primero, deben ser adherentes en cultivo; segundo, expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero, las MSC deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (Dominici y cols., 2006). Además de lo propuesto por la ISCT se deben tener en cuenta 2 aspectos adicionales para clasificarlas como células troncales: que las MSC presenten autorrenovación; y que sean capaces de desarrollar "plasticidad clonogénica" o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo.

Dentro de los marcadores característicos de las MSC, se encuentra la molécula CD73 ó 5'ectonucleotidasa, esta es una glicoproteína cuya función biológica consiste en hidrolizar nucleótidos extracelulares para permitir el ingreso de nucleósidos y así generar ATP y GPT como fuente de energía celular en células diferenciadas. No obstante, el papel que juega CD73 en las MSC se relaciona con mecanismos de adhesión celular ya que se ha encontrado co-expresada con moléculas tipo alfa 2 integrinas (Sträter, 2006). Las MSC aisladas de la MO también expresan la molécula CD90 ó Thy-1, una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas y cuyo principal ligando es el CD45 (Craig y cols., 1993), ésta se expresa entre el 10% y el 40 % de las células CD34+ y en mayor proporción en el tejido conectivo. Sin embargo, en células del estroma medular, aunque no se conoce su función, un estudio muestra que si son sometidas a estrés celular mecánico se diferencian hacia células similares a osteoblastos disminuyendo notablemente la expresión de CD90, lo que podría mostrar que este antígeno es un marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse en osteoblastos (Wiesmann y cols., 2006). Por otra parte, la molécula CD105 también conocida como endoglina, es una glicoproteína que forma parte del complejo del receptor del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β). Esta molécula interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular, como fibronectina y colágeno, razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular (Macías-Abraham y cols., 2010; Duff y cols., 2003).

Para la diferenciación de las MSC a los distintos tejidos se utilizan suplementos especiales en el medio de cultivo basal. Por ejemplo, para la diferenciación osteogénica el medio basal debe ser complementado con dexametasona, β -glicerofosfato, ácido ascórbico y

suero fetal bovino (SFB). En presencia de estos suplementos las células forman agregados, adquieren un cambio de morfología, aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y producen depósitos de cristales de hidroxapatita. Para la inducción de las MSC a precursores adipogénicos, el medio basal se enriquece con: dexametasona, 3-isobutil-1-metil-xantina (IBMX), insulina recombinante humana, indometacina y SFB; donde se observa la formación de vacuolas lipídicas. La diferenciación condrogénica sucede cuando las células crecen suplementando el medio basal con TGF- β 1, dicha diferenciación se comprueba mediante la secreción de proteoglicanos específicos de cartílago teñidos con azul alciano ó safranina O (Dennis y Charbord, 2002).

Por otra parte, dentro del componente estromal también existen células de origen hematopoyético como son los osteoclastos y los macrófagos, estos últimos son los únicos elementos del estroma que presentan el antígeno CD45; pueden distinguirse gracias a que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), el antígeno CD14, CD11c y CD68. Dentro de la MO éstos se localizan en diferentes sitios: como macrófagos centrales en las islas eritroblásticas, en el endotelio y dispersos entre las células hematopoyéticas. Estas células regulan la hematopoyesis mediante interacciones célula-célula, y por medio de la secreción de citocinas estimuladoras e inhibitoras de la hematopoyesis (Mayani y cols., 1992). Por otra parte, los osteoclastos son las células encargadas de la reabsorción del hueso; éstas son células grandes (100 μ m), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas, que contienen fosfatasa ácida tartrato resistente para la desfosforilación de las proteínas (Kollet y cols., 2006). Sin embargo, su papel dentro de la hematopoyesis no está bien definido.

Para el estudio del componente estromal, los cultivos a largo plazo de MO (LTBMC por sus siglas en inglés) descritos por Dexter han demostrado ser un elemento crucial, al reproducir *in vitro* la hematopoyesis, mostrando el valor de las interacciones entre células hematopoyéticas y el estroma (Dexter y cols., 1977). Las HSC en presencia de estroma pueden autorenovarse y conservar su pluripotencialidad (Fraser y cols., 1992).

En conjunto, tanto las MSC y su progenie así como las células de origen hematopoyético, son componentes fundamentales dentro de la MO ya que forman un microambiente adecuado dentro del cual interactúan con las células hematopoyéticas y regulan sus procesos de proliferación, diferenciación y maduración.

2. *Microambiente Hematopoyético*

La hematopoyesis ocurre en sitios específicos denominados órganos hematopoyéticos (Orkin y Zon, 2008), que comparten un ambiente específico denominado *microambiente hematopoyético* (MH). Éste se define como una estructura tridimensional compleja altamente organizada que regula la localización y fisiología de las células hematopoyéticas, y consiste en una red local de células estromales y los factores que secretan (Mayani y cols., 2007).

Durante la vida extra-uterina el principal órgano hematopoyético es la MO, la cual se localiza dentro de los huesos trabeculares. El hueso trabecular está compuesto por la corteza que es una capa fuerte de hueso cortical (hueso compacto) y por la médula que es una red de hueso trabecular (hueso esponjoso) donde se forman intersticios largos fácilmente visibles que contienen la MO (Figura 5A) (Bain, 2001).

La mayor parte del hueso cortical está cubierto en la superficie externa por el periostio que es una capa fibrosa y en la superficie interna por el endostio que es una capa de células osteogénicas (osteoblastos y osteoclastos) (Figura 5A). El endostio también delinea al hueso trabecular. Además, dentro de las lagunas del hueso trabecular y del hueso cortical se encuentran los osteocitos (osteoblastos maduros) (Bain, 2001) (Figura 5B).

En los espacios intertrabeculares se encuentra la médula roja (células hematopoyéticas) y la médula amarilla (tejido adiposo), cuya proporción es dependiente de la edad (Bain, 2001). En el neonato prácticamente la cavidad entera de la MO esta conformada por células hematopoyéticas proliferantes y pocos adipocitos, sin embargo, conforme avanza el desarrollo el número y tamaño de los adipocitos aumenta en forma lineal hasta que eventualmente, la médula amarilla ocupa el 50% de la cavidad medular (Gimble y cols., 1996).

Asimismo, los espacios intertrabeculares (Figura 5C) están ocupados por tejido estromal conectivo (adipocitos, MSC y macrófagos) y parénquima (células hematopoyéticas) y se encuentran irrigados por una red vascular de arterias, capilares y sinusoides (Bain, 2001).

En la MO todos estos elementos en conjunto, regulan la hematopoyesis y permiten que ocurra de manera normal, a través de la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de factores como las citocinas, quimiocinas, matriz extracelular y morfógenos.

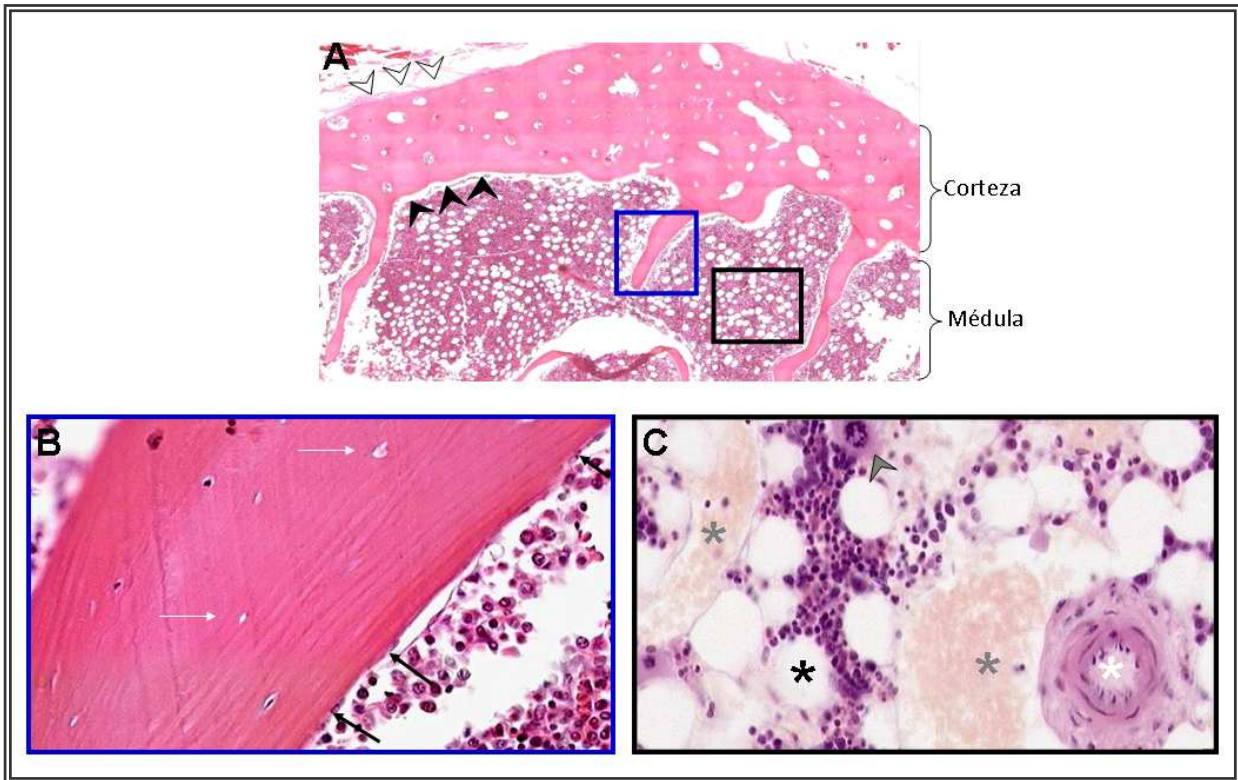


Figura 5. Estructura de la médula ósea. A) Microfotografía de un corte histológico de costilla descalcificada donde se muestra la médula así como el periostio (puntas de flecha blancas) y endostio (puntas de flecha negras) de la corteza (25 aumentos); B) Acercamiento de una trabécula ósea (cuadro azul) donde se muestran osteocitos (flechas blancas) y osteoblastos (flechas negras) (400 aumentos); C) Acercamiento de un espacio intertrabecular (cuadro negro) donde se muestran sinusoides (asterisco gris), adipocitos (asterisco negro), una arteria (asterisco blanco) y un megacariocito rodeado de células hematopoyéticas en diferentes estadios (punta de flecha gris) (400 aumentos) (Imágenes obtenidas y modificadas de Neuroinformática, 2011).

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para la comunicación intercelular pues inducen: la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis e incluso apoptosis. Cada citocina, se une a un receptor de superficie celular específico, generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular; esto incluye la regulación positiva ó negativa de diversos genes. Las citocinas se caracterizan por su redundancia (citocinas distintas comparten funciones similares) y su pleiotropía (acción sobre distintos tipos celulares) (Abbas y cols., 2008).

Algunas de las citocinas involucradas en los eventos de autorrenovación así como en el mantenimiento de las HSC son: el Factor de células troncales (SCF por sus siglas en inglés),

Tirosina de hígado fetal 3 (Flt-3 por sus siglas en inglés), Interleucina 6 (IL-6), Trombopoyetina (TPO) y TGF- β , entre otras. No obstante, algunas de estas citocinas también son necesarias para la diferenciación terminal a un linaje particular, como es el caso de la TPO. Por sus propiedades estas citocinas han sido utilizadas en combinación para la expansión *ex vivo* de las HSC (Dahlberg y cols., 2011; Flores-Guzmán y cols., 2005). Por otro lado, las citocinas que intervienen en la transición de las HSC a los HPC, tienen la capacidad de actuar sinérgicamente con factores específicos del linaje y de inducir la proliferación celular. Algunas de estas citocinas son: el Factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos (GM-CSF por sus siglas en inglés) e Interleucina 3 (IL-3). Finalmente, la madurez de las células sanguíneas dependerá de que existan los factores necesarios como: Eritropoyetina (EPO), el Factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF por sus siglas en inglés), el Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF por sus siglas en inglés) y TPO, entre otras (Tabla 2).

Las quimiocinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular que ejercen su función uniéndose a receptores específicos que se expresan en la membrana de las células sobre la que van a ejercer su función. Las quimiocinas presentan capacidad quimioatrayente y proinflamatoria y están involucradas en el tráfico de células hematopoyéticas maduras y primitivas (Juan y Colobran, 2009).

La matriz extracelular es una red compleja compuesta por macromoléculas; éstas pueden ser de cuatro tipos: (1) colágena (2) elastina (3) proteoglicanos (4) glicoproteínas multifuncionales (laminina, fibronectina, tenascina, trombospondina y otras). Cada una desempeña funciones de manera integrada con las demás; la colágena y la elastina constituyen la arquitectura de la matriz extracelular; las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión del sustrato intercelular, importantes en las interacciones célula-célula y célula-matriz; los glicosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base (Reilly y Engler, 2010; Alberts y cols., 2008).

	Citocina	Acción	Bibliografía
Citocinas que actúan en las HSC	TPO	Sintetizada en riñón, hígado y músculo esquelético. Mantiene la quiescencia de las HSC adultas. La transducción de señales de TPO y su receptor (cMLP) regula la quiescencia de las HSC y la interacción con el nicho endosteal.	Qian y cols., 2007. Yoshihara y cols., 2007.
	SCF	Sintetizada por células estromales. Es indispensable en la generación de todos los linajes sanguíneos. Mantiene la quiescencia de las HSC en el nicho. Presenta acción sinérgica con diversas citocinas amplificando la generación de linajes mieloide y eritroide.	Cáceres-Cortés, 2011. Dahlberg y cols., 2011. Thorén y cols., 2008.
	Flt3	Se expresa preferencialmente en las HSC así como en el cerebro, la placenta y el hígado. El ligando de Flt3 (Flt3-L) es expresado por las células estromales como un factor de unión de membrana o como factor soluble. Estimula a las HSC por si solo o en cooperación con otras citocinas. La transducción de señales Flt3/Flt3-L juega un papel importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación de HSC.	Citado en Katsumi y cols., 2011.
	IL-6	Promueve la autorrenovación de las HSC. Presenta acción sinérgica con citocinas como IL-3, SCF y TPO en la proliferación <i>in vitro</i> de HPC.	Dahlberg y cols., 2011. Matsunaga y cols., 1998.
	TGF- β	Modula en superficie celular la presencia de receptores a citocinas de acción temprana y moléculas como CD34. Reduce el ciclo celular de las células troncales y mantiene su multipotencialidad.	Söderberg y cols., 2009. Yamazaki y cols., 2009.
Citocinas que actúan en la transición de las HSC hacia los HPC	GM-CSF	Producido por linfocitos T activados y por otras células como células endoteliales y monocitos. Induce la proliferación de los progenitores de granulocitos y macrófagos. Moviliza hacia el torrente sanguíneo a los HPC en alta concentración.	Shi y cols., 2006.
	IL-3	Producido mayoritariamente por los linfocitos activados y también por monocitos. Expansión y proliferación de progenitores de todos los linajes. Acción sinérgica con diversas citocinas para la diferenciación terminal a linaje específico.	Dahlberg y cols., 2011. Metcalf, 2008.
Citocinas que actúan en la maduración de las células hematopoyéticas	EPO	Actúa en la fase tardía de diferenciación de los eritrocitos. Mantiene la proliferación y diferenciación de CFU-E. Se ha relacionado con la linfopoyesis B.	Singbrant y cols., 2011.
	M-CSF	Producido por monocitos y macrófagos maduros activados. Actúa en la fase tardía de diferenciación de monocitos-macrófagos. Afecta el comprometimiento y expansión de HPC hacia linaje mieloide.	Junttila y cols., 2003.
	G-CSF	Actúa en la fase tardía de diferenciación de granulocitos. Moviliza hacia torrente sanguíneo a HPC en alta concentración.	De Figueiredo y cols., 2004.
	TPO	Induce el compromiso, mantenimiento y diferenciación terminal de megacariocitos, la producción de trombocitos y la liberación de plaquetas.	Qian y cols., 2007.

Tabla 2. Ejemplos de citocinas involucradas en el mantenimiento y diferenciación de las HSC.

Además, estas moléculas también juegan un papel importante en la señalización, debido a que algunas interactúan con los receptores que se encuentran en las células hematopoyéticas. Así mismo, pueden favorecer la interacción de las citocinas con sus respectivos receptores (Reilly y Engler, 2010).

Los morfógenos son proteínas que dirigen el comportamiento de las células adyacentes por medio del control transcripcional de genes que intervienen en la diferenciación. A este grupo pertenecen los miembros de la familia Notch, la familia Wingless (Wnt) y las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs por sus siglas en inglés), entre otras (Bovolenta, 2005). En la hematopoyesis la vía de señalización Notch se ha asociado con los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular en casi todos los estadios del desarrollo. En general, la activación de esta vía conduce a la supresión transcripcional de los genes específicos de linaje, inhibiendo la diferenciación en respuesta a señales inductivas de la misma (Lévesque y cols., 2010).

Las moléculas de adhesión son receptores de membrana que intervienen en diversas funciones relacionadas con: interacciones entre células, adhesión de células a la matriz extracelular, crecimiento, diferenciación, migración y apoptosis (Alberts y cols., 2008). En la hematopoyesis, además de ayudar a la retención de las HSC y los HPC, su activación puede servir como señales de proliferación y/o supervivencia. De acuerdo a su estructura y función, las moléculas de adhesión pueden clasificarse como: integrinas, cadherinas, selectinas, proteínas tipo mucina y miembros de la familia de inmunoglobulinas. En particular, las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ establecen interacciones entre las células y componentes de la matriz extracelular como fibronectina, colágena, laminina y trombospondina o con moléculas membranales como la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1 por sus siglas en inglés) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM por sus siglas en inglés). Todas estas proteínas involucradas en la adhesión se expresan tanto en las células del MH como en las hematopoyéticas, lo que resulta en una interacción y regulación estrecha entre éstas (Lévesque y cols., 2010).

2.1 Componentes y distribución del microambiente hematopoyético

El MH se puede dividir en tres zonas: endosteal, vascular e intertrabecular, de acuerdo a su estructura y principalmente por su función en el mantenimiento de las HSC, es decir, en la

formación del nicho hematopoyético; dicho término se refiere a una zona específica dentro del MH conformada por células especializadas y estructuras no celulares que regulan la autorrenovación y diferenciación de las HSC (Bianco y cols., 2011).

En diversos estudios realizados en modelos murinos, se han localizado a las HSC por inmunohistoquímica en secciones de hueso (Arai y cols., 2004; Calvi y cols., 2003; Zhang y cols., 2003), por microscopía fluorescente (Nilsson y cols., 2001) o visualizándolas en tiempo real por microscopía intravital bifotónica de marcadores fluorescentes (Lo Celso y cols., 2009; Xie y cols., 2009), observándose que las HSC se encuentran cerca de los osteoblastos (nicho endosteal) o en asociación con el endotelio sinusoidal (nicho vascular).

Sin embargo, es posible que exista más de un nicho y que las HSC cambien dinámicamente su ubicación dentro de los nichos en respuesta a algún tipo de daño (Trumpp y cols., 2010). Por otra parte, otros componentes celulares importantes de los nichos, tal vez no estén restringidos al nicho endosteal o al vascular, incrementando así la posibilidad de que ambos nichos y la localización de las HSC formen un nicho dual (Ehninger y Trumpp, 2011; Bianco y cols., 2011; Oh y Kwon, 2010; Méndez-Ferrer y cols. 2010).

2.1.1 Zona Endosteal

La zona endosteal está conformada por osteoblastos, osteoclastos, macrófagos (osteomacs) y MSC que expresan el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF-R por sus siglas en inglés) (Figura 6) (Oh y Kwon., 2010; Lévesque y cols., 2010; Quinn y Saleh, 2009).

Los osteoblastos son células cuyas funciones principales son: la formación de hueso mediante la síntesis de matriz extracelular mineralizada (Deschaseaux y cols., 2009), la reabsorción del hueso induciendo la expansión, maduración y activación de los precursores de los osteoclastos (Quinn y Saleh, 2009), y la formación del nicho de las HSC (Oh y Kwon., 2010; Lévesque y cols., 2010; Arai y cols., 2004; Calvi y cols., 2003; Zhang y cols., 2003).

El primer elemento sugerido en el nicho endosteal como crítico para el mantenimiento de las HSC fue el osteoblasto, pues se reportó que en ratones transgénicos con una delección inducible del receptor 1A de la proteína morfogénica de hueso (BMP-1A por sus siglas en inglés), o en ratones mutantes que expresan constitutivamente el receptor 1 de la hormona

paratiroidea en estas células, presentan un número incrementado de las mismas y a su vez de HSC (Arai y cols., 2004; Calvi y cols., 2003; Zhang y cols., 2003). Por otra parte, los osteoblastos al ser deletados condicionalmente en ratones transgénicos causan la movilización de las HSC así como de los progenitores al bazo (Visnjic y cols., 2004).

A nivel funcional, las HSC de ratones de la región endosteal purificadas por citometría de flujo, mostraron una mayor actividad reconstitutiva comparada con las células obtenidas de toda la zona central de la MO, sugiriendo que las HSC muestran diferencias funcionales dependiendo de su lugar de origen dentro de la MO. De acuerdo con estos autores, las HSC más primitivas se localizan en el nicho endosteal (Grassinger y cols., 2010). Además, los osteoblastos producen factores que están involucrados en la retención y mantenimiento de las HSC, incluyendo CXCL12 y osteopontina, además de factores que mantienen a las HSC en quiescencia, incluyendo angiopoyetina 1(ANG-1), SCF ligando y TPO (Thorén y cols., 2008; Yoshihara y cols., 2007; Arai y cols., 2004), siendo al parecer, una fuente exclusiva de este último (Arai y cols., 2009). Se ha demostrado que la vía de señalización de TPO junto con su receptor cMLP media la quiescencia de las HSC. Esto se reflejó en ratones c-MLP^{-/-} que presentaron números normales de HSC al momento de su nacimiento, el cual declinó progresivamente con la edad (Qian y cols., 2007; Yoshihara y cols., 2007).

Otro factor importante, relacionado con la retención y mantenimiento de las HSC producido por los osteoblastos es la N-cadherina. Esta molécula es una glicoproteína transmembranal dependiente de calcio, mediadora de la adhesión homofílica célula-célula entre los osteoblastos y las HSC (Haug y cols., 2008; Zhang y cols., 2003). Dos trabajos publicados en el 2003 y el 2004 propusieron que los osteoblastos y las HSC son positivas para la tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal anti-N-cadherina (YS) (Arai y cols., 2004; Zhang y cols., 2003). Sin embargo, ninguno de estos estudios identificó un papel funcional de la N-cadherina en el nicho. Wilson y cols., (2004) encontraron en un modelo de ratón que las HSC con fenotipo LSK (Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺) son una mezcla de células N-cadherina positivas y negativas para el anticuerpo YS, sin embargo con este ensayo no quedó claro si las células N-cadherina⁺ eran HSC repobladoras a largo plazo. Más tarde, Hosokawa y cols. (2007), demostraron que especies reactivas de oxígeno disminuyen la expresión de la N-cadherina en HSC murinas (Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺ Side population) por RT-PCR cuantitativo y propusieron un papel de la N-cadherina en la interacción de las HSC y el nicho. En otro

ensayo, se detectó la expresión de N-cadherina en HSC activadas (o en autorrenovación) con un fenotipo Flk2-LSK por citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal específico para N-cadherina (MNCD2) que fue verificado por RT-PCR. Este estudio indicó que este anticuerpo puede ser usado para identificar distintas subpoblaciones de HSC (Haug y cols., 2008). Los autores concluyen que las células Flk2-LSK que expresan niveles intermedios de N-cadherina son HSC quiescentes sin el potencial para reconstituir después de un trasplante a un ratón irradiado, mientras que las células que expresan bajos niveles de N-cadherina son HSC activadas con la capacidad de reconstituir a un ratón irradiado (Haug y cols., 2008). En otro estudio, visualizaron la MO en tiempo real por medio de microscopía confocal y video de dos fotones. Xie y cols., (2008) siguiendo la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) en los HPC de secciones aisladas de hueso, usando además inmunodetección de CD31 y N-cadherina para identificar vasos sanguíneos y osteoblastos respectivamente. Estos autores observaron una tendencia de los HPC a estar en contacto directo con osteoblastos N-cadherina+. Sin embargo, en otros dos trabajos se reportó la falta de evidencia de la expresión de N-cadherina en HSC Flk2-LSK o en una población enriquecida en HSC (Lin- Sca-1+ c-kit+ y CD150+ CD48- CD41-) es decir, HSC LSK-SLAM (positivas para LSK y positivas para la familia de receptores de moléculas señaladoras de la activación linfocitaria (SLAM por sus siglas en inglés)). Además, estos autores encontraron que al deletar condicionalmente la N-cadherina en las HSC de un ratón, no se muestra una disminución significativa en la frecuencia de las HSC, en la hematopoyesis, en ensayos de repoblación competitiva a largo plazo o trasplantes seriales (Kiel y cols., 2009). Interesantemente, el grupo del Dr. Suda encontró que la sobre expresión de un dominante-negativo (DN) para N-cadherina inhibe la capacidad de alojamiento y repoblación a largo plazo de las HSC, mientras que la sobre expresión de N-cadherina silvestre, tiene un efecto opuesto (Hosokawa y cols., 2010). Debido al bloqueo no específico de los miembros de la familia de las cadherinas por el DN-N-cadherina (Fujimori y Takeichi, 1993), este resultado abre la posibilidad de que la adhesión celular sea mediada redundantemente por miembros de esta familia, lo que podría estar involucrado en la respuesta de las HSC.

Considerando la evidencia anterior, podemos asumir que la N-cadherina es una molécula importante para el mantenimiento de las HSC, sin descartar la idea de que las interacciones de las HSC con el nicho estén mediadas redundantemente por la familia de las

cadherinas, lo que explicaría porque el mantenimiento de las HSC en modelos de ratones knockout condicionales para N-cadherina no parece verse afectado.

Por otra parte, en un estudio reciente se interrumpió el mecanismo de diferenciación de osteoprogenitores en un modelo murino y lo que se encontró fue que los osteoprogenitores *osterix+*, más que los osteoblastos maduros *osteocalcina+*, son requeridos para el mantenimiento de la hematopoyesis (Raaijmakers y cols. 2010). Sin embargo, son necesarios más estudios para definir la función de los osteoprogenitores en la formación del nicho. Cabe mencionar que los osteoprogenitores se han considerado como MSC *nestina+*, pues estos son capaces de generar osteoprogenitores intermedios y eventualmente osteoblastos, que delimitan la superficie del endostio (Ehninger y Trumpp, 2011; Méndez-Ferrer y cols., 2010).

Otra célula importante en la regulación de las HSC en el nicho endosteal, es el osteoclasto. Los osteoclastos se organizan en estructuras especializadas encargadas de la degradación y digestión de matriz mineralizada, sin embargo se ha reportado su papel en la movilización de las HSC hacia la circulación, ya sea por una movilización inducida por estrés, o por la presencia del ligando de unión al receptor activado de NF κ B (RANKL) que es producido por osteoblastos (Kollet y cols., 2006). Sin embargo, en un estudio se demostró en ratones tratados con un inhibidor específico de osteoclastos (bifosfonatos), una disminución en el número de HSC en MO, un menor número de LTC-IC, un incremento en las CFU-C y una mayor fracción de las HSC en la fase S/M del ciclo celular, sugiriendo que la función de los osteoclastos es fundamental en el nicho de las HSC así como en el mantenimiento de la quiescencia (Lympéri y cols., 2011).

Por otra parte, en un estudio se reportó un papel crítico para los monocitos/macrófagos en la regulación de las HSC en el nicho endosteal. Winkler y cols. (2010) eliminaron fagocitos en dos modelos murinos; el primero fue un modelo murino MAFIA donde se eliminan selectivamente macrófagos a través de la inducción de la apoptosis mediada por un promotor Fas y el segundo fue un modelo murino tratado con liposomas de clodronato que es un fármaco que elimina macrófagos. En este ensayo se observó la movilización de las HSC con actividad repobladora; este fenotipo fue asociado con una disminución en los transcritos de CXCL12, ANG-1 y SCF en la MO total y en el componente endosteal. La pérdida de fagocitos causó una disminución significativa en la actividad de los osteoblastos disminuyendo la formación de matriz ósea nueva así como la expresión de osteocalcina en la MO (Winkler y

cols., 2010). Mas sorprendentemente, la delección con clodronato fue asociada con la pérdida de macrófagos F4/80+ asociados especialmente con la zona endosteal, los cuales han sido caracterizados previamente como osteomacs (Winkler y cols., 2010; Chang y cols., 2008).

Los osteomacs son macrófagos asociados a la zona endosteal y dentro de sus funciones se han propuesto las siguientes: vigilancia inmunológica del MH (fagocitosis, presentación de antígenos, etc); regulación de la generación y funcionamiento de los osteoclastos a través de la producción de IL-6, IL-1, Interferón β ó Factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés); modulación de la deposición mineral y de la síntesis de matriz ósea; dirección de la actividad de los osteoblastos mediante la síntesis de factores como TGF- β , calcitriol y Proteína morfogénica de hueso 2 (BMP-2 por sus siglas en inglés) (Chang y cols., 2008; Pettit y cols., 2008).

Por otro lado, se ha reportado que las MSC NGF-R+ se localizan en la zona endosteal. Jones y cols. (2010) demostraron que células CD45^{low} NGF-R+ aisladas de fragmentos de hueso trabecular, son 65 veces más frecuentes en comparación a aspirados de médula ósea, lo que correlaciona con la frecuencia de CFU-F. Además, estas células presentan la capacidad para diferenciarse a adipocitos, osteoblastos y condrocitos, comparten un inmunofenotipo de MSC (CD73+ CD105+ CD13+) (Jones y cols., 2010; Kuçi y cols., 2010); y funcionalmente son capaces de soportar el crecimiento de HPC (Quirici y cols., 2002).

Finalmente, las HSC presentan al receptor del ion calcio (Ca^{2+}), con el que perciben un gradiente creado por la liberación de este mineral dentro de la MO por la remodelación constitutiva del hueso mediada por los osteoblastos y los osteoclastos, lo que es importante para el injerto de las HSC en el endostio (Adams y cols., 2006).

Considerando lo anterior, podemos concluir que los componentes celulares de la zona endosteal juegan un papel muy importante en el mantenimiento de las HSC.

2.1.2 Zona vascular

La zona vascular está conformada por las células endoteliales que forman a los sinusoides (Hooper y cols., 2009), células reticulares adventicias que expresan CXCL12 (CAR por sus siglas en inglés) en ratón (Omatsu y cols., 2010; Sugiyama y cols., 2006), células

CD146+ en humano (Tormin y cols., 2011; Sorrentino y cols., 2008; Sacchetti y cols., 2007) y MSC Nestina+ en ratón (Méndez-Ferrer y cols., 2010) (Figura 6).

El nicho vascular fue identificado en la MO de ratón, utilizando marcadores de la familia SLAM (CD150+ CD48- CD41-), los cuáles son proteínas de superficie que están diferencialmente expresados en los HPC primitivos (Veillette, 2010). Con estos marcadores lo que se observó fue que cerca de dos tercios de las HSC están adyacentes a los sinusoides endoteliales (Kiel y cols., 2005).

En este sentido, se ha demostrado que las células endoteliales son capaces de mantener HSC en cultivo (Li y cols., 2004; Ohneda y cols., 1998). Asimismo, en diversos estudios se ha demostrado el papel de las células endoteliales durante la regeneración hematopoyética, es decir, la infusión de células progenitoras endoteliales aceleraron la recuperación de vasos sinusoidales después de irradiación, lo que fue asociado con una mayor recuperación de la celularidad de la MO y el número de HSC (Salter y cols., 2009). De manera similar, en otro estudio se demostró que la inhibición de la señalización de VEGFR2 durante la recuperación de la MO tras irradiación, previene no solo la regeneración de las células endoteliales que forman el sinusoides, sino también la reconstitución hematopoyética. Señalando un papel específico de las células endoteliales en la regeneración hematopoyética (Hooper y cols., 2009). El papel de estas células en el nicho vascular se puede relacionar con la secreción de citocinas como IL-6, IL-11, IL-5, TGF- β , SCF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF y el Factor inhibidor de leucemia (LIF por sus siglas en inglés), así como la secreción de moléculas de adhesión como E-selectina y VCAM1 que son importantes para la movilización, “homing” e injerto de las HSC (Wilson y Trumpp, 2006; Sipkins y cols., 2005).

Por otra parte, diversos estudios han sugerido que las HSC del nicho vascular están específicamente localizadas junto a las CAR, que a su vez rodean a las células endoteliales sinusoidales y no expresan N-cadherina (Kiel y cols., 2009; Kiel y cols., 2005). Las CAR se encuentran predominantemente en la zona vascular, aunque algunas pueden ser localizadas cerca de los vasos sanguíneos próximos al endostio (Omatsu y cols., 2010; Sugiyama y cols., 2006). Su importancia en el nicho vascular se corroboró al eliminarlas en un modelo murino con la expresión inducible del receptor de la toxina diftérica (DTR por sus siglas en inglés), causando una disminución en el número de las HSC y en la duración de su ciclo celular. En

los ratones deletados también se observó una reducción en el número de progenitores eritroides y de células B. Asimismo, en el mismo trabajo se demostró que la mayoría de las CAR expresan genes osteogénicos y adipogénicos, y tienen el potencial de diferenciarse hacia estos linajes en cultivo. Lo que se corroboró al observar que la delección de las CAR *in vivo* afecta el potencial de diferenciación de las células de la MO. Estos resultados en conjunto, sugieren que las CAR son progenitores adipo-osteogénicos que promueven la autorrenovación y el ciclo de las HSC, y son requeridos para la proliferación de células B, progenitores eritroides y HSC (Omatsu y cols., 2010).

Por otro lado, se demostró que las MSC CD146+ humanas son una subpoblación de las MSC NGF-R+ localizándose en la zona vascular, mientras que la población que se localiza en la zona endosteal no expresa CD146, por lo que la expresión de este marcador permite ubicar a las MSC NGF-R+ CD146+ como parte del nicho vascular. Cabe mencionar que la expresión de CD146 se vio relacionado con las concentraciones de oxígeno, pues éste se sobre expresó en normoxia y disminuyó en condiciones hipóxicas (Tormin y cols., 2011). Tanto la población que expresa CD146 como la que no lo expresa tienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos y condrocitos *in vitro* y al ser trasplantadas en ratones inmunodeficientes forman hueso y tejido hematopoyético (Tormin y cols., 2011; Sorrentino y cols., 2008; Sacchetti y cols., 2007). En este sentido, su multipotencialidad, morfología y ubicación sugiere que estas células son la contraparte humana de las CAR de ratón (Nagasawa y cols., 2011).

Méndez-Ferrer y cols. (2010), identificaron una población de MSC nestina+ asociada cercanamente a las células endoteliales y a las HSC. Esta población es estrictamente vascular y se encuentra estrechamente asociadas con fibras del nervio adrenérgico del sistema nervioso simpático (SNS) que regula la movilización de las HSC y es responsable de las oscilaciones circadianas en el número de HSC en circulación (Méndez-Ferrer y cols., 2008; Katayama y cols., 2006). Por otro lado, las MSC nestina+ expresan los más altos niveles de factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de las HSC con respecto a cualquier otra célula estromal, como son CXCL12, SCF, ANG-1, IL-7, VCAM1 y osteopontina. La eliminación de las MSC nestina+ por DTR, causa la movilización de aproximadamente el 50% de las HSC al bazo, así como el 90% de disminución del homing de las células progenitoras en los recipientes deletados (Méndez-Ferrer y cols., 2010). Debido a que las MSC nestina+ así

como las CAR han mostrado características similares a las MSC, es probable que ambas poblaciones se encuentren altamente relacionadas. En este sentido, las MSC nestina+ son aproximadamente cuatro veces menos abundantes que las CAR, contienen toda la capacidad de CFU-F dentro de la MO y son capaces de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos y adipocitos, por lo que se ha sugerido que las MSC nestina+ pueden representar una población más primitiva en comparación con las CAR (Ehninger y Trumpp, 2011).

Considerando lo anterior, podemos decir que los componentes celulares de la zona vascular juegan un papel importante en el mantenimiento de las HSC.

2.1.3 Zona intertrabecular

La zona intertrabecular se localiza en la mayor proporción de la cavidad ósea y ocupa el espacio entre las trabéculas óseas. Esta zona está conformada por adipocitos, macrófagos, MSC, CAR, células hematopoyéticas en diferentes estadios, células endoteliales como parte de los sinusoides, capilares y arterias (Lévesque y cols., 2010).

Los adipocitos constituyen el componente más abundante del estroma medular en el adulto y dentro de sus funciones se encuentran: el almacenamiento de triglicéridos circulantes, como reservorio de energía (Gimble y cols., 1996) y en la regulación de la hematopoyesis a través de la secreción de citocinas y otras moléculas (Chitteti y cols., 2010; Naveiras y cols., 2009). Las citocinas que secretan han sido denominadas adipocinas, como son la adiponectina y las prostaglandinas, las cuales tienen diversos efectos en la hematopoyesis (DiMascio y cols., 2007; Yokota y cols., 2003).

Los receptores para la adiponectina (AdipoR1 y AdipoR2) se expresan en las HSC. Esta molécula al interactuar con su receptor, es capaz de aumentar la proliferación de las HSC y al mismo tiempo retenerlas en un estado inmaduro, manteniendo así su capacidad de repoblación a largo plazo (DiMascio y cols., 2007). Sin embargo, también se ha reportado que la adiponectina puede tener efectos inhibitorios en células comprometidas, por ejemplo: en cultivos a largo plazo inhibe la linfopoyesis B mediante la inducción de prostaglandinas en el MH, lo que promueve la apoptosis de linfocitos (Yokota y cols., 2003). De manera similar, en un estudio se reportó que los adipocitos bloquean la granulopoyesis por la inhibición de G-

CSF inducida por neuropilina-1 (Belaid-Choucair y cols., 2008). Por otro lado, Naveiras y cols. (2009) compararon por citometría de flujo la actividad hematopoyética de regiones del esqueleto murino que difieren en el contenido adiposo. Estos autores demostraron que las HSC y los progenitores disminuyeron su frecuencia en la vértebra rica en adipocitos de la cola del ratón en comparación con la vértebra del tórax prácticamente libre de adipocitos. En este mismo trabajo, los autores también evaluaron la actividad hematopoyética por ensayos de repoblación competitiva en ratones genéticamente incapaces de formar adipocitos (A-ZIP/F1 sin grasa) y en ratones tratados con un inhibidor de la adipogénesis (Bisfenol-A-DiGlicidil-Éter), obteniéndose que el injerto post-irradiación en médula fue acelerado en comparación a los ratones silvestres o a los ratones no tratados. Estos trabajos en conjunto, implican a los adipocitos como reguladores predominantemente negativos del MH.

Otro componente importante en la promoción del mantenimiento y la retención de las HSC son los monocitos/macrófagos. Chow y cols, (2011) utilizaron 4 modelos diferentes para eliminar poblaciones de monocitos/macrófagos en MO de ratón, incluyendo liposomas de clodronato, el modelo murino MAFIA ya descrito y animales transgénicos en donde DTR es expresado por las regiones promotoras de Gr-1 ó CD169. En todos los casos, la pérdida de monocitos y/o macrófagos fue asociada con la movilización de las HSC de la MO hacia sangre periférica y bazo; esto fue asociado con una reducción del 40% en la proteína CXCL12 en el fluido extracelular de la MO, debido a que CXCL12 media la activación del receptor CXCR4 en las HSC como señal de retención crítica en el nicho (Broxmeyer, 2008; Lapidot y Petit, 2002).

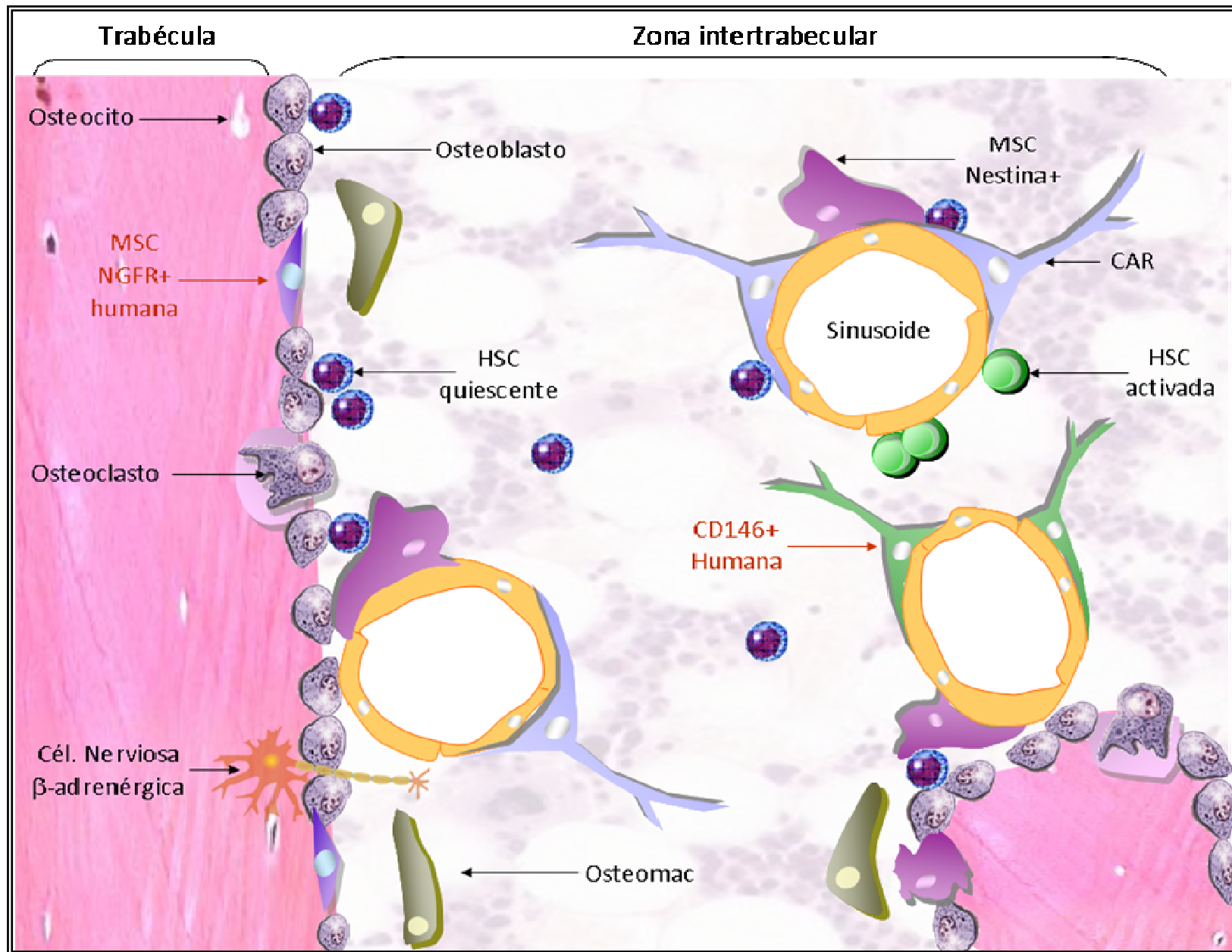


Figura 6. Representación esquemática de los nichos presentes en la médula ósea. El nicho endosteal se forma entre las HSC quiescentes y las células que rodean la trabécula (osteoblastos, osteoclastos, osteomacs y MSC NGFR+). El nicho vascular se forma entre las HSC quiescentes, las HSC activadas y los sinusoides endoteliales, rodeados de CAR, de MSC nestina+ y de células CD146+.

2.1.4 Formación de un nicho dual

La hipótesis de que un tipo celular está presente en diferentes sitios dentro del nicho medular, nos conduce a la posible formación de un nicho dual. De acuerdo a lo reportado por Méndez-Ferrer y cols. (2010), una de las poblaciones que permite la formación del nicho dual es la población de las MSC nestina+.

Las MSC nestina+ así como las CAR se encuentran típicamente en la zona vascular, sin embargo también se han encontrado aunque en menor frecuencia en la cercanía de la zona endosteal (Méndez-Ferrer y cols., 2008). Estas células también parecen mediar la capacidad de la hormona paratiroidea para incrementar el número de HSC, la cual ha sido previamente correlacionada con un incremento en el número de osteoblastos y a su vez con el incremento de HSC (Adams y cols., 2006; Calvi y cols., 2003). La hormona paratiroidea estimula directamente la proliferación de las MSC nestina+ mientras que simultáneamente promueve su diferenciación hacia osteoblastos (Méndez-Ferrer y cols., 2010). Interesantemente, los sinusoides endoteliales con asociación a las MSC/CAR son también encontrados directamente en el endostio. Esto eleva la posibilidad de que las HSC ubicadas en la zona endosteal, siguen siendo parte de un nicho perivascular. No obstante, algunas HSC de MO localizadas lejos de la superficie del hueso podrían simplemente ser atrapadas en secciones histológicas durante la migración de un nicho al vaso (Wright y cols., 2001).

Otra población que podría estar involucrada en la formación del nicho dual son los monocitos/macrófagos de MO (Chow y cols., 2011; Winkler y cols., 2010), pues al eliminarlos se observó la movilización de las HSC de la MO hacia sangre periférica y bazo, lo que fue relacionado con la disminución de diversas citocinas en las MSC nestina+ (Chow y cols., 2011). Asimismo, la pérdida de macrófagos, principalmente ostomacs, causó una disminución significativa en la actividad de los osteoblastos en la superficie del hueso y la disminución de la expresión de osteocalcina en la MO (Winkler y cols., 2010). Estos datos sugieren que los fagocitos de diferentes tipos, son probablemente parte de ambos nichos y fungen como reguladores positivos de las MSC perivasculares y de los osteoblastos endosteales. Considerando todo lo anterior, podemos concluir que existen poblaciones celulares que al no estar restringidas exclusivamente al nicho endosteal o al nicho vascular, incrementan la posibilidad de la existencia de un nicho dual.

No obstante, se ha postulado la existencia de dos nichos distintos, uno que contiene a las HSC quiescentes y uno que contiene a las HSC activadas o en autorrenovación (Trumpp y cols., 2010). Ambos nichos pueden recaer en las MSC vasculares, sin embargo el nicho endosteal puede mantener una pequeña población de HSC quiescentes por la presencia adicional de los osteoblastos TPO integrados en un microambiente rico en calcio. Además, existe un alto nivel de oxígeno en el nicho vascular en comparación con la región hipóxica del nicho endosteal (Mohyeldin y cols., 2010; Parmar y cols., 2007), por lo que se ha postulado que las HSCs localizadas en la región hipóxica, tras una estimulación pueden moverse al nicho vascular donde el nivel incrementado de oxígeno influye a las HSCs para diferenciarse y salir a sangre periférica como células maduras (Iwasaki y Suda, 2009).

Con todo lo anterior, podemos concluir que los elementos del MH son de suma importancia para la homeostasis de la hematopoyesis, por lo que alteraciones en alguno de estos componentes pueden resultar en el desarrollo y progresión de enfermedades hematológicas (Lund, 2000).

3. Leucemia Mieloide Crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa clonal que se origina en las HSC y que está caracterizada por la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph por sus siglas en inglés) y su producto oncogénico BCR-ABL (Chávez-González y cols., 2009).

Esta enfermedad representa del 15% al 20% del total de las leucemias y su incidencia en los países occidentales se estima en 1 a 2 casos por cada 100 000 personas por año. El 85% de los casos se diagnostican en la fase crónica de la enfermedad y alrededor del 50% de ellos tienen un diagnóstico accidental por medio de un examen sanguíneo de rutina. La edad media de su aparición es de 53 años y la incidencia máxima se encuentra entre los 40 y 60 años, predominando ligeramente en hombres, con una relación de 1.3:1 (Rohrbacher y Hasford, 2009; Hehlmann y cols., 2007).

El diagnóstico de la LMC se realiza por análisis de sangre periférica y biopsia de MO, además de un análisis citogenético para detectar la presencia del cromosoma Ph (O'Brien y cols., 2010; Hehlmann y cols., 2007). La sangre periférica generalmente muestra una leucocitosis que implica células en todos los estadios de diferenciación, dentro de la línea

mieloide. La MO es marcadamente hiper celular, con pérdida de los espacios grasos normales y un incremento de la relación mieloide eritroide debido a la predominancia de células mieloides, en particular neutrófilos y mielocitos (O'Brien y cols., 2010; Quintás-Cardama y Cortes, 2006).

3.1 Características clínicas de la LMC

La LMC se caracteriza por un curso bifásico o trifásico. El paso de una fase a otra se define mediante la evolución de parámetros clínicos y analíticos. El 80% de los pacientes se diagnostican en fase crónica (FC), evolucionando a fase acelerada (FA) para terminar en crisis blástica (CB). El 20% restante evoluciona directamente a CB sin previo paso por FA. De éstos, aproximadamente un 10% se presentan directamente en FA o CB. Los síntomas más frecuentes referidos por los pacientes por orden de frecuencia son: astenia, anorexia o pérdida de peso, sudoración, fiebre, dolores óseos, cefalea, dolor esternal, hepatomegalia y esplenomegalia (O'Brien y cols., 2010; Quintás-Cardama y Cortes, 2006).

La FC se caracteriza por una gran cantidad de células mieloides con una maduración normal. La mayoría de los pacientes presentan anemia y esplenomegalia. La celularidad en la MO incrementa con la proliferación y maduración reflejada en la sangre periférica. El diagnóstico de la enfermedad va precedido en muchos casos por un período de varios meses en que los pacientes presentan síntomas inespecíficos, siendo la esplenomegalia el dato más frecuente en la exploración física inicial (O'Brien y cols., 2010).

En la FA las células leucémicas pierden la capacidad para una diferenciación terminal y el resultado es una leucemia aguda, la cual es muy resistente a la quimioterapia. Se define por la presencia de uno o más de los siguientes criterios (O'Brien y cols., 2010):

1. Persistencia en el incremento del recuento de leucocitos y/o persistencia de esplenomegalia que no responde a la terapia.
2. Persistencia de trombocitosis no controlada con la terapia.
3. Persistencia de trombocitopenia no relacionada a la terapia.
4. Evolución clonal citogenética.
5. 20% o más de basofilia en sangre periférica.
6. 10-19% mieloblastos en sangre o MO.

La CB consiste en el paso de la fase crónica a un cuadro semejante al de la leucemia aguda, con la invasión relativamente rápida de la MO, la sangre periférica y a veces otros órganos por blastos (O'Brien y cols., 2010).

3.2 Características biológicas y moleculares de la LMC

3.2.1 Cromosoma Filadelfia

La LMC es un padecimiento hematológico directamente asociado a la presencia de una anomalía cromosómica, ya que más del 95% de los pacientes presentan el cromosoma Ph, mientras que el resto de los pacientes presentan translocaciones que no pueden ser detectadas por análisis citogenéticos rutinarios o tienen translocaciones complejas que involucran la participación de un tercer cromosoma (Chávez-González y cols., 2009).

El cromosoma Ph es una anomalía citogenética adquirida, presente en las células de la LMC. Se forma como resultado de una translocación recíproca de material genético del brazo largo del cromosoma 9 y del brazo largo del cromosoma 22 referido como $t(9;22)(q34;q11)$. Esta translocación, da como resultado una yuxtaposición de secuencias 3' del proto-oncogén ABL (Abelson) presente en el cromosoma 9, con las secuencias 5' del gen BCR (breakpoint cluster region) que se encuentra en el cromosoma 22. Este hecho conduce a la formación del gen quimérico de fusión *BCR-ABL* (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Deininger y Druker, 2003). Este gen quimérico, transcribe un mRNA que codifica una proteína con actividad constitutiva de cinasa de tirosina. Dependiendo de la localización del punto de ruptura en el gen *BCR*, la proteína de fusión puede variar en tamaño (Quintás-Cardama y Cortes, 2009) (Figura 7). En la LMC, la mayoría de las veces la ruptura ocurre centralmente, es decir, entre exones 12 y 16 (también conocidos como exones b1 a b5), en una región designada como el grupo mayor de ruptura (M-BCR) expresando así una proteína de 210 kD (p210 BCR-ABL). Cabe mencionar que la posición del punto de ruptura en el gen *ABL* es altamente variable y puede ocurrir en casi cualquier posición río arriba del exón a2. Por otro lado, en dos tercios de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda Ph-positivo (LLA Ph+) se expresa una proteína de 190kD (p190 BCR-ABL), que surge de la ruptura en el primer intrón del gen *BCR*, en un área denominada grupo menor de ruptura (m-BCR) entre los

exones e1 y e2. Por otra parte, los pacientes con leucemia neutrofílica crónica asociada al cromosoma Ph expresan una proteína más larga (230kD) (p230 BCR-ABL), como resultado de la ruptura entre los exones e19 y e20 de la región micro (μ -BCR) (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Deininger y Druker, 2003).

El gen *ABL* celular es el homólogo humano del gen viral *ABL* (*v-ABL*), oncogén que lleva el virus de la leucemia murina de Abelson (Abelson y Rabstein, 1970). Éste codifica para una proteína con actividad de cinasa de tirosina, que puede localizarse en el núcleo y participar en la transcripción del ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés) al ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés), en la regulación del ciclo celular y en la genotoxicidad, no obstante en los HPC y en neuronas, ABL se encuentra principalmente en el citoplasma interviniendo en el moldeado del citoesqueleto y procesos de señalización (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Deininger y Druker, 2003; Goldman y Melo, 2003).

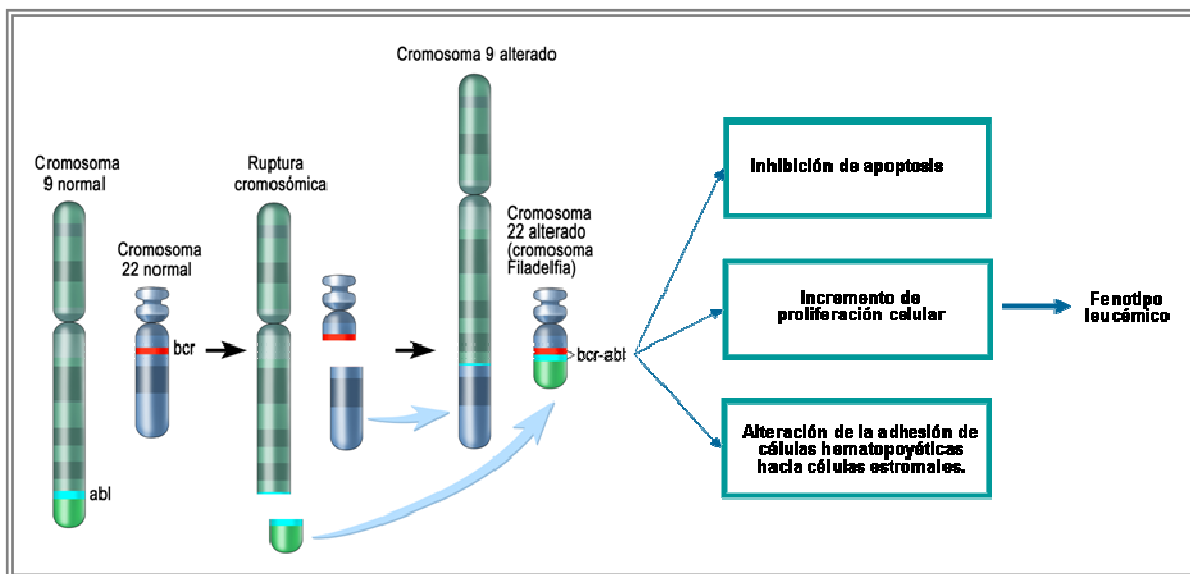


Figura 7. Representación esquemática del cromosoma Filadelfia. En la figura se muestran los cromosomas 9 y 22 normales, la ruptura e intercambio cromosómico que dan como resultado al cromosoma Filadelfia (BCR-ABL) así como los eventos que conducen al fenotipo leucémico

(Modificado de Winslow, 2007).

El gen *BCR* está situado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11) y su expresión puede ser tanto en núcleo como en citoplasma. En el núcleo, la proteína BCR se asocia con el DNA condensado en la interfase y metafase del ciclo celular. BCR tiene actividad serina,

treonina cinasa con actividad enzimática en el primer exón, ésta puede autofosforilarse así como a los principales sustratos y por ende, se propagan señales celulares. BCR tiene homología con las proteínas G a diferentes niveles. Estas proteínas son agentes fundamentales en la señalización intracelular, organización del citoesqueleto, el crecimiento celular y el desarrollo normal; la homeostasis dentro de este proceso se mantiene por la enzima guanosa trifosfato (GTPasa) la activación de las proteínas, guanina y factores de intercambio de nucleótidos (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Deininger y Druker, 2003; Deininger y cols., 2000).

Una de las más notables diferencias entre la proteína ABL normal y el BCR-ABL está dada por sus contrastantes localizaciones en la célula (Goldman y Melo, 2003). La proteína ABL aparece tanto en el núcleo como en el citoplasma y puede ir de un lado a otro entre esos 2 compartimentos bajo la influencia de las señales de localización nuclear y los dominios de señales de salida del núcleo, mientras que el BCR-ABL es exclusivamente citoplasmático. El ABL nuclear es esencialmente una proteína pro-apoptótica, que tiene una función clave en la respuesta celular al estrés genotóxico. En contraste, el BCR-ABL es intensamente anti-apoptótico, a pesar de que retiene la zona de localización del ABL nuclear y las secuencias de salida del núcleo. La principal razón por la cual el BCR-ABL es retenido en el citoplasma es su actividad cinasa de tirosina activada constitutivamente (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Deininger y Druker, 2003; Goldman y Melo, 2003).

Se han implicado tres posibles mecanismos en el desarrollo de la LMC y estos son: activación constitutiva de señales mitogénicas, adhesión reducida de células al estroma y matriz extracelular, y apoptosis reducida.

3.2.2 Activación constitutiva de señales mitogénicas

El número de vías que puede activar BCR-ABL es extenso ya que sus dominios pueden interactuar con diferentes proteínas adaptadoras involucradas en múltiples cascadas de señalización. Dentro de estas vías, se encuentran la vía de Ras, la vía de fosfadilinositol-3 cinasa (PI3K) y la vía de las MAP cinasas (MAPK). Esta activación resulta en un incremento en la proliferación y supervivencia celular (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Marley y Gordon, 2005; Deininger y Druker, 2003). Las proteínas Ras están implicadas en diversas vías de

señalización celular que controlan diferentes fenómenos como: apoptosis, proliferación, diferenciación, adhesión, integridad del citoesqueleto y migración celular (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Deininger y cols. 2000). Por otra parte, la vía PI3K funciona en la regulación del metabolismo lipídico fosfoinositídico y en la generación de segundo mensajeros lipídicos relacionados con la transducción de señales. Se ha visto que una subunidad de esta proteína se fosforila en residuos tirosina en células que expresan BCR-ABL y forma complejos con *cbl* y moléculas adaptadas *crk* y *crkl*. PI3K está activado de forma constitutiva por la translocación BCR-ABL jugando un papel importante en su transformación. Y finalmente, la activación de la vía Jak-Stat (Stat1 y Stat5) contribuye a la transformación maligna en células BCR-ABL que no requieren previa fosforilación de proteínas Jak, llevándolas a un efecto anti-apoptótico e implicando la activación transcripcional de Bcl-cL (Quintás-Cardama y Cortes, 2009; Deininger y Druker, 2003).

3.2.3 Adhesión reducida al estroma celular y a la matriz extracelular

La LMC esta clínicamente caracterizada por que la MO libera prematuramente células progenitoras, un fenómeno que puede atribuirse a defectos en las propiedades de adherencia de estas células. Los efectos de la proteína BCR-ABL intracelular en un sustrato específico, puede causar una alteración en la estructura del citoesqueleto, que provoca una perturbación dentro y fuera de las moléculas de adhesión (Deininger y Druker, 2003; Pelletier y cols., 2004). Se ha sugerido un importante papel de las integrinas β en la interacción entre el estroma y las células progenitoras. Las células en la LMC expresan una inhibición en la adhesión de la variante integrina $\beta 1$ no encontrada en los progenitores normales (Chávez- González y cols., 2009; Lewis y cols., 1996).

3.2.4 Inhibición de la apoptosis

En la LMC, múltiples mecanismos contribuyen a la inhibición de la apoptosis. La fosforilación y la activación de la vía PI3K es una ruta importante por la que la proteína BCR-ABL ejerce su efecto anti-apoptotico. Esta vía activa a la proteína cinasa B (PKB por sus siglas en inglés), resultando en la fosforilación y en la activación de la proteína pro-apoptotica

BAD, un miembro de la familia Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2 esta constituida por 15 miembros, algunos de ellos activan (Bad, Bax, Bid) y otros inhiben la apoptosis. Las proteínas inhibidoras de la apoptosis representadas por Bcl-2, Bcl-xl y Mcl-1 se insertan como proteínas integrales en la membrana del retículo endoplasmático, membrana nuclear y membrana externa de las mitocondrias estabilizándolas, asegurando su integridad, evitando el aumento de permeabilidad y por ende de la apoptosis (De Castro y cols., 2005).

Por otro lado, BCR-ABL media la activación de STAT5 y el incremento de los niveles de Bcl-xl pueden aumentar la resistencia a apoptosis. Por lo tanto, la generación de apoptosis o anti-apoptosis dependerá del predominio de proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas (Bad, Bax) versus anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl) (Quintás-Cardama y Cortes, 2009).

3.3 Tratamientos utilizados en el manejo de la LMC

En toda enfermedad, la eficiencia de un tratamiento está determinada por distintos criterios, siendo el más importante de ellos la tasa de supervivencia de los pacientes. En el caso de la LMC, los criterios establecidos incluyen: la remisión hematológica completa (CHR por sus siglas en inglés) es decir la cuenta normal de células sanguíneas (incluyendo las células blancas); la desaparición completa de signos y síntomas de la enfermedad; y la respuesta citogenética completa (CCR por sus siglas en inglés), caracterizada por la ausencia total de metafases Ph⁺ (O'Brien y cols., 2010; Chávez-González y cols., 2009).

Hasta la década de 1980, la LMC fue considerada inexorablemente fatal ya que existían tratamientos que ofrecían a los pacientes la disminución de la sintomatología pero sin prolongación de vida. El busulfán fue incluido en el tratamiento contra la LMC aunque es extremadamente tóxico para los HPC. Las siguientes drogas efectivas en el tratamiento de la LMC fueron la hidroxiurea y la citarabina (o arabinósido de citosina) que presentan menor efecto tóxico que el busulfán. Su efecto principal es bloquear la proliferación, actuando específicamente en la fase de síntesis del ciclo celular, lo que provoca una disminución en la cuenta leucocitaria, así como disminución del tamaño del bazo. Sin embargo, son incapaces de inducir remisiones citogenéticas, excepto cuando se usan a muy altas dosis, lo que causa gran toxicidad y daño no selectivo en células normales en división (Chávez-González y cols.,

2009). Con el empleo de estas drogas el paciente progresa a la fase acelerada y finalmente a la crisis blástica en un período promedio de 58 meses (Fausel, 2007).

El interferón alfa (IFN- α), fue introducido como tratamiento principal en la LMC a principios de la década de 1980, este fármaco es capaz de suprimir la proliferación celular en la LMC y prolongar así la supervivencia de los pacientes. Esta glicoproteína con propiedades antivirales y antiproliferativas demostró su superioridad por encima del busulfán y la hidroxiurea, pues si es empleado durante la fase crónica de la enfermedad produce CHR en 80% de los pacientes y CCR en 26% de los mismos. Al ser utilizado en combinación con citarabina se obtienen mejores resultados, alcanzando 91% de CHR y 58% de CCR (Chávez-González y cols., 2009; Quintás-Cardama y Cortes, 2006). Desde el punto de vista biológico y molecular el IFN- α puede generar toxicidad selectiva contra la clona leucémica, incrementar la regulación inmune y/o modular la hematopoyesis a través del MH (Tsao y cols., 2002), esto último se logra al restaurar la adherencia al estroma de células CD34+ mediante la inducción de moléculas como L-selectina, β 2-integrina, ICAM-1 e ICAM3 (Martín-Henao y cols., 2000).

Hasta el momento, el único tratamiento que ofrece a una proporción substancial de pacientes con LMC la probabilidad de una supervivencia libre de leucemia a largo plazo (LFS) y la posibilidad de curación, es el trasplante alogénico de HSC derivadas de SPM ó MO de un donador HLA-idéntico (Haplotipos-idénticos) (Chávez-González y cols., 2009; Quintás-Cardama y Cortes, 2006). Datos recogidos por el Registro de Trasplantes de Médula Ósea (IBMTR por sus siglas en inglés) mostraron una LFS a los 18 años del 50% (Quintás-Cardama y Cortes, 2006). No obstante, sólo cerca del 30% de pacientes tienen uno o más hermanos genéticamente idénticos en cuanto a HLA y utilizando límites de edad convencionales, el 50% de pacientes no entrarán en el rango de edad (>55 años) para un trasplante (Mughal y Goldman, 2001). De este modo, sólo el 15% de todos los pacientes serán elegibles como donantes para trasplantes. Por lo tanto, los esfuerzos se han centrado en encontrar otras opciones de tratamiento a nivel molecular, generando así fármacos más específicos y con menos daños colaterales.

Entre estos fármacos, el primero en surgir fue el STI571 (ahora IMATINIB; Gleevec®, Novartis Pharmaceuticals), el cual es una molécula pequeña que funciona como un inhibidor de cinasa de tirosina; los casos de resistencia a este fármaco, han llevado a proponer el uso de dos nuevos inhibidores de BCR-ABL (2ª generación). El primero, denominado Nilotinib

(AMN107) fue desarrollado por Novartis Pharmaceutical y ha mostrado disminuir entre 20 y 50 veces más la proliferación de células que expresa la proteína BCR-ABL que el Imatinib (Weisberg y cols., 2006). El otro inhibidor, nombrado formalmente Dasatinib (BMS-354825) y desarrollado por Bristol-Myers Squibb, es una molécula inhibidora dual capaz de bloquear la actividad cinasa tanto de ABL como de SRC; estudios *in vitro* han demostrado que este fármaco es capaz de inhibir hasta 300 veces más la proliferación de diversas líneas celulares transfectadas con las formas silvestres y mutantes de BCR-ABL, así como de disminuir la proliferación de HSC en donde además se detecta una disminución de la actividad cinasa (Copland y cols., 2006).

3.3.1 Imatinib: Mecanismo de acción y efectos biológicos

Siguiendo la observación de que la proteína BCR-ABL tiene un papel central en la patogénesis de la LMC, se hicieron esfuerzos para desarrollar tratamientos que inhibieran la actividad constitutiva de la cinasa de tirosina asociada a ABL. Uno de estos componentes fue el Imatinib, una 2-fenilaminopirimidina STI 571 (conocido previamente como CGP 57148B). Esta es una molécula pequeña antagonista con actividad frente a las cinasas de tirosina proteínicas. El Imatinib actúa específicamente bloqueando el lugar de unión para el ATP en la cinasa ABL, lo que inhibe la capacidad de ésta para transferir grupos fosfato desde el ATP y residuos de tirosina fosforilados de proteínas sustratos, lo que a su vez, impide la transducción de las señales necesarias para la proliferación celular y la apoptosis inducida por ABL. De este modo la vía específica de transducción de señales activada anormalmente en el proceso de transformación leucémica resulta inactivada por el Imatinib (Figura 8) (De Kogel y Schellens 2007; Savage y Antman, 2002).

Druker y cols., (1996) demostraron que la molécula STI 571 suprime selectivamente el crecimiento de líneas celulares de LMC y colonias BCR-ABL+ obtenidas de pacientes con LMC, demostrando la inhibición de todas las cinasas de tirosina ABL (ABL celular, ABL viral y BCR-ABL) (Druker y cols., 1996). En 1999 se presentaron los resultados preliminares con el fármaco, ya nombrado mesilato de Imatinib. Su introducción como agente terapéutico estuvo precedida por los estudios que permitieron avalar sus resultados. La fase I comenzó en 1998 en 3 centros de los Estados Unidos de Norteamérica e inicialmente solo se incluyeron

pacientes en FC resistentes o intolerantes al interferón. Al observarse buenos resultados se permitió la inclusión de pacientes en fases avanzadas. Este estudio fue realizado con el objetivo de establecer la tolerancia, la dosis máxima a utilizar y la posibilidad de obtener evidencias tempranas sobre el efecto antileucémico basado en respuesta hematológica y citogenética (Cohen y cols., 2002). Se utilizaron dosis escalonadas y constó de 2 grupos separados: uno comprendía los casos de FC y el otro incluyó pacientes con LMC en CB, con LLA Ph+ y con LMA (De Kogel y Schellens 2007; Deininger y cols., 2005). Se llegó a la conclusión de que el medicamento era bien tolerado y los efectos secundarios eran poco frecuentes, además se consiguió respuesta hematológica y citogenética en todas las fases de la enfermedad en un tiempo relativamente corto (De Kogel y Schellens 2007; Cohen y cols., 2002).

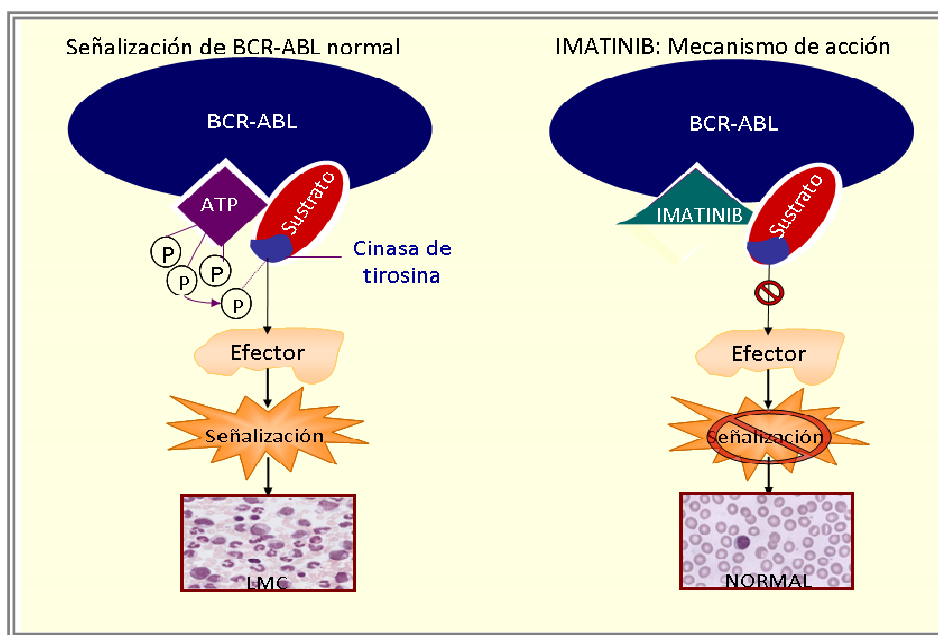


Figura 8. Representación esquemática del modo de acción del inhibidor de cinasa de tirosina: Imatinib.

La fase II permitió confirmar los resultados de la fase 1. Estuvo constituida por 3 estudios: uno que incluyó pacientes con LMC en FC con criterios de resistencia a INF- α y en los otros 2 se incorporaron pacientes con LMC en fases avanzadas. Estos estudios eran multicéntricos, internacionales, con criterios amplios de inclusión y permitieron el uso de dosis escalonadas en caso de respuesta insuficiente o pérdida de la respuesta conseguida. Se concluyó que el tratamiento prolongado con Imatinib después del fallo al tratamiento con INF

era bien tolerado y permitía alcanzar tasas altas de respuestas (Kantarjian y cols., 2002; Talpaz y cols., 2002; Sawyers y cols., 2002).

La fase III consistió en el estudio internacional aleatorizado en el que se comparó el INF- α con el Imatinib. Los puntos a valorar en ambas poblaciones fueron: la supervivencia libre de progresión, la calidad de vida y la toxicidad relacionada con la enfermedad y con el tratamiento. Tras el análisis de los datos del ensayo, se realizó una enmienda que permitió a los pacientes del grupo del INF- α /citarabina cambiar a Imatinib si no aparecía una respuesta citogenética mayor después de un año de tratamiento, en lugar de los 2 años propuestos inicialmente. Las conclusiones fueron que el Imatinib era efectivo como terapia de primera línea en la LMC en FC de nuevo diagnóstico, asimismo, que inducía excelentes tasas de respuesta hematológica y citogenética comparado con el INF- α /citarabina (Hahn y cols., 2003). El Imatinib resultó bien tolerado y los pacientes con este tratamiento lograron una mejor calidad de vida. Finalmente, fue aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) en Mayo del 2001, como tratamiento estándar de primera línea para la LMC (Kantarjian y cols., 2003; Cohen y cols., 2002).

El uso de Imatinib en México se ha recomendado como tratamiento de primera línea con una dosis inicial de 400 mg/día para pacientes en FC. En el caso de sujetos con resistencia a Imatinib se sugiere incrementar la dosis de forma escalonada y las dosis de 600 a 800 mg/día se recomiendan en terapias combinadas, así como en pacientes con fase blástica o enfermedad residual (Góngora-Bianchi y cols., 2005).

3.3.1.1 Inhibición de otras cinasas y su uso clínico en otros padecimientos

Aunque inicialmente el Imatinib fue diseñado para la inhibición específica de la proteína quimérica BCR-ABL, esta molécula es capaz de alterar la actividad de otras proteínas debido a la similitud que existe entre sus dominios de cinasa. Además de BCR-ABL, el Imatinib puede inhibir la actividad de ABL en forma nativa (Buchdunger y cols., 1996), al receptor del SCF (c-Kit), al receptor del factor derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) (Buchdunger y cols., 2000), al receptor del M-CSF(c-FMS) (Dewar y cols., 2005) y la vía de TGF- β (Wang y cols., 2005). En clínica se ha aprovechado esta capacidad para inhibir otras

cinastas permitiendo su uso en otros padecimientos en el que estén involucrados estos receptores.

En estudios *in vivo* y en ensayos clínicos, el Imatinib inhibe la proliferación e induce la apoptosis en las células de tumores del estroma gastrointestinal (GIST por sus siglas en inglés), las cuales expresan al proto-oncogen c-kit, por lo que en Febrero del 2002 fue aprobado por la FDA como tratamiento para este padecimiento. Por otra parte, se recomienda el uso del Imatinib en: pacientes adultos con síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos asociados con el reordenamiento del gen del PDGFR; pacientes adultos con síndrome hipereosinofílico avanzado y/o leucemia eosinofílica crónica con reordenación de FIP1L1-PDGFRD; y pacientes adultos con dermatofibrosarcoma protuberans no resecable y/o recurrente que no son de elección para cirugía (Klion y cols., 2004; Lee y cols., 2006; Heinrich y cols., 2003).

II. ANTECEDENTES

1. Estudios sobre las MSC en la LMC

Se ha descrito que las MSC provenientes de pacientes con LMC son similares a su contraparte normal, ya que no muestran daños en su cariotipo, no expresan el re-arreglo BCR-ABL y tienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Gómez, 2009; Carrara y cols., 2007; Jootar y cols., 2006; Zhao y cols., 2006). Por otra parte, no son capaces de desarrollar tumores en ratones inmunodeficientes (Zhao y cols., 2006) y permiten la expansión de HSC CD133⁺ de SCU (Jootar y cols., 2006). Lo anterior sugiere, que las MSC provenientes de LMC son funcionalmente normales. No obstante, Colmone y cols. (2008) demostraron que células leucémicas intervienen en el nicho normal y crean un nicho anormal. Estos autores utilizaron la técnica de imagen dinámica *in vivo* en un ratón leucémico e inmunodeficiente al que trasplantaron células CD34⁺ humanas y lo que observaron fue que las células leucémicas secuestran a las células CD34⁺ trasplantadas, disminuyendo en número a lo largo del tiempo y fallando en la movilización hacia sangre periférica en respuesta a la estimulación con citocinas. En este mismo trabajo se neutralizó el SCF secretado por las células leucémicas, obteniendo una inhibición por parte de las células CD34⁺ para migrar hacia los nichos leucémicos, recuperando así su proliferación y su capacidad para salir a circulación. Sugiriendo que el microambiente leucémico causa disfunción de progenitores hematopoyéticos normales, modificando la expresión de citocinas en el nicho y así afectando sus patrones de migración. De hecho, Shirasaki y cols. (2011) demostraron en células CD45⁺ provenientes de pacientes con LMC, cambios morfológicos y funcionales durante cultivos primarios a largo plazo, en los que la morfología de estas células cambió hacia miofibroblastos (CD13⁻ Actina de músculo liso⁺ proteína específica de fibroblastos¹⁺ CD34⁻) manteniendo la expresión de BCR-ABL y produciendo citocinas como G-CSF, IL-6 y VEGF-A. Al cultivar estos miofibroblastos con células hematopoyéticas no adherentes de LMC, estas últimas proliferaron significativamente, sin embargo al neutralizar VEGF-A en el cultivo inhibieron su proliferación. Lo que sugiere, que las células leucémicas pueden cambiar su morfología para formar un nicho y producir una gran cantidad de citocinas que promueven la proliferación de las células de LMC. Si supusiéramos que este fenómeno se reproduce *in vivo*, dichas citocinas

interactuarían con el resto del microambiente y probablemente favorecerían el fenotipo leucémico.

En contraparte, Zhang y Zhang (2009) demostraron por medio de un ensayo de co-cultivo la influencia de las MSC obtenidas de donadores sanos en la inhibición de la proliferación de CMN de LMC, al expresar niveles altos de INF- α . Esta inhibición de la proliferación sugiere una alteración de las MSC al interactuar con células malignas, pues este incremento en la expresión del INF- α sólo se dio en la presencia de las mismas. Asimismo, se ha demostrado que al co-cultivar células CD34+ obtenidas de pacientes con LMC y MSC obtenidas de donadores sanos, estas últimas protegen a las células leucémicas de una muerte inducida por un inhibidor de cinasa de tirosina, reduciendo la activación de la caspasa-3 y la modulación de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-XL (Vianello y cols., 2010).

A pesar de que las MSC de LMC presentan características similares a su contraparte normal, las evidencias anteriores muestran que la influencia ejercida por las células leucémicas puede tener consecuencias en su funcionamiento, incluso en la presencia de inhibidores de cinasas de tirosinas como el Imatinib.

2. Efecto del Imatinib en las MSC

El uso del Imatinib en México se ha recomendado como tratamiento de primera línea y aunque ha tenido una excelente respuesta en la remisión celular de los pacientes, con el tiempo se ha visto que no es capaz de eliminar por completo a las células leucémicas, y que una vez que se interrumpe el tratamiento los pacientes recaen (Usuki y cols., 2005), por lo que es necesario su uso por períodos prolongados de tiempo. Por otra parte, a pesar de su especificidad para inhibir la cinasa de tirosina BCR-ABL, se ha reportado que el Imatinib tiene efectos en las MSC y su progenie, al inhibir otros receptores de cinasas importantes para su funcionamiento, como es el PDGF-R. Este factor de crecimiento interviene en el proceso de diferenciación osteogénica y adipogénica de las MSC, pues se ha observado que éste inhibe la expresión de fosfatasa alcalina en los osteoblastos y al mismo tiempo disminuye la formación de depósitos de calcio (O'Sullivan y cols., 2007; Chaudhary y cols., 2004). Además, la delección del PDGF-R disminuye la proliferación y migración de las MSC murinas, que al

diferenciarse hacia osteoblastos presentan una actividad de la fosfatasa alcalina mas temprana e intensa con respecto a las células que pueden responder a este factor (Tokunaga y cols., 2008). Por otro lado, la activación del PDGF-R tiene un efecto estimulador en MSC derivadas de MO (Gronthos y Simmons, 1995) y se ha reportado que incrementa su potencial para sostener la hematopoyesis, como resultado de la elevación en los niveles de algunas moléculas como son la β -catenina y la N-cadherina (Miura y cols., 2006), las cuales son importantes reguladoras de los nichos hematopoyéticos (Hosokawa y cols., 2010; Haug y cols., 2008; Hosokawa y cols., 2007; Calvi y cols., 2003; Zhang y cols., 2003). En cuanto a la adipogénesis, se ha reportado que la diferenciación terminal de la línea celular murina de fibroblastos preadipocíticos (3T3-L1) va acompañada por una disminución en la expresión de los receptores α y β de PDGF. Esta reducción precede a los cambios morfológicos: la acumulación de vacuolas lipídicas y la expresión de genes adipocíticos (Vaziri y cols., 1996). Además, otros estudios han demostrado que el PDGF α inhibe la adipogénesis de células estromales humanas obtenidas de tejido adiposo (Levi y cols., 2010). Así, el PDGF es un factor esencial para las MSC, pues si es inhibido como ocurre en el caso del tratamiento con Imatinib, es capaz de alterar los patrones de proliferación y diferenciación de las MSC, promoviendo cambios en el MH.

En un inicio, se encontraron evidencias de que el Imatinib puede alterar el metabolismo óseo de pacientes con LMC. Berman y cols. (2006) realizaron un estudio retrospectivo en pacientes con LMC y pacientes con tumores gastrointestinales bajo tratamiento con Imatinib y encontraron que estos pacientes presentaron bajos niveles de fosfato en suero (hipofosfatemia), valores disminuidos de calcio total y un incremento en los niveles de la hormona paratiroidea sérica. En otro estudio se reportó que los pacientes tratados con Imatinib durante un período de tres a seis meses, presentaron niveles elevados de marcadores de formación de hueso como son: osteocalcina y el propéptido N-terminal de procolágena tipo I; además de hipofosfatemia, disminución en los niveles de calcio y el desarrollo de hiperparatiroidismo secundario (Grey y cols., 2006). Lo anterior concordó con lo reportador por Osorio y cols. (2007), donde reportaron que 36 pacientes con LMC mostraron hipofosfatemia después de 3 meses de tratamiento con Imatinib que fue sostenida hasta el final del análisis a los 12 meses.

Como soporte a esta evidencia, Fitter y cols. (2008) encontraron que los pacientes con LMC tratados con Imatinib por períodos largos de tiempo (2 a 4 años), presentan un aumento en el volumen trabécular óseo y corroboraron una vez más las concentraciones bajas de calcio e hipofosfatemia en estos pacientes. En un trabajo subsecuente, por Jönsson y cols. (2008), la densidad mineral ósea (BMD por sus siglas en inglés) fue examinada en pacientes con LMC tratados con Imatinib por 24 a 73 meses. Los pacientes tratados presentaron una mayor BMD en cadera, que se corroboró por una absorciometría radiográfica de energía dual, lo que también estuvo asociado a una hipofosfatemia, disminución de calcio sérico y la disminución de los niveles séricos de marcadores de formación de hueso.

Esta modificación en el metabolismo óseo de los pacientes con LMC tratados con Imatinib, podría explicarse por la alteración que ocasiona este fármaco en la diferenciación y funcionalidad de los osteoblastos provenientes de las MSC, debido a la inhibición de la señalización mediada por PDGF-R.

Diferentes estudios han demostrado que el Imatinib puede alterar a los osteoblastos y a las MSC a través de la inhibición del PDGF-R, disminuyendo *in vitro* la proliferación de los osteoblastos pero incrementando su actividad. Fitter y cols. (2008), reportaron que al tratar MSC de explantes óseos con Imatinib bajo condiciones osteogénicas, éstas aumentan la deposición de hidroxapatita (cristales de calcio característicos de la matriz ósea), la expresión de genes osteoblásticos como BMP-2 y osterix, pero disminuyen su proliferación. También observaron que el PDGF puede inhibir la diferenciación osteogénica y que el Imatinib contrarresta el efecto, aumentándola en forma dosis dependiente. De manera similar en líneas celulares de osteoblastos de rata, el Imatinib incrementa la mineralización de la matriz extracelular y la expresión de marcadores osteoblásticos como la fosfatasa alcalina, la sialoproteína de hueso (BSP por sus siglas en inglés) y la osteocalcina, en forma dosis dependiente. Por otro lado, encontraron que también puede inhibir la osteoclastogénesis al interferir con la función del receptor del M-CSF (O'Sullivan y cols., 2007; Dewar y cols., 2005). Por otro lado, Tibullo y cols., (2009) reportaron que las MSC de donadores sanos, tras ser cultivadas con Imatinib solo o con medio osteogénico mostraron cambios en su morfología, presentaron mineralización extracelular e incremento de la expresión de marcadores osteogénicos como RUNX2, osteocalcina y BMP-2, favoreciendo así la osteogénesis.

Lo anterior concordó con lo reportado por Fierro y cols., (2007), donde se demostró la inhibición de la proliferación de MSC de individuos sanos tratadas con Imatinib, así como la alteración de su capacidad para mantener la hematopoyesis *in vitro*, y la disminución del número y tamaño de las CFU-F. Sin embargo, de forma contradictoria a lo antes descrito, estos autores encontraron que el Imatinib inhibe la diferenciación osteogénica disminuyendo la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual utilizaron como marcador de osteoblastos (Fierro y cols., 2007).

Finalmente, en nuestro grupo de trabajo se analizó *in vitro*, la frecuencia, el fenotipo, la expresión de moléculas de adhesión, la capacidad de proliferación y diferenciación de las MSC obtenidas de pacientes con LMC tratados con Imatinib, obteniendo que estas células presentan características similares a su contraparte normal, aunque con una menor frecuencia pero capacidad para proliferar similar, sugiriendo que el efecto que tiene el Imatinib en las MSC de los pacientes es reversible (Gómez, 2009).

Considerando todo lo anterior, se puede concluir que el Imatinib afecta la proliferación de las MSC, así como su diferenciación hacia osteoblastos al inhibir al PDGFR, lo que podría modificar su capacidad funcional.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con las evidencias referidas anteriormente, podemos decir que hasta el momento, se sabe que el Imatinib inhibe la proliferación de las MSC *in vitro* e incrementa su diferenciación hacia osteoblastos, lo que se ve reflejado *in vivo* puesto que existen datos de alteración en el metabolismo óseo de los pacientes tratados con el fármaco. Estos cambios son mediados principalmente por la inhibición del PDGF-R. No obstante, a pesar de que las MSC tienen un papel sumamente importante en el mantenimiento de la hematopoyesis normal, no se ha estudiado si las MSC de pacientes tratados con Imatinib tienen alterada su capacidad funcional. Por lo anterior, el presente trabajo pretende evaluar la capacidad funcional para soportar la hematopoyesis normal *in vitro* de las MSC obtenidas de pacientes con LMC tratados con Imatinib. En particular, se analizará la capacidad funcional para soportar la proliferación y mantenimiento de las HSC así como de progenitores hematopoyéticos.

IV. HIPÓTESIS

Las MSC de pacientes con LMC tratados con Imatinib, tendrán alterada la capacidad funcional para sostener la hematopoyesis normal.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el soporte hematopoyético de las MSC obtenidas de médulas ósea de pacientes con LMC y de pacientes con LMC tratados con Imatinib.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener una población pura de MSC a partir de médula ósea de pacientes con LMC al momento del diagnóstico, de pacientes tratados con Imatinib, de pacientes tratados con otro fármaco y de médula ósea normal como control.
- 2.- Evaluar la capacidad funcional para sostener la hematopoyesis normal de las MSC provenientes de los cuatro grupos de estudio.
- 3.- Evaluar la expresión de la molécula N-cadherina en las MSC de los cuatro grupos de estudio así como en las HSC de sangre periférica antes y después de ser co-cultivadas.

VII. METODOLOGÍA GENERAL

1. Obtención de las muestras biológicas

Los aspirados de médula ósea normal (MON) fueron obtenidos de individuos sanos provenientes del Hospital infantil de México Federico Gómez y del Centro Médico ABC, así como de muestras de raspado medular óseo obtenido de pacientes ortopédicos sometidos a cirugía de cadera sin alteración hematológica procedentes del Hospital Regional No. 2 Villacoapa del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); las muestras de pacientes recientemente diagnosticados con LMC (VLMC) así como de los pacientes con LMC tratados con Imatinib (ILMC) u otro fármaco (OLMC) (Dasatinib, Hidroxiurea) se obtuvieron del servicio de Hematología del Centro Médico Nacional SXXI (CMN SXXI), La Raza, IMSS y del servicio de Hematología del CMN SXXI, Hospital de Especialidades, IMSS. De este último hospital, también se obtuvieron las muestras de SPM de donadores sanos. Los pacientes fueron sometidos a la toma de un aspirado de médula ósea en la cresta ilíaca posterosuperior como parte de las pruebas clínicas de rutina y de cariotipo, previo consentimiento informado. Las muestras de aspirado medular fueron obtenidas bajo anestesia local, en jeringas de plástico heparinizadas, recolectando entre 3 y 7 ml de muestra para procesarse preferentemente el mismo día. Las muestras de raspado medular se obtuvieron bajo anestesia general durante la cirugía de cadera, en tubos de 50 ml previamente preparados con heparina y 15 ml de medio RPMI (Gibco). Los donadores de SPM fueron sometidos a un tratamiento con factor estimulador de colonias granulocítico en dosis total de 5 μ g/kg/día durante 2 días previos a la toma de la muestra (Quittet y cols., 2006).

2. Obtención de MSC

Las muestras de raspado medular fueron lavadas 4 veces con buffer de fosfatos (PBS pH 7.4) (Gibco). En cada lavado se agregó 5 ml de PBS para después vortexear a velocidad media por 20 segundos, tomando el sobrenadante en cada ocasión, obteniendo así una suspensión celular sin tejido. Por otra parte, las muestras de aspirado medular fueron colocadas en un tubo de 15 ml y se centrifugó durante 8 minutos a 1200 revoluciones por

minuto (rpm) para obtener el “Buffy coat” que contiene la mayoría de células blancas y plaquetas. Se tomó la interfase entre las células rojas y el plasma, y el “Buffy coat” fue diluido 1:2 con PBS.

Una vez que se obtuvieron las suspensiones celulares diluidas, se sometieron a un gradiente de densidad (Ficoll-Paque®, Pharmacia Biotech). Para ello, se agregó Ficoll en un tubo de 15 o 50 ml (dependiendo del volumen de la suspensión) y la muestra diluida en una relación de 1:2, evitando su mezcla. Después se centrifugó durante 30 minutos a 300 gravedades (g). Se tomó la interfase donde se encuentran las CMN y se lavó con PBS, centrifugando durante 8 minutos a 1200 rpm, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en DMEM bajo en glucosa (Gibco) suplementado con SFB probado para el crecimiento de células mesenquimales (Hyclone) al 10% y 10 U/ml de penicilina (Gibco) (Medio suplementado). Las CMN se contaron con solución de Türk (Ácido acético glacial /azul de metileno H₂O destilada) y todas las células obtenidas se sembraron en cajas para cultivo celular en una concentración aproximada de 2×10^6 células por cm². Las MSC se obtuvieron por adhesión, es decir, se cultivaron durante 24 horas en medio suplementado a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se retiraron las células no adherentes lavando dos veces la caja de cultivo con 5 ml de PBS. Se agregó nuevamente medio suplementado fresco. El cambio de medio así como el seguimiento del cultivo fue realizado semanalmente.

3. Cultivo de MSC

Una vez obtenidas, las células adherentes fueron mantenidas en medio suplementado a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ para permitir su expansión. Cuando llegaron a confluencia, las células se tripsinizaron (Tripsina/EDTA 0.05%, Gibco) durante 8 minutos a 37 °C, deteniendo el proceso con 500 µl de SFB (Gibco). Posteriormente, se tomó la suspensión celular y se colocó en tubos de 15 ml, lavando las cajas con 5 ml de PBS para tomar todas las células faltantes. A continuación, las células se centrifugaron por 8 minutos a 1200 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en medio suplementado para su posterior conteo con azul de tripano. En esta primera tripsinización (Siembra cero, R0) se congelaron células para su posterior análisis. Los cultivos de las

siguientes resiembras se comenzaron con 5×10^4 / 1×10^5 células en botellas de 75 cm^2 con 10 ml de medio suplementado y se mantuvieron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , realizándoles cambio de medio cada semana hasta alcanzar confluencia. Los cultivos se tripsinizaron nuevamente y las células obtenidas en esta primera resiembra (R1) se utilizaron para realizar distintos ensayos.

Para la congelación celular, se agregaron 100 μl de dimetilsulfóxido y 500 μl de SFB (Gibco) en un criovial; la mezcla se dejó enfriar por 15 minutos en el refrigerador para después agregar las células (mínimo 3×10^5 /máximo 1×10^6 células) resuspendidas en un volumen de 400 μl de medio suplementado. Se taparon rápidamente, se homogeneizó la mezcla y se colocó a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. Evaluación del número de MSC por ensayos de CFU-F.

Para cuantificar la frecuencia de progenitores de MSC en cada una de las muestras, se realizó el ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F). Una vez obtenidas las CMN, se sembraron 1.5×10^5 y 3×10^5 células en cajas de petri de 35 mm (Corning) con 2 ml de medio suplementado. Las células fueron cultivadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 . Después de 14 días se retiró el medio, se lavó la caja dos veces con PBS y se dejó secando a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez secas, las células se tiñeron con 2.5 ml de Wright-Giemsa (Gibco) durante 3 minutos. Al transcurrir este tiempo se les agregó solución amortiguadora, se mezcló y se dejó durante 2 minutos (Gibco). Transcurrido este tiempo se lavaron con agua corriente y se dejaron secar nuevamente. Se realizó la cuantificación de colonias en un microscopio invertido (Olympus) tomando en cuenta todas aquellas agrupaciones de células que crecían en una misma dirección y con un centro definido. Además, se consideró la morfología de las células dentro de las colonias, clasificándolas como tipo fibroblastoide y tipo no fibroblastoide. Posteriormente, se evaluó el tamaño de las colonias generadas clasificándolas en tres grupos: pequeñas ($1\text{-}2 \text{ mm}^2$), medianas ($3\text{-}5 \text{ mm}^2$) y grandes ($>5 \text{ mm}^2$).

5. Cuantificación de HPC por ensayos de Colonias en cultivos semisólidos.

Los HPC capaces de formar colonias *in vitro* fueron evaluados en cultivos semisólidos de metilcelulosa (MethoCult™, Stem Cell Technologies). El medio de cultivo consistió en 0.9% de metilcelulosa, 30% de SFB, 1% de albúmina sérica bovina 10⁻⁴ M 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 50 ng/ml rhSF, 10 ng/ml rhGM-CSF y 3 U/ml rhEPO. Se colocaron 5 x 10⁴ CMN previamente obtenidas por un gradiente de densidad, en 1 ml de medio de cultivo semisólido, se vortexearon a una velocidad media por 10 segundos y se sembraron en cajas de petri de 35 mm (Corning). Después de 14 días de cultivo, las colonias fueron contabilizadas en la misma caja utilizando una caja petri cuadrículada como guía en un microscopio invertido (Olympus). Las colonias hematopoyéticas se clasificaron de la siguiente manera: CFU-MIX, colonias que contiene células mieloides y eritroides; BFU-E, concentrados de células eritroides de 20-50 células hemoglobinizadas; CFU-E, colonias eritroides de más de 50 células hemoglobinizadas agrupadas en uno o más concentrados. Colonias granulocíticas (CFU-G), colonias puras de macrófagos (CFU-M) y colonias que contiene granulocitos y macrófagos (CFU-GM).

6. Evaluación del inmunofenotipo por citometría de flujo.

Se analizó el inmunofenotipo de las poblaciones obtenidas con la finalidad de corroborar que expresaran los marcadores propios de las MSC. Para ello se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o alofococianina (APC): CD73-PE (2:50 µl, Becton-Dickinson), CD105-PE (1:50 µl, Caltag) y CD90-APC (1:50 µl, Caltag). Además, se evaluaron otros marcadores para descartar la presencia de células hematopoyéticas y endoteliales: CD14-PE (1:50 µl, Caltag), CD31-FITC (1:50 µl, Caltag), CD45-FITC (1:50 µl, Caltag) y HLA-DR-PE (1:50 µl, Caltag). De misma forma, se analizó la expresión de HLA-ABC-FITC (4:50 µl, Becton-Dickinson), CD140a-PE (PDGF-R α ; 2:50 µl, Becton-Dickinson) y CD140b-PE (PDGF-R β ; 2:50 µl, Becton-Dickinson). Para estos ensayos, las MSC de la segunda resiembra se resuspendieron en PBS con SFB al 2% y EDTA 1 mM (1 x 10⁵ células). Se incubaron con el volumen especificado del anticuerpo correspondiente durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente, se incubaron

10 minutos con 250 μ l de solución de lisis (Becton-Dickinson), transcurrido este tiempo se agregó 1 ml de PBS y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla obtenida en 250 μ l de PBS, almacenando las muestras protegiéndolas de la luz con papel aluminio común.

Se utilizó un control de células sin teñir pero sometidas al mismo procedimiento, para obtener la autofluorescencia. Las muestras fueron evaluadas en un citómetro FACS Calibur (Becton-Dickinson) ubicado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Se analizaron 10,000 eventos por tinción. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa BD Cell Quest Pro.

7. Evaluación de la capacidad de diferenciación de las MSC

7.1 Diferenciación osteogénica

Para inducir la diferenciación osteogénica, las MSC obtenidas en la R1 fueron cultivadas en 2 cajas de petri 35 mm a una concentración de 5×10^4 células, con 2.5 ml de medio suplementado a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio suplementado y se agregaron 2.5 ml de medio osteogénico (STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit) y se cultivaron durante 14 días. Los cultivos control se mantuvieron todo el tiempo en medio suplementado. Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana de manera muy cuidadosa para evitar el desprendimiento de la capa celular. Una vez que transcurrieron los 14 días, las células se tripsinizaron (Tripsina/EDTA 0.05%, Gibco) durante 10 minutos a 37 °C deteniendo el proceso con 500 μ l de SFB (Gibco). Posteriormente, las suspensiones con las células se colocaron en tubos de 15 ml, lavando 2 veces las cajas con 3 ml de PBS para tomar todas las células faltantes. A continuación, las células se centrifugaron por 8 minutos a 1200 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en medio suplementado para su posterior conteo con azul de tripano. Posteriormente, se hicieron laminillas en preparados de Citospin con 7 500 células cada una, se fijaron en metanol frío por 5 minutos y se mantuvieron en el congelador a -20 °C. Para corroborar la diferenciación osteogénica se realizó la tinción

histoquímica de fosfatasa alcalina, con la que se identifica la actividad de esta enzima característica de osteoblastos al entrar en contacto con sustrato.

7.1.1 Tinción histoquímica de Fosfatasa Alcalina

Una vez obtenidos los osteoblastos en las laminillas, se observaron al microscopio óptico para verificar que existieran suficientes zonas de conteo. Se delimitó la zona del botón celular con un plumón hidrofóbico (DAKO) y se agregó metanol frío (-20 °C), incubando por 5 minutos a -20 °C. Se removió el metanol completamente y se lavaron las células con agua desionizada. Se agregó el sustrato SIGMA FAST BCIP/NBGT, incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las laminillas fueron observadas bajo el microscopio para contabilizar un mínimo de 400 células positivas y negativas. La muestra se consideró como positiva para la diferenciación osteogénica al observar la aparición de una coloración morada en la célula, la cual indica el sustrato procesado por la enzima fosfatasa alcalina expresada por los osteoblastos.

7.2 Diferenciación adipogénica

Para inducir la diferenciación adipogénica, las MSC obtenidas en la R1 fueron cultivadas en 2 cajas de petri de 35 mm a una concentración de 1×10^5 células y en 4 pozos de una placa de 24 pozos con 2×10^4 células, con 2.5 ml y 1 ml de medio suplementado respectivamente, a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio suplementado y se agregaron 2.5 ml de medio adipogénico (STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit) y se cultivaron durante 14 días. Los cultivos control se mantuvieron todo el tiempo en medio suplementado. Los cambios de medio se realizaron dos veces por semana. Transcurridos los 14 días, las células se tripsinizaron (Tripsina/EDTA 0.05%, Gibco) durante 8 minutos a 37 °C deteniendo el proceso con 500 µl de SFB. Posteriormente, las suspensiones con las células se colocaron en tubos de 15 ml, lavando 2 veces las cajas con 3 ml de PBS para tomar todas las células faltantes. A continuación, las células se centrifugaron por 8 minutos a 1200 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en medio suplementado para su posterior conteo con azul

de tripano. Posteriormente, se hicieron laminillas en preparados de Citospin con 7 500 células cada una y se fijaron con formaldehído al 10% por 1 minuto. Tanto las laminillas como la placa de 24 pozos se resguardaron para la corroboración de la diferenciación adipogénica por medio de la tinción histoquímica de rojo oleoso, con la que se identifican grasas neutras, dando como resultado lípidos de color rojo brillante.

7.2.1 Tinción histoquímica de Rojo Oleoso

Una vez obtenidos los adipocitos en las laminillas, se observaron al microscopio óptico para verificar que existieran suficientes zonas de conteo. Se delimitó la zona del botón celular con un plumón hidrofóbico (DAKO) y se agregó propilenglicol absoluto por 5 minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el reactivo por completo y se agregó rojo oleoso, previamente filtrado y calentado a 60 °C. Las laminillas se mantuvieron con el reactivo durante 15 minutos en una estufa a la misma temperatura. Se retiró el rojo oleoso y se rehidrataron las muestras con propilenglicol al 85% durante 3 minutos. Se lavaron con agua destilada y se contratiñeron por 10 minutos con hematoxilina de Harris filtrada. Nuevamente, se lavaron con agua destilada y se montaron con solución para montar (SUPER MOUNT Biogenex). La tinción se repitió directamente en la placa de 24 pozos. Finalmente, las laminillas fueron observadas bajo el microscopio para contabilizar al azar un mínimo de 400 células positivas y negativas. La muestra se consideró como positiva para la diferenciación adipogénica, al observar células con vacuolas teñidas de color rojo brillante.

7.3 Diferenciación condrogénica

Para inducir la diferenciación condrogénica, las MSC obtenidas en la R1 fueron cultivadas con la técnica de micromasa. Para ello, se resuspendieron 8×10^4 células en 5 μ l de medio suplementado. La suspensión celular fue colocada en forma de gota al centro de un pozo en una placa de 48 pozos y se dejó por 2 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se agregó 0.5 ml de medio condrogénico (STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit) y se cultivaron durante 14 días. Los cultivos control se mantuvieron todo el tiempo en medio suplementado. Los cambios de medio se realizaron una

vez por semana de manera muy cuidadosa para evitar el desprendimiento del conglomerado celular formado. Una vez que transcurrieron los 14 días, se retiró el medio y se lavaron las células 2 veces con PBS. Para corroborar la diferenciación condrogénica se realizó la tinción histoquímica de azul alciano, la cual indica la producción de mucopolisacárido, característica de las células condrocíticas.

7.3.1 Tinción histoquímica de Azul Alciano

La diferenciación condrogénica fue evaluada por la presencia de un agregado compacto de células que se puede ver a simple vista y por la tinción de azul alciano. Para la tinción se lavaron las células 2 veces con PBS y se fijaron con 0.5 ml de formaldehído por 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el formaldehído y se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS. Después se les agregó el reactivo azul alciano, asegurándonos de cubrir completamente el área. Se incubó durante 30 minutos y una vez transcurrido este tiempo, se retiró el reactivo. Se lavaron con agua destilada y se montaron con solución para montar (SUPER MOUNT Biogenex). Finalmente, la placa fue observada bajo el microscopio. La muestra se consideró como positiva para la diferenciación condrogénica, al observar el conglomerado celular y la aparición de una coloración azul en el mismo, la cual indica la producción de mucopolisacárido, característica de las células condrocíticas.

8. Evaluación de la capacidad funcional para soportar la hematopoyesis de las MSC por sistema de co-cultivos

Para evaluar la capacidad que tienen las MSC para sostener la hematopoyesis normal, se realizaron co-cultivos con HSC CD133+ CD34+ Lin- de SPM.

8.1 Preparación de las capas de MSC

Para la preparación de las capas de MSC, las células obtenidas en la R0 de las ILMC y las OLMC y las células obtenidas en la R1 de las muestras de MON y de VLMC, fueron cultivadas en 10 pozos de una placa de 24 pozos a una concentración de 1×10^4 células, con 1

ml de medio suplementado a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ hasta alcanzar el 80% de confluencia (aproximadamente una semana). Una vez que la capa abarcaba el 80% de la caja, se les agregó una solución 2 µg/ml de mitomicina (Bristol) para inhibir la proliferación celular. La solución permaneció por 24 horas, después de ese período se lavó tres veces con PBS y se agregó medio suplementado fresco, reservando la placa a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por un máximo de una semana. Cabe mencionar que una de las capas de MSC de MON y una capa de VLMC se obtuvieron a partir de células congeladas en R0. Para descongelar las MSC, se calentó medio suplementado a 37 °C en dos cajas petri de 60 cm, después se descongeló el contenido del criovial sumergiéndolo en un vaso con agua a 37 °C y antes de que se descongelara por completo, se mezcló el medio suplementado y el contenido de criovial en una de las cajas petri, dejándolo reposar la mezcla a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se tomó el sobrenadante de la caja petri e inmediatamente se agregó nuevo medio suplementado temperado. El sobrenadante se centrifugó por 8 minutos a 1200 rpm, obteniendo la fracción celular y se lavó con 10 ml de PBS. Se repitió la centrifugación y se procedió al conteo celular con azul de tripano. Las células obtenidas se sembraron en la segunda caja petri con medio suplementado. Ambas cajas se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y se les realizó cambio de medio cada semana hasta alcanzar confluencia. Los cultivos se tripsinizaron y las células obtenidas se utilizaron para la preparación de las capas de MSC siguiendo el procedimiento descrito.

8.2 Obtención de CMN de sangre periférica movilizada

Las muestras celulares de SPM se obtuvieron de los remanentes encontrados en las bolsas utilizadas después de los trasplantes. Previo a la manipulación, la bolsa fue limpiada con alcohol al 70%. Posteriormente, se realizó un corte en la esquina superior por la que se accedió a la bolsa para lavarla con 10 ml de PBS. La suspensión celular obtenida fue sometida a un gradiente de densidad (Ficoll-Paque®, Pharmacia Biotech). Para ello, se agregó Ficoll en uno tubo de 15 ml así como la suspensión celular en una relación de 1:2, evitando su mezcla. Después se centrifugó durante 30 minutos a 300 g y se tomó la interfase donde se encuentran las CMN. Se lavaron con PBS, centrifugando durante 8 minutos a 1200 rpm, se eliminó el

sobrenadante y el botón celular se resuspendió en RPMI Medium 1640 (Gibco) suplementado con SFB (Hyclone) al 10% y 10 U/ml de penicilina (Gibco) (medio suplementado-2). Las CMN se contaron con solución de Türk. El 20% de las células obtenidas se sembraron en cajas para cultivo celular en una concentración aproximada de 4×10^6 células por cm^2 en medio suplementado-2, a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 para su uso al día siguiente. El 80% restante de las células obtenidas se enriquecieron por selección negativa en células de Lin- (descripción detallada posteriormente) y se congelaron para su posterior uso. Para la congelación de CMN, se agregan 100 μl de dimetilsulfóxido y 700 μl de SFB (Gibco) en un criovial; la mezcla se dejó enfriar por 15 minutos en el refrigerador para después agregar las células (mínimo 60×10^6 /máximo 200×10^6 células) resuspendidas en un volumen de 200 μl de SFB (Gibco). Se taparon rápidamente, se homogeneizó la mezcla y se colocó a -70 °C. Para la congelación de células Lin- se siguió la misma metodología pero con una concentración celular distinta en el criovial (mínimo 1×10^6 /máximo 5×10^6 células).

Para descongelar las células de Lin-, el medio suplementado se calentó a 37 °C en un tubo estéril de 15 ml, después se descongeló el contenido del criovial sumergiéndolo en un vaso con agua a 37 °C y antes de que se descongelara por completo, se mezcló el medio suplementado y el contenido de criovial en el tubo, dejándolo reposar la mezcla a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó la muestra por 8 minutos a 1200 rpm, obteniendo la fracción celular y se lavó con 10 ml de PBS. Se repitió la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 1 ml de PBS EDTA 2 mM al 0.5% de SFB frío y se procedió al conteo celular con azul de tripano. Las células se utilizaron inmediatamente en el enriquecimiento celular.

8.3 Enriquecimiento de HSC CD133+ CD34+ Lin- por selección positiva y negativa

Una vez obtenidas las CMN de SPM, se procedió a la obtención de HSC CD133+ CD34+ Lin- mediante un kit comercial (DIAMOND CD133 ISOLATION KIT HUMAN, Miltenyi CAT: 130-094-913). El proceso se realizó en dos pasos, primero las células de Lin+ fueron marcadas magnéticamente de manera indirecta con un cocktail de anticuerpos (linaje específicos: CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD61 y Glicoforina A) biotinilados y microperlas anti-biotina. Una vez separadas las células Lin+ magnéticamente,

las células enriquecidas fueron marcadas con microperlas CD133 para ser obtenidas a partir de la columna magnética.

Para el marcaje magnético de las células Lin⁺ se centrifugó la suspensión celular a 200 g x 10 minutos. Se eliminó el sobre nadante completamente y se resuspendió el botón celular en una relación de 50×10^6 cel/ 200 μ l buffer (PBS pH 7.2, 0.5% de SFB y 2 mM EDTA) (2-8 °C). Se agregaron 50 μ l de COCKTAIL DE ANTICUERPOS BIOTINILADOS LIN⁺ (DIAMON LIN⁺ BIOTIN-ANTIBODY COCKTAIL). Se mezcló e incubó por 10 minutos en el refrigerador (2-8 °C). Transcurrido este tiempo, se lavaron las células agregando de 2.5 a 5 ml de buffer frío y se centrifugaron a 300 g por 10 minutos. Se aspiró el sobrenadante completamente y se resuspendió el botón celular en 400 μ l de buffer. Se agregaron 100 μ l de MICROPERLAS ANTI-BIOTINA (ANTI-BIOTIN MICROBEADS), y se incubó por 15 minutos en el refrigerador (2-8 °C). Después, se lavaron las células agregando de 5 a 10 ml de buffer y se centrifugaron a 300 g por 10 minutos. Se aspiró el sobre nadante completamente y se resuspendió el botón celular en 1 ml de buffer. Los volúmenes manejados se calcularon por cada 50×10^6 células. Posteriormente se procedió a la separación magnética. Para ello se colocó una columna LD en el campo magnético de un separador MACS y se enjuagó con 2 ml de buffer. Inmediatamente después se colocó la suspensión celular dentro de la columna y se colectaron las células no marcadas que pasaron a través de la columna en un tubo estéril de 15 ml. Se lavó la columna 2 veces con 1 ml de buffer, colectando el afluente total en el mismo tubo, siendo ésta la fracción celular Lin⁻.

Una vez obtenidas las células Lin⁻, se centrifugaron a 300 g x 10 minutos. Se aspiró el sobre nadante completamente y se resuspendió el botón celular en 200 μ l de buffer. Se agregaron 50 μ l de MICROPERLAS DIAMANTE CD133 (CD133 DIAMOND MICROBEADS) y se incubó por 30 minutos en el refrigerador (2-8 °C). Se lavaron las células agregando de 2.5 a 5 ml de buffer y se centrifugaron a 300 g por 10 minutos. Se aspiró el sobre nadante completamente y se resuspendió el botón celular en 500 μ l de buffer. Finalmente, se procedió a la separación magnética. Para ello se colocó una columna MS en el campo magnético de un separador MACS y se enjuagó con 500 μ l de buffer. Inmediatamente después se colocó la suspensión celular dentro de la columna y se colectaron las células no marcadas que pasaron a través de la columna en un tubo estéril de 15 ml. Se lavó la columna 4 veces con 5 μ l de buffer, colectando el afluente total en el mismo tubo, siendo esta la fracción

celular CD133- Lin-. Posteriormente, se añadió 1 ml de buffer dentro de la columna e inmediatamente se obtuvieron las células marcadas magnéticamente presionando firmemente el émbolo dentro de la columna, colectando el afluente total en un tubo estéril de 15 ml, siendo esta la fracción celular CD133+ Lin-. La fracción celular CD133+ Lin- fue enriquecida con una segunda columna MS repitiendo el proceso descrito. Una vez obtenidas las células de cada fracción celular se procedió al conteo celular final con azul de tripano.

Las CMN obtenidas antes del enriquecimiento (pre-separación o población inicial (PI)) y después del enriquecimiento (post-separación (PS)) fueron evaluadas por medio de citometría de flujo, con la finalidad de corroborar el enriquecimiento (porcentaje de células obtenidas con el fenotipo CD133+ CD34+ post-separación entre el porcentaje de células obtenidas con el fenotipo CD133+ CD34+ pre-separación), la pureza (porcentaje de células con el fenotipo CD133+ CD34+ obtenidas en la fracción post-separación) y la recuperación (número de células obtenidas con el fenotipo CD133+ CD34+ post-separación en relación al número de células CD133+ CD34+ contenidas en la pre-separación, es decir $PS \times 100 / PI$). Para ello se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados: CD34-APC (2:50 μ l, Becton-Dickinson), CD133-PE (1:50 μ l, Caltag), N-cadherina-Biotinilada (8:50 μ l, R&D), Streptavidina-FITC (1:50 μ l, Becton-Dickinson), CD45-FITC (1:50 μ l, Caltag), CD45-PE (1:50 μ l, Invitrogen) y CD45-APC (1:50 μ l, Invitrogen). Para estos ensayos, las CMN obtenidas antes del enriquecimiento (pre-separación) y después del enriquecimiento (post-separación) se resuspendieron en PBS con SFB al 2% y EDTA 1 mM ($1 \times 10^4 / 1 \times 10^5$ células). Se incubaron con el volumen especificado del anticuerpo correspondiente durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente, se incubaron 10 minutos con 250 μ l de solución de lisis (Becton-Dickinson), transcurrido este tiempo se agregó 1 ml de PBS y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla obtenida en 250 μ l de PBS, almacenando las muestras protegiéndolas de la luz con papel aluminio común. Los anticuerpos biotinilados fueron incubados por 20 minutos en oscuridad para después lavar con 1 ml de PBS, y centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregó la streptavidina. Se dejó incubar por 20 minutos en oscuridad y se continuó con el proceso descrito.

Se utilizó un control de células sin teñir pero sometidas al mismo procedimiento, para obtener la autofluorescencia y un control con streptavidina sola. Las muestras fueron

evaluadas en un citómetro FACS Calibur (Becton-Dickinson). Se analizaron 10,000 eventos por tinción y los datos obtenidos fueron analizados con el programa BD Cell Quest Pro.

8.4 Ensayos de co-cultivos

Una vez que se tuvieron las capas de MSC y las células hematopoyéticas enriquecidas, se procedió a realizar los ensayos de co-cultivos (Figura 9). Para ello, se retiró el medio suplementado de las capas de MSC previamente preparadas y se les agregaron 1×10^4 células enriquecidas CD133+ CD34+ por pozo en 6 pozos, resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo a largo plazo (Long Term Culture Medium, Stem Cell Technologies™) suplementado con 10 ng/ml de SCF, IL-6, TPO y FLT-3 (medio suplementado-3). Así mismo, se mantuvieron 2 pozos con MSC sin células enriquecidas y 2 pozos con células enriquecidas pero sin MSC; ambos cultivos se mantuvieron con medio suplementado-3. A todos los co-cultivos se les realizó medio cambio de medio a la semana durante 5 semanas, es decir, cada semana se retiraron 500 μ l de medio y se agregaron 500 μ l de medio fresco suplementado-3.

Se evaluó la proliferación de células nucleadas (CN), el contenido de los HPC, la expansión de las HSC CD133+ CD34+ así como su expresión de N-cadherina en dos fracciones del cultivo: la fracción no adherente (No Adh) considerada como las CN no adheridas a las MSC y la fracción adherente (Adh) considerada como las CN adheridas a las MSC. Para ello, se obtuvo la fracción No Adh tomando todo el sobrenadante de 4 pozos y lavando suavemente la capa con 3 ml de PBS, con la finalidad de conseguir todas las CN no adheridas a la MSC. Posteriormente, las capas de MSC se tripsinizaron (Tripsina/EDTA 0.05%, Gibco) durante 8 minutos a 37 °C, deteniendo el proceso con 500 μ l de SFB (Gibco). Este procedimiento también se realizó en el control de las capas de MSC sin células enriquecidas. Posteriormente, se tomaron las suspensiones con las células y se colocaron en tubos de 15 ml, lavando las cajas con 3 ml de PBS para tomar todas las células faltantes. A continuación, las células de ambas fracciones, así como de los controles se centrifugaron por 8 minutos a 1200 rpm, se retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en PBS con SFB al 5% y EDTA 1mM para su posterior conteo con azul de tripano; esto con la finalidad de evaluar la proliferación celular (día 21 y día 35). Por otra parte, la evaluación del contenido de

los HPC se realizó con un ensayo de metilcelulosa (previamente descrito), sembrando 5 000 CN al día 21 y 10 000 CN al día 35.

La expansión de las HSC CD133+ CD34+ así como la expresión de N-cadherina fueron evaluadas por medio de citometría de flujo al día 21. Para ello, se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados: CD34-APC (2:50 μ l, Becton-Dickinson), CD133-PE (1:50 μ l, Miltenyi), N-cadherina-Biotinilada (8:50 μ l, R&D), Streptavidina-FITC (1:50 μ l, Becton-Dickinson), CD45-FITC (1:50 μ l, Caltag), CD45-PE (1:50 μ l, Invitrogen), CD45-PECy5.5 (1:50 μ l, Invitrogen), CD45-APC (1:50 μ l, Invitrogen) y CD73-PE (2:50 μ l, Becton-Dickinson). Para estos ensayos, las CMN obtenidas después del co-cultivo se resuspendieron en PBS con SFB al 2% y EDTA 1 mM ($1 \times 10^4/1 \times 10^5$ células). Se incubaron con el volumen especificado del anticuerpo correspondiente durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente, se agregó 1 ml de PBS y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla obtenida en 250 μ l de PBS mas 5% de SFB, almacenando las muestras protegiéndolas de la luz con papel aluminio común y en hielo. Los anticuerpos biotinilados fueron incubados por 20 minutos en oscuridad para después lavar con 1 ml de PBS, y centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregó la streptavidina. Se dejó incubar por 20 minutos en oscuridad y se continuó con el proceso descrito. Se utilizó un control de células sin teñir pero sometidas al mismo procedimiento para obtener la autofluorescencia y un control con streptavidina sola. Las muestras fueron evaluadas en un citómetro FACS Calibur (Becton-Dickinson) en un lapso no mayor de 12 horas, pues se agregaron 5 μ l de 7AAD (7-Aminoactinomicina D) con la finalidad de eliminar células muertas del análisis. Se analizaron 10,000 eventos por tinción. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa BD Cell Quest Pro.

9. Estadística

Se utilizó la prueba t de student, la ANOVA de dos factores y el análisis de correlación, utilizando el programa PRISMA 3.0 para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos de estudio.

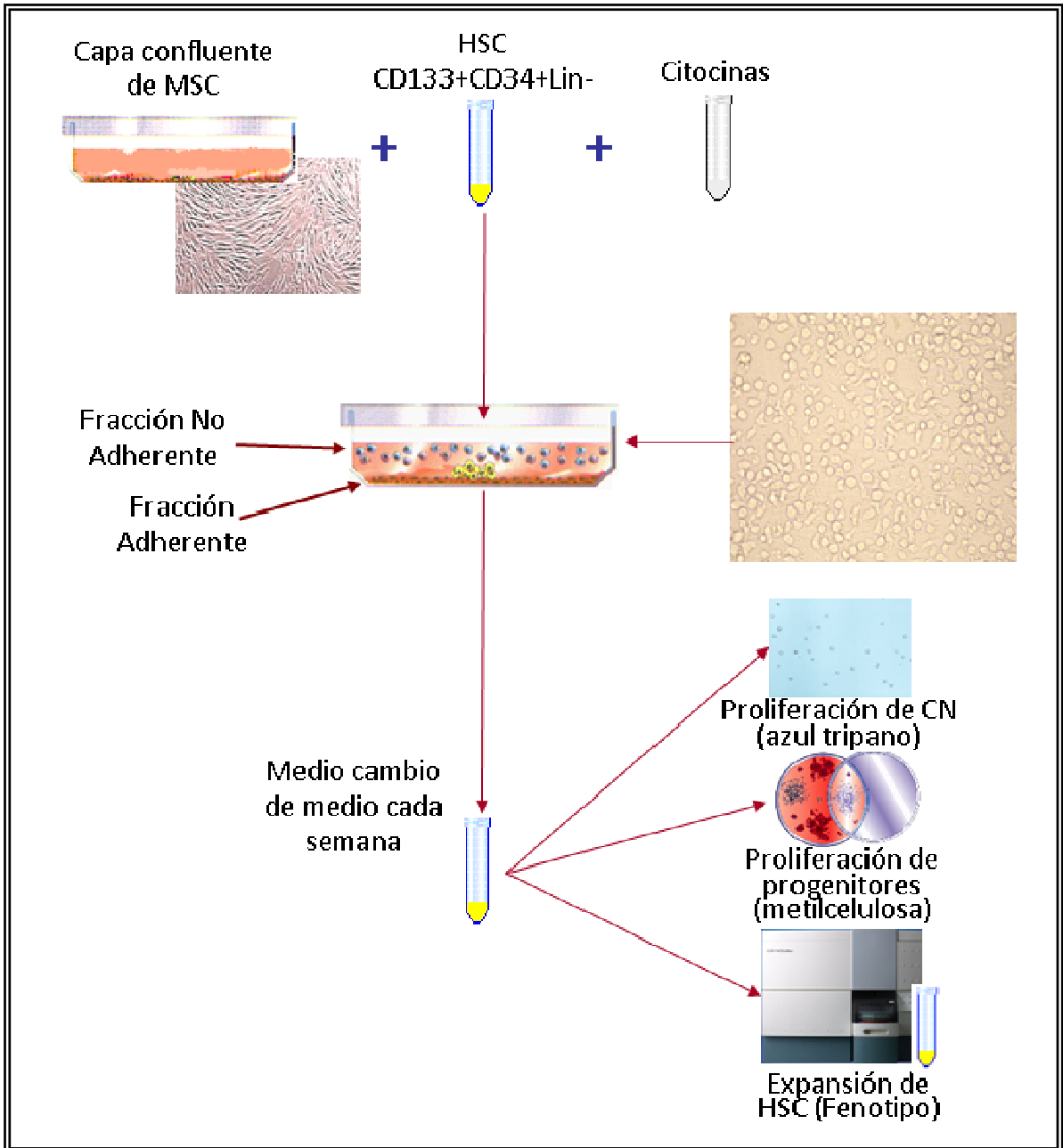


Figura 9. Esquema representativo del método para realizar un co-cultivo con HSC y MSC. CN: Células nucleadas; HSC: Células troncales hematopoyéticas; MSC: Células troncales mesenquimales.

VIII. RESULTADOS

1. Muestras Biológicas.

Para realizar este estudio, se utilizaron aspirados de médula ósea obtenidos de individuos sanos (MON) provenientes del Hospital infantil de México Federico Gómez (n=2) y del Centro Médico ABC (n=1) así como muestras de raspado medular óseo obtenido de pacientes ortopédicos sometidos a cirugía de cadera sin alteración hematológica procedentes del Hospital Regional No.2 Villacoapa IMSS (n=30); asimismo se utilizaron muestras de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide crónica recién diagnosticados, sin tratamiento y positivos para el re-arreglo *BCR-ABL* (VLMC), tratados con Imatinib (ILMC) y tratados con otros fármacos (Dasatinib, Hidroxiurea) (OLMC) provenientes del CMN SXXI, La Raza, IMSS (VLMC n=4, ILMC n=50, OLMC n=21), del CMN SXXI, Hospital de Especialidades, IMSS (VLMC n=2, ILMC n=23) y del Hospital General de México (VLMC n=3). Asimismo, se utilizaron muestras de sangre periférica movilizada de donadores sanos (SPM) obtenidas de los residuos de las bolsas utilizadas en los trasplantes realizados en el Centro Médico Nacional SXXI Hospital de Especialidades, IMSS (SPM n=9).

Los parámetros clínicos de los donadores y pacientes incluidos en el estudio se describen a continuación. El rango de edad de los cuatro grupos de estudio fueron: MON de 9-82 años (82.3 ± 12.1), VLMC de 47-96 años (64.33 ± 27.5), ILMC de 22-77 años (49.6 ± 16.8) y OLMC de 28-40 años (32 ± 6.9). La distribución de sexo de los cuatro grupos de estudio fue: MON 66.66% mujeres, 33.34% hombres; VLMC 75% mujeres, 25% hombres; ILMC 49% mujeres, 51% hombres; OLMC 64.7% mujeres, 35.3% hombres. El tiempo de tratamiento de los pacientes de ILMC fue de 24.4 ± 20.8 meses (400 mg/día) mientras que para los pacientes tratados con otro fármaco como el Dasatinib fue de 49.3 ± 12.4 meses.

Para la obtención de las MSC de los cuatro grupos de estudio, fue necesario obtener las CMN por medio de un gradiente de densidad. Se obtuvieron diferencias significativas en el promedio de CMN obtenidas de las muestras de VLMC con respecto a las de MON (Tabla 3); esto es, 20 veces más CMN en las muestras de VLMC que en las muestras de MON. Por otro lado, las muestras de ILMC y OLMC mostraron una disminución significativa de CMN con respecto a las obtenidas en MON (Tabla 3).

Muestra	CMN/ml
MON (n=11)	6 641 573 ± 7 173 612
VLMC (n=4)	131 521 333 ± 89 906 546*
ILMC (n=61)	2 702 176 ± 3 569 905*
OLMC (n=14)	1 981 925 ± 2 072 318*

Tabla 3. Número de células mononucleares (CMN) obtenidas por mililitro de los cuatro grupos de estudio. Los resultados se muestran como promedio ± desviación estándar.

MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; CMN/ml: Células mononucleares por mililitro; * Resultados estadísticamente significativos con respecto a la MON.

2. Obtención de MSC de MON, VLMC, ILMC y OLMC.

Una vez obtenidas las CMN se procedió al cultivo de MSC por adherencia. Para las muestras de MON, se consiguió obtener MSC de todas las muestras procesadas, no obstante sólo se trabajó con el 65% de ellas para los cultivos y los diferentes análisis, debido a la presencia de bacterias, obteniéndose $23\,425 \pm 11\,568$ MSC/cm² en 2.3 ± 0.7 semanas. Por otra parte, para las muestras de VLMC solo se obtuvieron MSC del 75% de las muestras procesadas, dejándonos un margen de 6 muestras para los cultivos y los diferentes análisis obteniéndose $54\,533 \pm 94465$ MSC/cm² en 4 ± 1 semanas. Con respecto a las muestras de ILMC, se lograron obtener MSC de todas las muestras, no obstante, sólo se trabajó con el 64% debido a la presencia de bacterias o a la proliferación insuficiente de las MSC obteniéndose $34\,487 \pm 23\,539$ MSC/cm² en 3.5 ± 0.8 semanas. En cuanto a las muestras de OLMC, se obtuvieron MSC de todas las muestras procesadas, sin embargo sólo se trabajó con el 42% ya que el 20% presentaron contaminación bacteriana y el resto fueron congeladas en la primera etapa de este proyecto obteniéndose $18\,822 \pm 10\,131$ MSC/cm² en 2.9 ± 0.9 semanas.

3. Análisis de la frecuencia de MSC y contenido de HPC de MON, VLMC, ILMC y OLMC.

Para analizar la frecuencia de MSC en la MO de los cuatro grupos de estudio, se utilizó el ensayo de CFU-F, cuantificando el número de colonias de tipo fibroblastoide (Figura 10) por cada 150 000 CMN sembradas. La frecuencia de MSC en las muestras de MON (n=32) fue de 1:15 151 CMN, mientras que en las muestras de VLMC (n=8) hubo una disminución estadísticamente significativa con respecto a las muestras de MON, siendo su frecuencia de 1:120 000 CMN. Asimismo, se evaluó el efecto del Imatinib en la frecuencia de MSC de pacientes con LMC, en donde se observó un moderado aumento en la frecuencia de las MSC en el grupo de ILMC (n=51) (1:73 891 CMN) similar al encontrado en el grupo de OLMC (n=11) (1:71 090 CMN) con respecto a la frecuencia obtenida en las muestras de VLMC (Figura 11), aunque significativamente menor con respecto a las muestras de MON.

Además se evaluó el tamaño de las colonias generadas en los ensayos de CFU-F para ver si el tratamiento con Imatinib *in vivo* afecta el potencial proliferativo *in vitro* de las colonias producidas. Las colonias fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo a su tamaño: pequeñas (1-2 mm²), medianas (3-5 mm²) y grandes (>5 mm²). Los cuatro grupos de estudio presentaron un mayor porcentaje en las colonias grandes (MON 49%, VLMC 100%, ILMC 53%, y OLMC 48%) (Figura 12).

Por otro lado, se observó una diferencia en la morfología de las células que conformaban las colonias sin importar a que grupo de estudio pertenecían. Esta diferencia se nombro como: colonias de tipo fibroblastoide, es decir, colonias con una morfología definida y ordenada, caracterizadas por células en forma de huso, largas y delgadas (Figura 13A) y colonias de tipo no fibroblastoide, es decir, colonias con una morfología indefinida, caracterizadas por células anchas, largas y con crecimiento desordenado (Figura 13B).

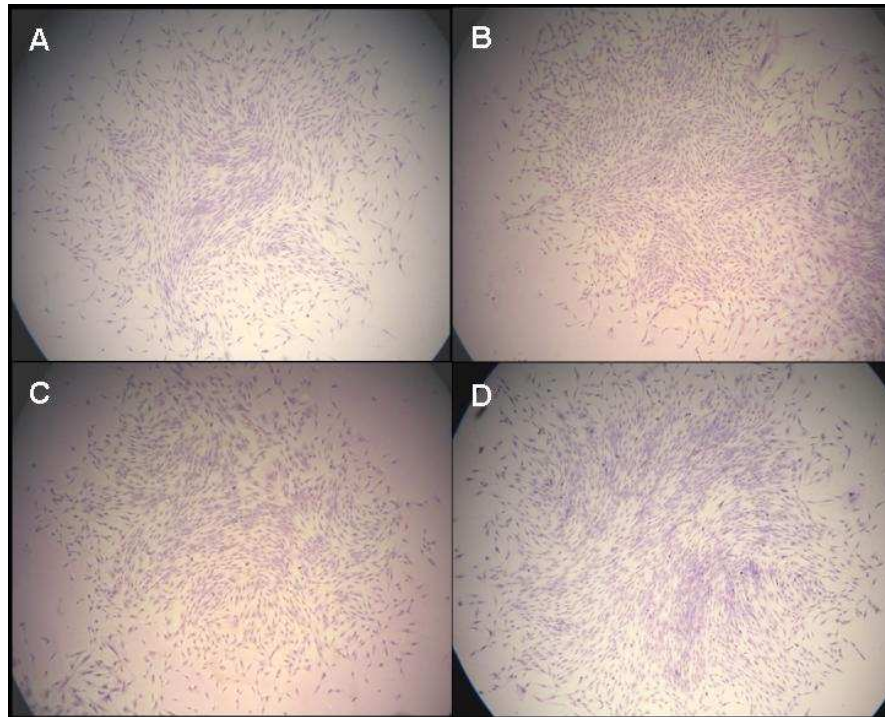


Figura 10. Microfotografías de CFU-F de los cuatro grupos de estudio (40 aumentos).
 (A) CFU-F de MON, (B) CFU-F de VLMC, (C) CFU-F de ILMC, (D) CFU-F de OLMC.

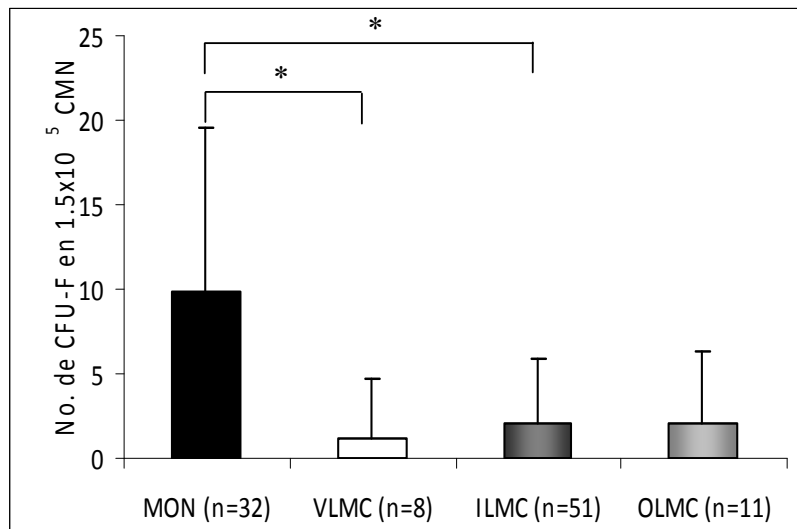


Figura 11. Número de CFU-F obtenidas por cada 150 000 CMN de los cuatro grupos de estudio. Los resultados se presentan como el promedio de CFU-F obtenidas. CFU-F: Unidades formadoras de colonias fibroblastoides; CMN: Células mononucleares; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras; *: Resultados estadísticamente significativos.

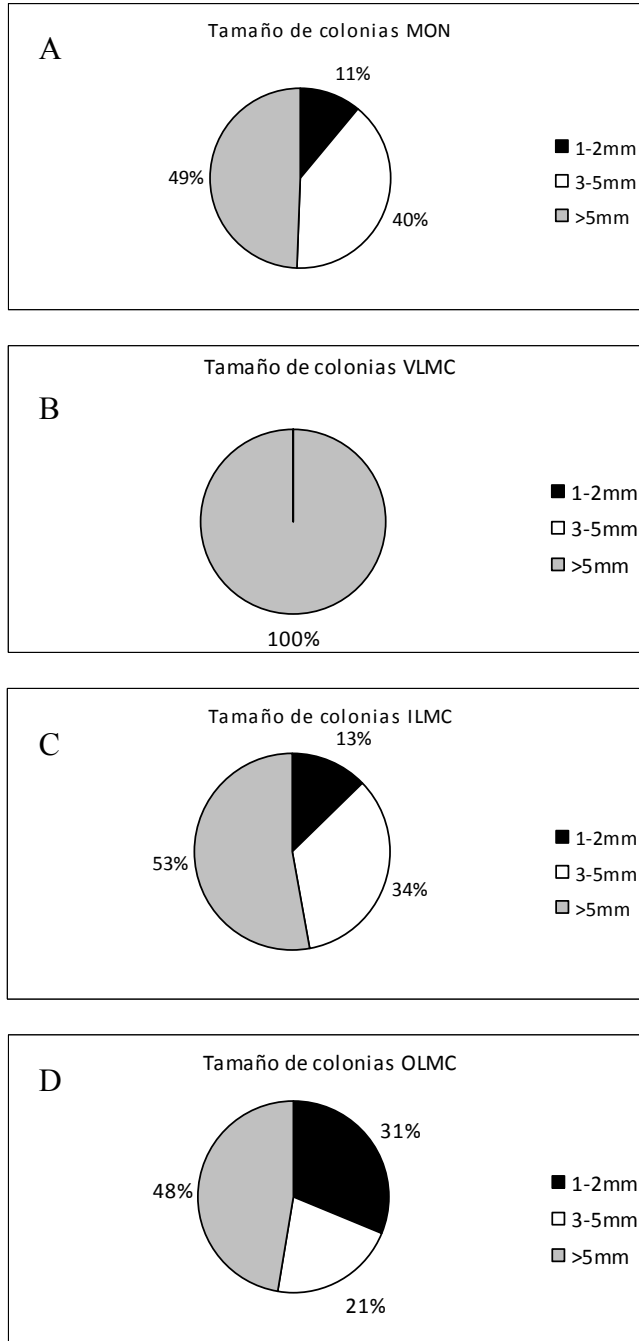


Figura 12. Análisis del tamaño de colonias obtenidas en los ensayos de CFU-F. Colonias pequeñas (1-2 mm), medianas (3-5 mm) y grandes (más de 5 mm). (A) Colonias de MON, (B) Colonias de VLMC, (C) Colonias de ILMC, (D) Colonias OLMC. Los resultados se presentan como porcentaje obtenido para cada tamaño de colonias. MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos.

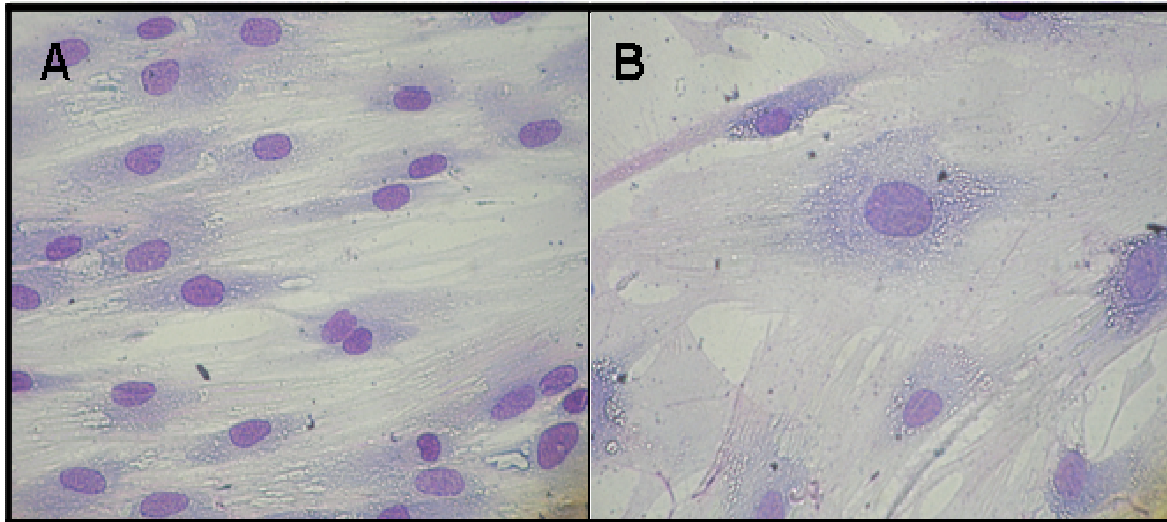


Figura 13. Microfotografías de CFU-F conformada de células con morfología fibroblastoide (A) y CFU-F conformada de células con morfología no fibroblastoide (B) (400 aumentos).

Asimismo, también se evaluó el contenido de los HPC por medio de un ensayo de colonias en cultivos semisólidos, en el que se cuantifica el número de CFU-C obtenidas por cada 50 000 CMN; esto con la finalidad de descartar un efecto diluyente por parte de las células leucémicas en la muestra. El promedio de colonias obtenido para el grupo de las VLMC mostró un menor número de colonias con respecto al control de MON, no obstante esta disminución no fue estadísticamente significativa. El grupo de ILMC y de OLMC presentaron un número de colonias similar con respecto al grupo de MON (Figura 14). Con lo anterior, podemos decir que las MSC de pacientes de VLMC, ILMC y OLMC se encuentran disminuidas con respecto a los pacientes de MON, sin embargo el contenido de los HPC no parece estar alterado en ninguno de los grupos de estudio.

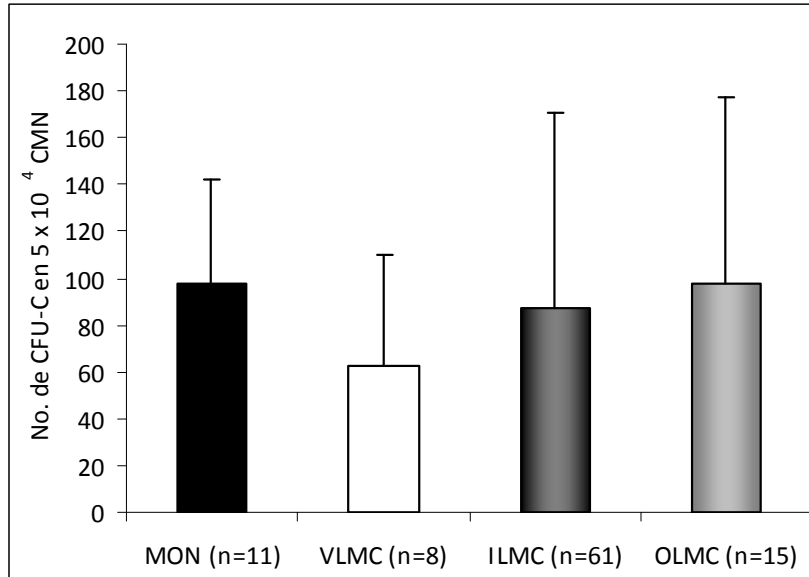


Figura 14. Número de CFU-C obtenidas por cada 50 000 CMN de los cuatro grupos de estudio.

CFU-C: Unidades formadoras de colonias; Los resultados se presentan como el promedio de CFU-C obtenidas. CMN: Células mononucleares; CFU-C: Unidades formadoras de colonias; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

4. Caracterización de las MSC de MON, VLMC, ILMC y OLMC.

La caracterización de las MSC se realizó de acuerdo a lo reportado por la Sociedad Internacional de Terapia Celular como los criterios mínimos para definir MSC (Dominici y cols., 2006), evaluando diferentes parámetros como son: el inmunofenotipo y la capacidad de diferenciación de las células a distintos linajes (adipogénico, osteogénico y condrogénico).

4.1 Determinación del Inmunofenotipo

Para corroborar que las poblaciones de los cuatro grupos de estudio expresaban los marcadores propios de las MSC, se analizó su inmunofenotipo mediante citometría de flujo, ubicando inicialmente la población por tamaño y granularidad. Los marcadores evaluados fueron: CD90 (Thy-1), CD105 (Endoglina) y CD73 (ecto-5-nucleotidasa) pues son característicos de las MSC (Dominici y cols., 2006). Por otro lado, también fue necesario

descartar la presencia de macrófagos y células dendríticas (CD14), de células endoteliales y hematopoyéticas (CD31, CD45 respectivamente), de progenitores hematopoyéticos (CD34) y de células presentadoras de antígeno tipo II (HLA-DR). Por último, se evaluó el marcador HLA-ABC, reportado como el antígeno mayor de histocompatibilidad tipo I que se expresa en todos los tipos celulares incluyendo las MSC. La región M1 se estableció como positiva a partir de los isotipos correspondientes utilizados como control.

Las MSC de los cuatro grupos de estudio expresaron marcadores característicos como CD105, CD90 y CD73 en más del 96% (Tabla 4). HLA-ABC también se expresó de forma homogénea aunque en menor cantidad en los cuatro grupos de estudio. Por otra parte, menos del 3% de las MSC resultaron positivas para CD45, CD31 y HLA-DR (Tabla 4), sugiriéndonos la ausencia de células hematopoyéticas y células endoteliales en los cultivos y por tanto un cultivo de MSC sin contaminación celular, no obstante, el 18% de las MSC obtenidas de OLMC fueron positivas para el marcador CD34. Por otro lado, las MSC de los cuatro grupos de estudio expresaron el marcador PDGF-Rb en más del 85% y fueron negativas para el PDGF-Ra (< 3.5%).

Marcador	MON (n=13)	VLMC (n=4)	ILMC (n=14)	OLMC (n=3)
CD31	0.5 ± 0.6	1.06 ± 0.8	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.03
CD14	1.6 ± 2.2	0.6 ± 0.5	1.5 ± 1.2	2.2 ± 1.7
CD45	0.7 ± 1.5	0.7 ± 0.6	0.6 ± 0.4	0.4 ± 0.05
CD34	2.9 ± 6.6	2.3 ± 1.3	4.9 ± 7.5	18.07 ± 11.2
CD90	98.4 ± 3	96.7 ± 6	99.7 ± 0.3	99.5 ± 0.2
CD105	80.9 ± 24.8	99.6 ± 0.4	96.4 ± 6.3	99.3 ± 0.5
PDGF-R a	0.57 ± 0.66	1.6 ± 1.2	3.4 ± 3.4	1.8 ± 1.6
PDGF-R b	84.7 ± 23.3	94.7 ± 6.2	96.3 ± 10	99 ± 0.7
HLA-ABC	55.6 ± 32.5	65.19 ± 56.5	61.5 ± 35.2	87.7 ± 5
HLA-DR	1.6 ± 2.6	3 ± 4.5	1.3 ± 1.4	0.7 ± 0.1
CD73	97.1 ± 5.3	98.9 ± 1.5	94.3 ± 9.8	99.1 ± 0.3

Tabla 4. Porcentaje de expresión de los antígenos analizados para determinar el inmunofenotipo de las MSC en los cuatro grupos de estudio. Los resultados se presentan como promedio del porcentaje expresado ± desviación estándar. MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

4.2 Evaluación del potencial de diferenciación.

El potencial de diferenciación adipogénico fue evaluado después de haber inducido a las MSC con medio de diferenciación específico durante 14 días (MON n=11; VLMC n=4; ILMC n=11; OLMC n=3). Transcurrido este tiempo se realizó la tinción de rojo oleoso directamente en la caja de cultivo, con la que se identifican grasas neutras, dando como resultado lípidos de color rojo brillante permitiendo así una identificación cualitativa, sin embargo, también se llevó a cabo dicha tinción en frotis celulares con la finalidad de obtener el porcentaje de células positivas (células con vacuolas rojo brillante) (Figura 15A) y de esta manera obtener un valor cuantitativo. Las MSC obtenidas de los cuatro grupos de estudio tuvieron la capacidad de diferenciarse a adipocitos de manera similar. No obstante, a pesar de que no existen diferencias significativas se muestra una tendencia a una mayor diferenciación adipogénica por parte de las muestras de ILMC y VLMC con respecto a las de MON (Figura 15, Figura 16).

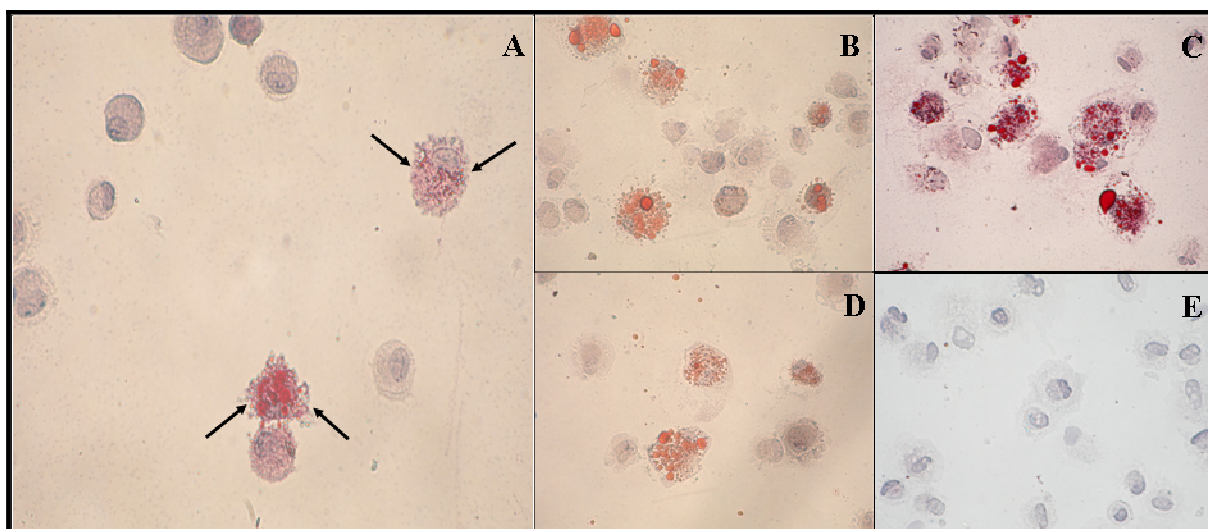


Figura 15. Microfotografías de MSC inducidas a adipocitos que se muestran como vacuolas lipídicas positivas para rojo oleoso (flechas negras) en frotis celulares (400 aumentos); (A) Adipocitos de MON positivos para rojo oleoso, (B) Adipocitos de VLMC positivos para rojo oleoso, (C) Adipocitos de ILMC positivos para rojo oleoso, (D) Adipocitos de OLMC positivos para rojo oleoso, (E) MSC sin medio de diferenciación negativas para rojo oleoso.

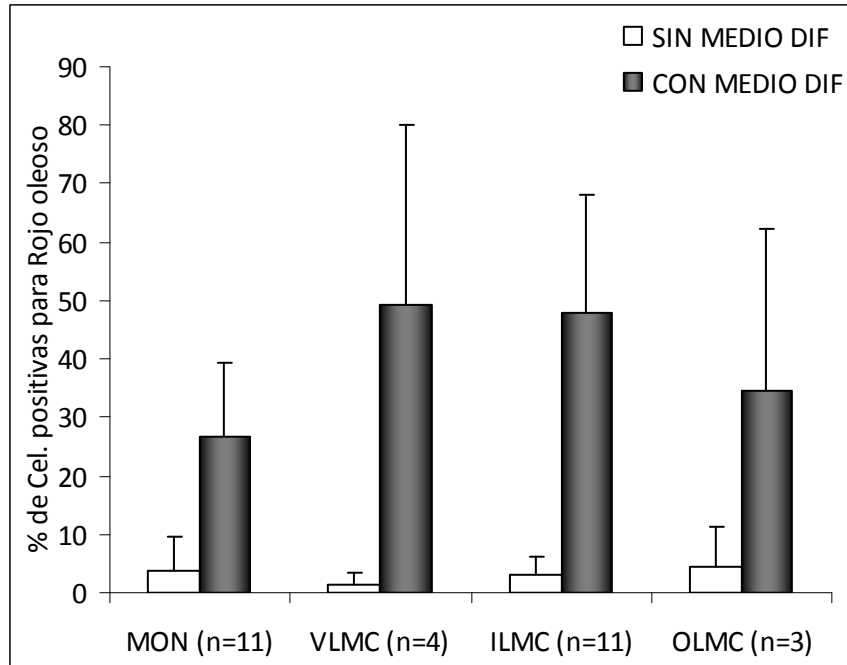


Figura 16. Capacidad de diferenciación adipogénica de las MSC de los cuatro grupos de estudio. Los resultados se presentan como el promedio del porcentaje de células positivas para la tinción con rojo oleoso. MON: Médula ósea normal; VLMLC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: NÚMERO de muestras; DIF: Diferenciación.

Por otra parte, la capacidad de diferenciación osteogénica de las MSC fue determinada después de inducirlas con medio de diferenciación específico durante 14 días (MON n=9; VLMLC n=2; ILMC n=9, OLMC n=3). Esta capacidad de diferenciación, se evaluó con la tinción de fosfatasa alcalina en frotis celulares, con la que se observa la reacción de dicha enzima involucrada en la mineralización de la matriz ósea al estar en contacto con sustrato, dando como resultado células teñidas en color morado (Figura 17A). Las MSC obtenidas de los cuatro grupos de estudio tuvieron la capacidad de diferenciarse a osteoblastos de manera similar, sin embargo las capas de MSC sin medio de diferenciación mostraron un porcentaje de positividad para fosfatasa alcalina similar a las MSC con medio de diferenciación osteogénico (Figura 17, Figura 18).

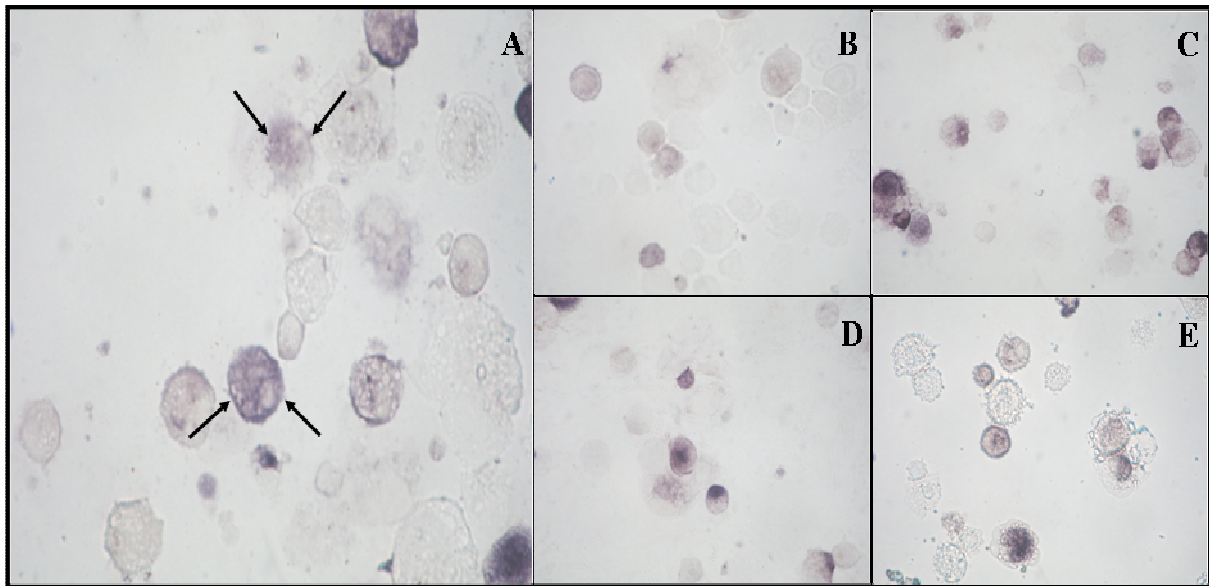


Figura 17. Microfotografías de MSC inducidas a osteoblastos que se muestran como células positivas para fosfatasa alcalina (flechas negras) en frotis celulares (400 aumentos); (A) Osteoblastos de MON positivos para fosfatasa alcalina (B) Osteoblastos de VLMC positivos para fosfatasa alcalina, (C) Osteoblastos de ILMC positivos para fosfatasa alcalina, (D) Osteoblastos de OLMC positivos para fosfatasa alcalina, (E) MSC sin medio de diferenciación positivas para fosfatasa alcalina.

Finalmente, la capacidad condrogénica de las MSC fue determinada después de haberlas inducido con medio de diferenciación por 14 días, utilizando la técnica de micromasa (MON n=12; VLMC n=4; ILMC n=11, OLMC n=4). Dicha diferenciación, fue evaluada por la presencia de un agregado compacto de células que se puede ver a simple vista y por la tinción de azul alciano que identifica mucopolisacáridos característicos de los condrocitos (Figura 20A). Los cuatro grupos de estudio, fueron positivos para la tinción de azul alciano principalmente en las células de la periferia del agregado celular (Tabla 5, Figura 19).

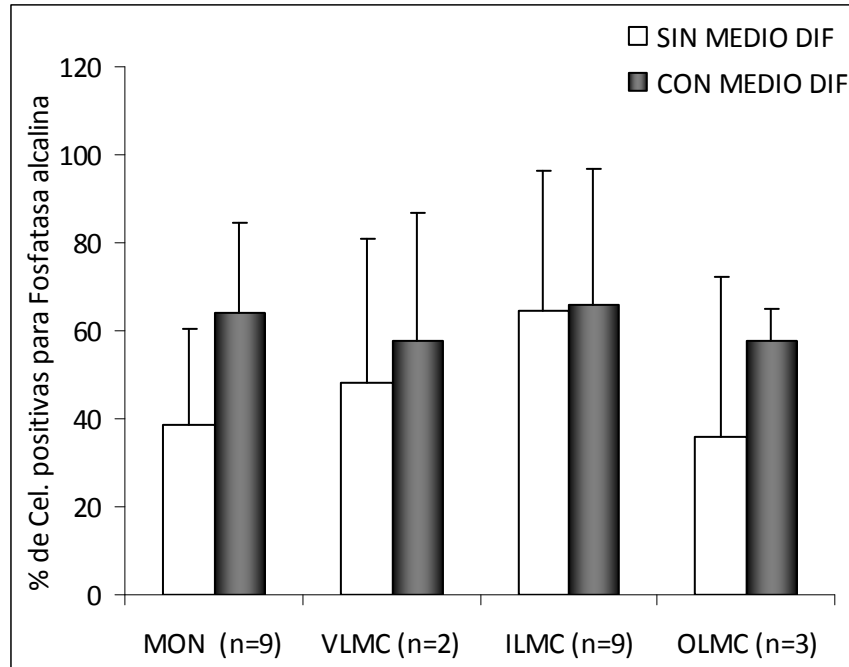


Figura 18. Capacidad de diferenciación osteogénica de las MSC de los cuatro grupos de estudio. Los resultados se presentan como el promedio del porcentaje de células positivas para la tinción de fosfatasa alcalina. MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras; DIF: Diferenciación.

Muestra	Sin Inducción	Con Inducción
MON	0/12	12/12
VLMC	0/5	4/5
ILMC	0/11	11/11
OLMC	0/4	4/4

Tabla 5. Número de conglomerados de MSC positivos para azul alciano obtenidos en cada ensayo sin medio de inducción y con medio de inducción condrogénico. Los resultados se presentan como número de conglomerados celulares formados. MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos.

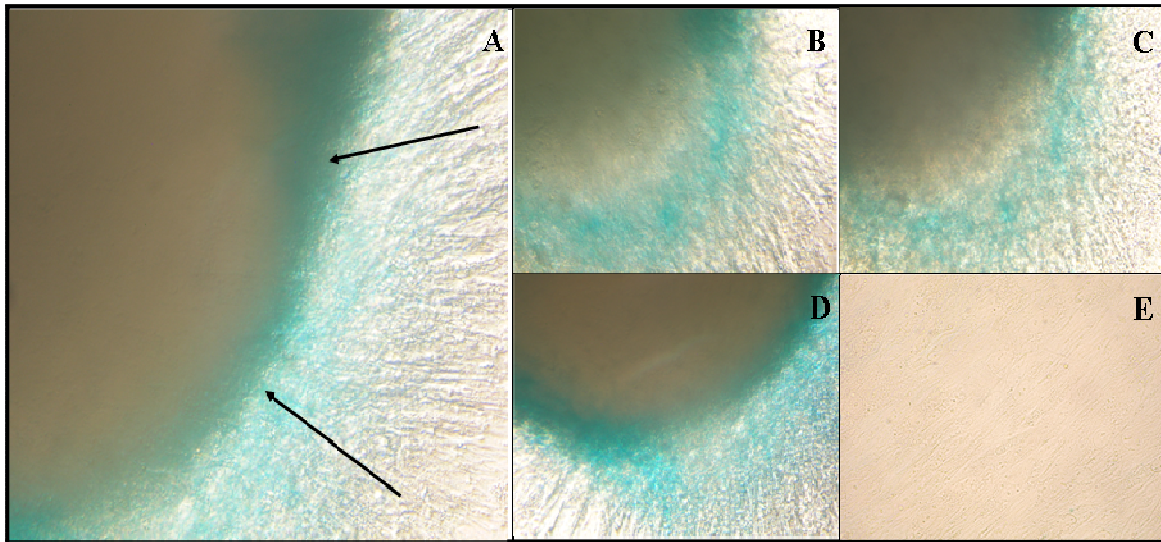


Figura 19. Microfotografías de MSC inducidas a condrocitos en agregados celulares positivos para la tinción azul alciano (flechas negras) (400 aumentos). (A) Condrocitos de MON positivos para azul alciano, (B) Condrocitos de VLMC positivos para azul alciano, (C) Condrocitos de ILMC positivos para azul alciano, (D) Condrocitos de OLMC positivos para azul alciano, (E) MSC sin medio de diferenciación condrogénico negativos para azul alciano y sin formación del agregado celular. MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos.

5. Ensayos de co-cultivos

5.1 Descripción de la población hematopoyética inicial

Para evaluar la capacidad funcional para sostener la hematopoyesis normal de las MSC obtenidas de pacientes con LMC tratados con Imatinib, se utilizó el sistema de co-cultivo, donde se cultivan HSC sobre una capa confluyente de MSC. Para este estudio, se utilizaron HSC CD133+ CD34+ Lin- obtenidas a partir de CMN de SPM de donadores sanos. La obtención se realizó mediante un kit comercial diamante de aislamiento de células CD133 humanas (DIAMOND CD133 ISOLATION KIT HUMAN, Miltenyi).

Se valoró el contenido de HSC antes (pre-separación) y después de pasar las células por las columnas inmunomagnéticas (post-separación) por citometría de flujo para obtener la pureza, es decir, el porcentaje de células que presentan el fenotipo CD133+ CD34+ Lin- y el

enriquecimiento, es decir, cuantas veces se incrementó la frecuencia de la población CD133+ CD34+ Lin- en las células post-separación con respecto a las células pre-separación. El contenido de HSC pre-separación fue del 20% y en la post-separación fue del 97%, indicando este último dato una pureza muy alta en la población obtenida. Aunque, a pesar de obtener una pureza muy alta, el porcentaje de recuperación celular fue bajo (0.3%) (Tabla 6, Figura 20).

Por otra parte, la población obtenida fue enriquecida 4.7 veces, es decir, por cada 100 000 células pre-separación hay 20 300 células con fenotipo CD133+ CD34+ Lin- y una vez enriquecidas por cada 100 000 células post-separación existen 97 300 células con fenotipo CD133+ CD34+ Lin- (Tabla 6).

Al mismo tiempo, se evaluó el número de progenitores CFU-C en las CMN pre y post separación, por medio de un ensayo de colonias en cultivos semisólidos, en el que se cuantifica el número de colonias de origen hematopoyético obtenidas en un determinado número de CMN. De manera similar a las HSC CD133+ CD34+ Lin-, los progenitores fueron enriquecidos 3.3 veces en post-separación (Tabla 6).

Parámetro	Pre -Separación (n=5)	Post-Separación (n=5)
No. de CMN	212 921 721 ± 69 914 424	607 269 ± 294 602
Pureza CD133+CD34+ Lin- (%)	20.3 ± 13.3	97.3 ± 3.2
Enriquecimiento de células CD133+CD34+ Lin- (I. veces)	-----	4.7
Recuperación de células CD133+CD34+ Lin- (%)	-----	0.3 ± 0.2
No. de Progenitores CFU-C	1572.5 ± 2622.3	5225 ± 3327.8
Enriquecimiento de progenitores (I. veces)	-----	3.3

Tabla 6. Características de la población hematopoyética inicial. Número de CMN, contenido de HSC CD133+ CD34+ Lin-, número de progenitores CFU-C, enriquecimiento y pureza pre y post separación en SPM. Los resultados se presentan como promedio ± desviación estándar ó incremento en veces. CMN: Células mononucleares; Lin-: Linaje negativo; I. veces: incremento en veces; CFU-C: Unidades formadoras de colonias; n=: Número de muestras.

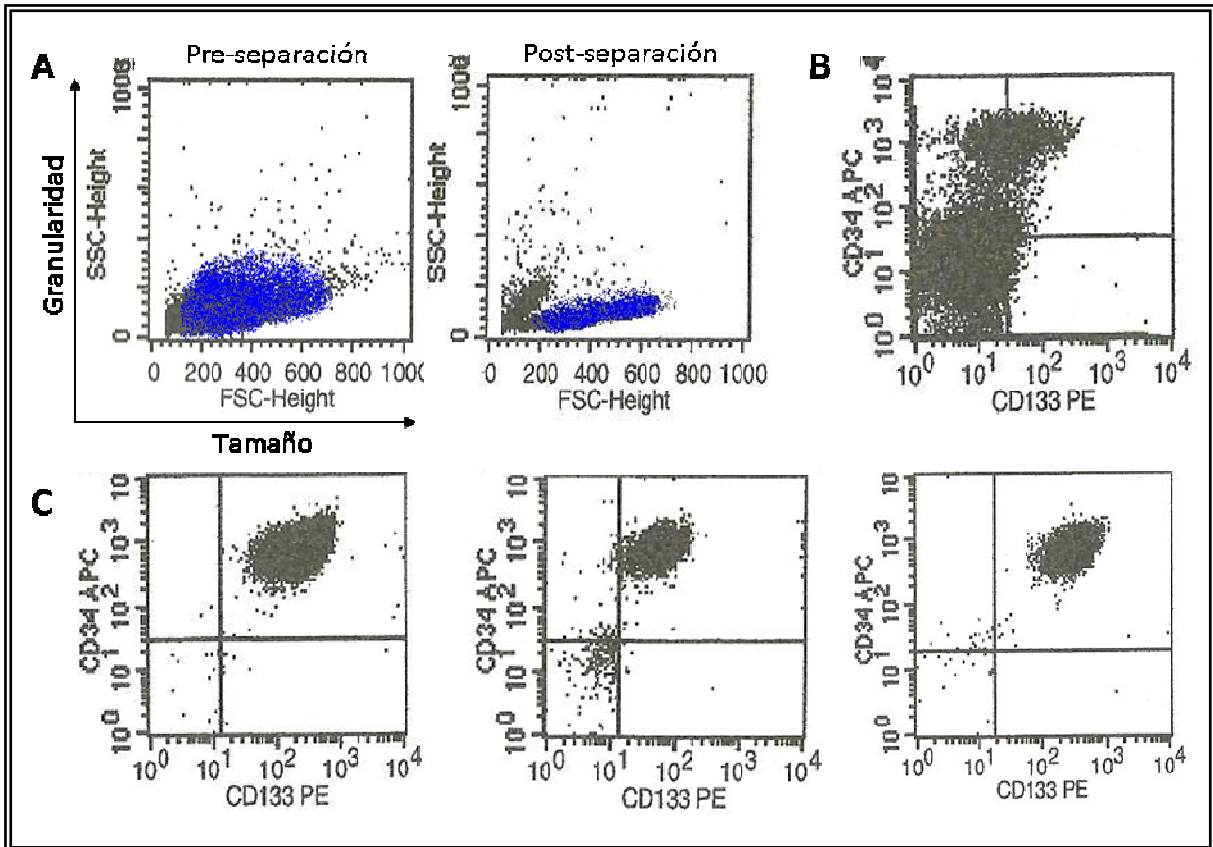


Figura 20. Inmunofenotipo de las HSC CD133+CD34+Lin- de SPM. (A) Gráfica representativa del tamaño y granularidad de las CMN pre-separación y post-separación. La regiones marcadas en azul seleccionan a las CMN y excluyen a las células muertas y células de mayor tamaño, (B) Plot representativo del contenido de HSC pre-separación, (C) Plots representativos del contenido de HSC post-separación en tres ensayos representativos. El cuadrante se estableció a partir de los controles negativos y positivos correspondientes (datos no mostrados).

5.2 Evaluación del soporte hematopoyético.

Los parámetros a considerar para evaluar la capacidad funcional del soporte hematopoyético de las MSC fueron: la proliferación de CN al día 21 y al día 35, el contenido de progenitores hematopoyéticos al día 21 y al día 35 y la expansión de las HSC CD133+CD34+ al día 21. Estos parámetros fueron evaluados en dos fracciones del cultivo: la fracción No Adh considerada como las CN no adheridas a las MSC y la fracción Adh considerada como las CN adheridas a las MSC. Cabe mencionar que para cada parámetro, los datos

obtenidos en las dos fracciones fueron sumadas, con la finalidad de obtener un valor representativo del cultivo celular como una sola fracción.

La proliferación de las CN se evaluó contando las células con azul de tripano. La proliferación total en el cultivo al día 21 fue mayor en las capas de los cuatro grupos de estudio con respecto al control de CN cultivadas sin MSC, lo que también se reflejó al día 35 aunque en menor proporción. Sin embargo, a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas, al día 21 se observó un mayor incremento en la proliferación de CN co-cultivadas con las MSC de ILMC con respecto a las MSC de MON (Figura 21).

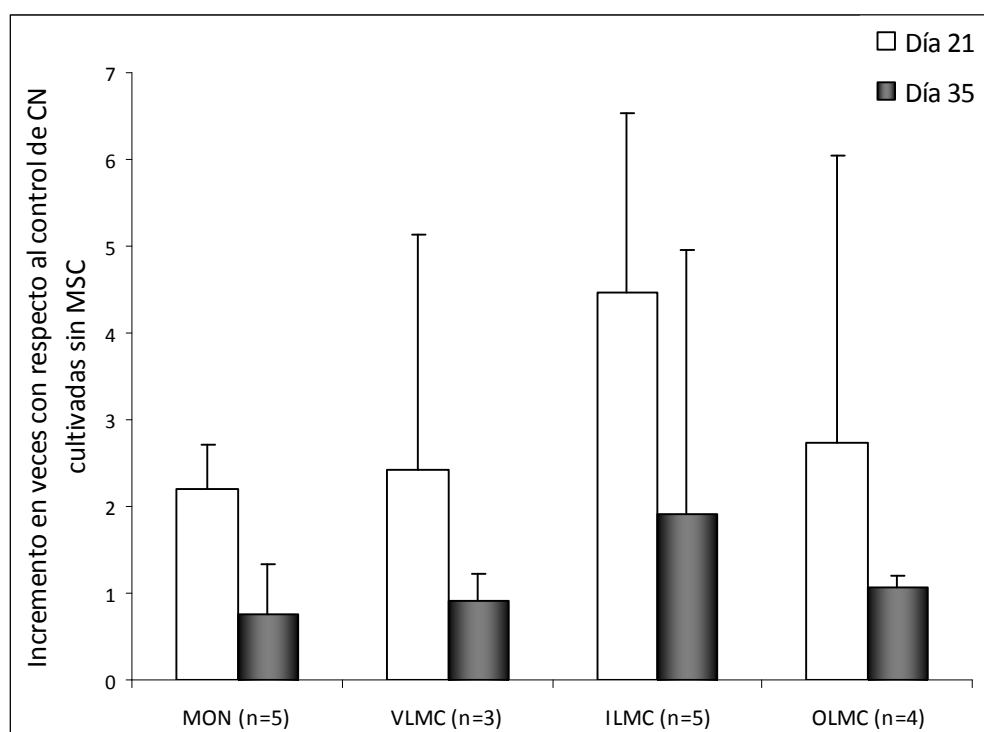


Figura 21. Proliferación de CN de SPM en co-cultivo con MSC de MON, VLMLC, ILMC y OLMC con respecto a las CN sin MSC, al día 21 y día 35. Los resultados se presentan como el promedio de CN totales obtenidas por pozo en incremento en veces con respecto al control de CN cultivadas sin MSC.

CN: Células nucleadas; MON: Médula ósea normal; VLMLC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

Otro de los parámetros a considerar para evaluar la capacidad funcional del soporte hematopoyético fue el contenido de los HPC al día 21 y al día 35; esto se valoró con un ensayo de colonias en cultivos semisólidos.

El contenido total de los progenitores en el cultivo al día 21, fue mayor en las capas de los cuatro grupos de estudio con respecto al control de CN cultivadas sin MSC, lo que también se reflejó al día 35. Sin embargo, a pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas, tanto al día 21 como al día 35 se observó un mayor incremento del contenido de progenitores obtenidos en los co-cultivos de ILMC y OLMC (Figura 22).

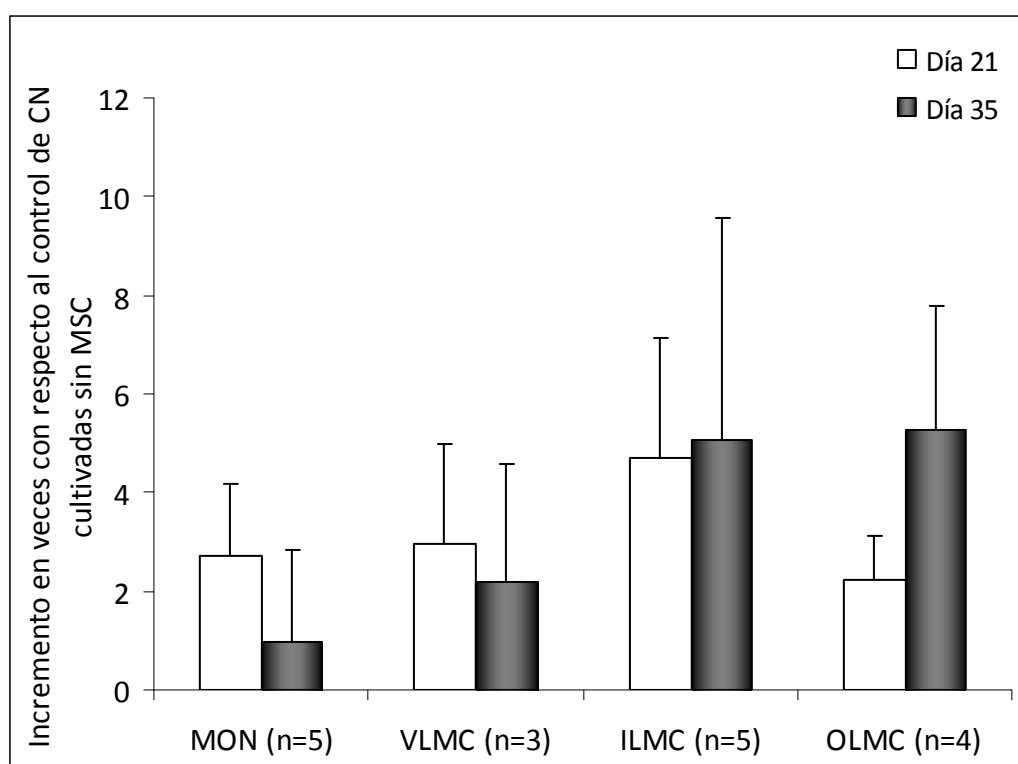


Figura 22. Contenido de progenitores hematopoyéticos obtenidos de CN de SPM en co-cultivo con MSC de MON, VLMLC, ILMC y OLMC con respecto a las CN cultivadas sin MSC, al día 21 y día 35.

Los resultados se presentan como el promedio de progenitores totales obtenidos por pozo en incremento en veces con respecto al control de CN sin MSC. CN: Células nucleadas; MON: Médula ósea normal; VLMLC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

El último parámetro a considerar para evaluar la capacidad funcional del soporte hematopoyético fue la expansión de HSC al día 21, la cual se evaluó por citometría de flujo. La expansión se define como el incremento de las células con las mismas características con las que inició el cultivo, en este caso la población que se siguió fue la de CD133+ CD34+. A pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se mostró que las células con este fenotipo se expandieron en todos los co-cultivos con respecto al control de CN cultivadas sin MSC, notándose que hay una mayor expansión en las células co-cultivadas con las MSC de ILMC con respecto a las MSC de MON (Figura 23).

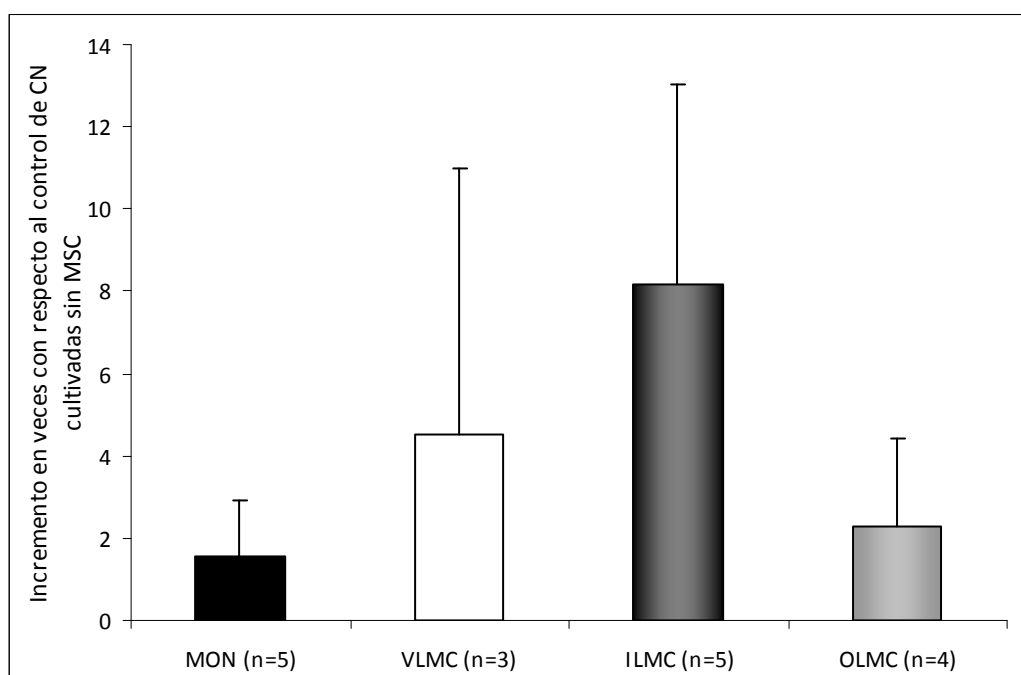


Figura 23. Expansión de células CD133+ CD34+ presentes en CN de SPM en co-cultivo con MSC de MON, VLMC, ILMC y OLMC con respecto a las células CD133+ CD34+ presentes en CN cultivadas sin MSC, al día 21. Los resultados se presentan como el promedio de células CD133+ CD34+ en incremento en veces con respecto al control de CN cultivadas sin MSC HSC: Células troncales hematopoyéticas; CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

Por otra parte, se analizó la fracción no adherente y la fracción adherente en los tres parámetros considerados para evaluar la capacidad funcional del soporte hematopoyético de las MSC. Se observó una mayor proliferación de CN y de progenitores en la fracción adherente al día 21, pues para los cuatro grupos de estudios el mayor porcentaje de las células totales así como de progenitores se encontró en esta fracción (MON= 73% y 71%; VLVC= 64% y 55.7%; ILMC= 75.3% y 66.4%; OLMC= 71.3% y 57.6%). Sin embargo, al día 35 se observó lo contrario, es decir, el mayor porcentaje de las células totales y de progenitores se encontró en la fracción no adherente (MON= 70.3% y 73.2%; VLVC= 82.3% y 68.5%; ILMC= 78.4% y 63%; OLMC= 63.2% y 64%) (Tabla 7). Por otra parte, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, la expansión de células HSC CD133+ CD34+ al día 21 mostró un mayor incremento en la fracción adherente en los cuatro grupos de estudio (Tabla 8).

Parámetro	Fracción	MON (n=5)	VLVC (n=3)	ILMC (n=5)	OLMC (n=4)
CN al día 21	No Adh	27	36	24.7	28.7
	Adh	73	64	75.3	71.3
CN al día 35	No Adh	70.3	82.3	78.4	63.2
	Adh	29.7	17.7	21.6	36.8
Progenitores al día 21	No Adh	29	44.3	33.6	42.4
	Adh	71	55.7	66.4	57.6
Progenitores al día 35	No Adh	73.2	68.5	63	64
	Adh	26.8	31.5	37	36

Tabla 7. Parámetros para evaluar la capacidad funcional del soporte hematopoyético de las MSC obtenidas de MON, VLVC, ILMC, OLMC y CN cultivadas sin MSC, en dos fracciones del cultivo (fracción no adherente y fracción adherente) al día 21 y día 35. Los resultados se muestran como el porcentaje de CN y el porcentaje de progenitores obtenidos en cada fracción del cultivo. CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLVC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras; No Adh: No adherente; Adh: Adherente.

Parámetro	Fracción	MON (n=5)	VLMC (n=3)	ILMC (n=5)	OLMC (n=4)	CN sin MSC (n=5)
Células CD133+ CD34+	No Adh	0.74 ± 0.22	2.06 ± 1.6	1.7 ± 1.1	2.09 ± 0.6	1.7 ± 1.7
	Adh	1.5 ± 0.9	4.16 ± 2.46	4.25 ± 2.56	3.92 ± 2.1	-----

Tabla 8. Expansión de células CD133+ CD34+ presentes en CN de SPM en co-cultivo con MSC de MON, VLMC, ILMC, OLMC y CN cultivadas sin MSC, en dos fracciones del cultivo (fracción no adherente y fracción adherente) al día 21. Los resultados se muestran como el promedio ± desviación estándar de células CD133+ CD34+ en incremento en veces. CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras; No Adh: No adherente; Adh: Adherente.

Finalmente, las MSC de los cuatro grupos de estudio tuvieron la capacidad de expandir en diferentes porcentajes tres subpoblaciones que perdieron o mantuvieron la expresión de los marcadores CD133 y CD34. En este sentido, entre el 0.3% y 2.6% de la población total mantuvo la expresión del antígeno CD133 y perdió la expresión de CD34 (CD133+ CD34-) en ambas fracciones y sin diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio, entre el 3.5% y el 8.8% de la población total mantuvieron la expresión de ambos marcadores (CD133+ CD34+) con un incremento significativo en el porcentaje encontrado en la fracción no adherente para VLMC, ILMC y OLMC con respecto al grupo de MON. Entre el 12% y el 24% de la población total expresó solamente el marcador CD34 (CD133- CD34+) sin diferencias significativas en ambas fracciones para los cuatro grupos de estudio. Finalmente, más del 68% de la población total fue negativa para ambos marcadores (CD133- CD34-) en las dos fracciones del cultivo para los cuatro grupos de estudio, obteniéndose una disminución significativa en el porcentaje para los cuatro grupos de estudio con respecto al control de CN cultivadas sin MSC en la fracción no adherente (Tabla 9, Figura 24). Estos datos correlacionan con los obtenidos en día cero en la muestra pre-separación (Figura 20), en donde la mayoría de la población expresa CD34 sin CD133, continuando con la subpoblación que expresa CD34 y CD133 y con una mucho menor presencia de la subpoblación CD133+CD34-.

Subpoblación	Fracción del cultivo	MON (n=5)	VLMC (n=3)	ILMC (n=5)	OLMC (n=4)	CN sin MSC (n=5)
CD133+CD34+	No Adh	4.5 ± 1.7	6.6 ± 3.6*	8.3 ± 2.2*	8.8 ± 3*	4.9 ± 1.9
	Adh	3.5 ± 2.4	5.5 ± 4	6.6 ± 2	6.7 ± 1.9	-----
CD133+CD34-	No Adh	0.98 ± 2	1.9 ± 2.7	2.8 ± 2.9	0.6 ± 0.4	1.9 ± 3.1
	Adh	0.9 ± 1.8	1.3 ± 1.3	2.1 ± 2	0.3 ± 0.3	-----
CD133-CD34+	No Adh	16.2 ± 5.7	13.6 ± 6.3	12.4 ± 8.2	19.4 ± 6.2	6.3 ± 3.4
	Adh	24.1 ± 9.3	20.7 ± 9.2	13 ± 5.5	24.4 ± 4.3	-----
CD133-CD34-	No Adh	78.3 ± 3.6*	75.8 ± 5.3*	76.4 ± 4.2*	71.2 ± 8.3*	86.8 ± 3.6
	Adh	71.4 ± 8.1	72.5 ± 10.2	78.3 ± 3	68.5 ± 4.9	-----

Tabla 9. Porcentaje de subpoblaciones obtenidas a partir de la proliferación de HSC CD133+ CD34+ en co-cultivo con MSC de MON, VLMC, ILMC, OLMC y CN cultivadas sin MSC en la fracción no adherente y fracción adherente, al día 21. Los resultados se muestran como el promedio ± desviación estándar de los porcentajes obtenidos en la evaluación del inmunofenotipo de las CN co-cultivadas con las MSC. *: Estadísticamente significativo; CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras; No Adh: No adherente; Adh: Adherente.

6. Expresión de N-cadherina

6.1 Expresión de N-cadherina en la población hematopoyética

Finalmente, se analizó la expresión de la N-cadherina por citometría de flujo en las HSC CD133+ CD34+ presentes en la fracción no adherente y en la fracción adherente del cultivo. Al día 0, el porcentaje de expresión de esta molécula en las HSC CD133+ CD34+ Lin-sin cultivar fue de 23.6 ± 24.9%. No obstante, al día 21 este porcentaje disminuyó aproximadamente 12 veces en las HSC CD133+ CD34+ co-cultivadas con las MSC de todos los grupos de estudio así como en el control de CN sin MSC con excepción de las HSC co-cultivadas con las MSC de VLMC, las cuáles mantuvieron la expresión de N-cadherina en la fracción adherente (Figura 25).

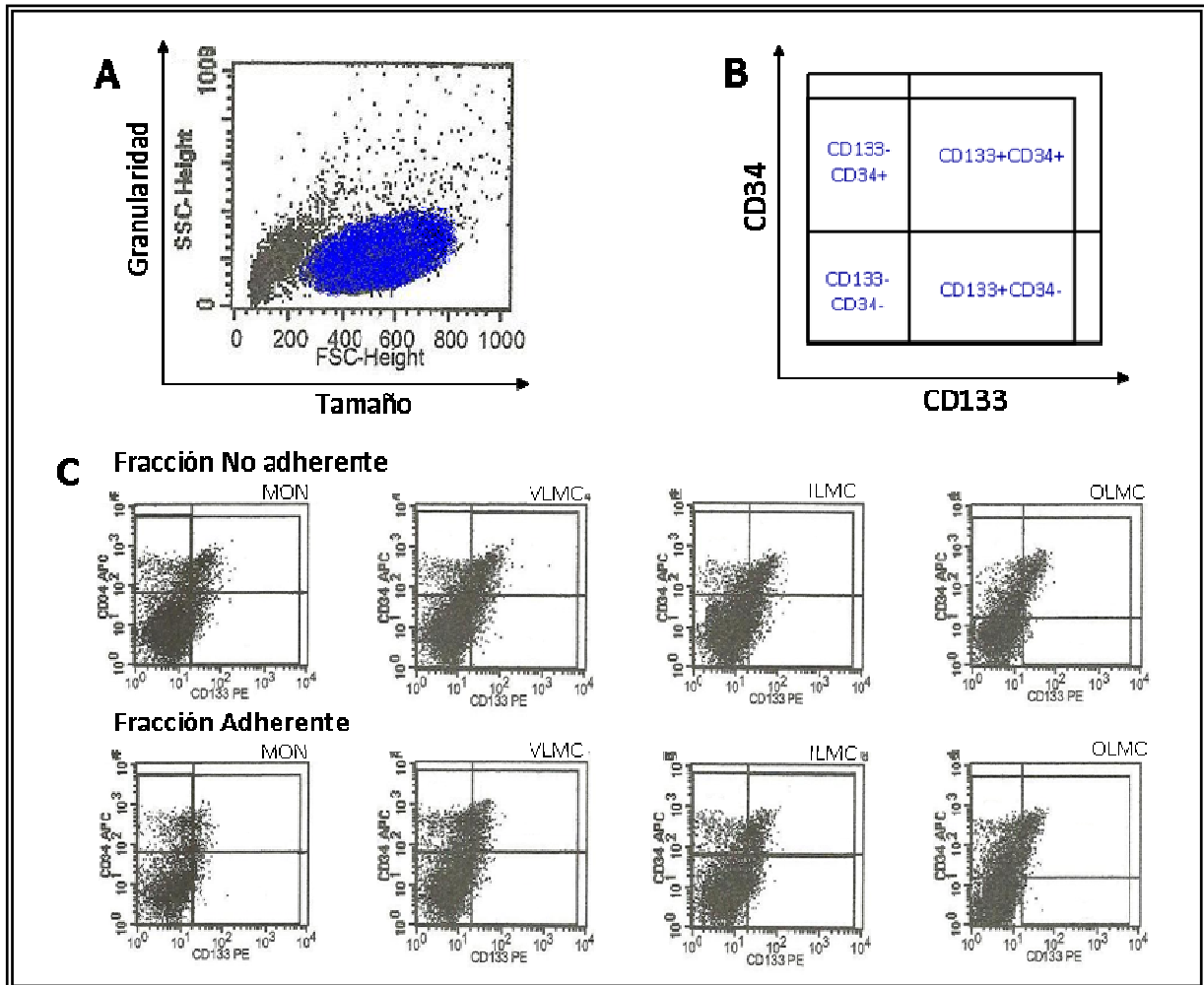


Figura 24. Subpoblaciones que comparten los marcadores CD133 y CD34. (A) Gráfica representativa del tamaño y granularidad de las CN co-cultivadas al día 21. Las regiones marcadas en azul seleccionan a las CN y excluyen a las células muertas y células de mayor tamaño, (B) Esquema de la localización de las subpoblaciones de acuerdo a la expresión de los marcadores CD133 y CD34, (C) Plots representativos de las subpoblaciones que comparten los marcadores CD133 y CD34 presentes en las CN de la fracción no adherente y de la fracción adherente de los cuatro grupo de estudio en cuatro ensayos representativos. El cuadrante se estableció a partir de los controles negativos y positivos correspondientes (datos no mostrados). MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos.

A pesar de que no existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, la expresión de N-cadherina fue mucho mayor en las HSC co-cultivadas con las MSC de VLMC en la fracción adherente. Por otra parte, la expresión de N-cadherina tendió a ser menor en la fracción adherente para el resto de los tratamientos, notándose principalmente en las HSC co-cultivadas con las MSC de ILMC (Figura 25).

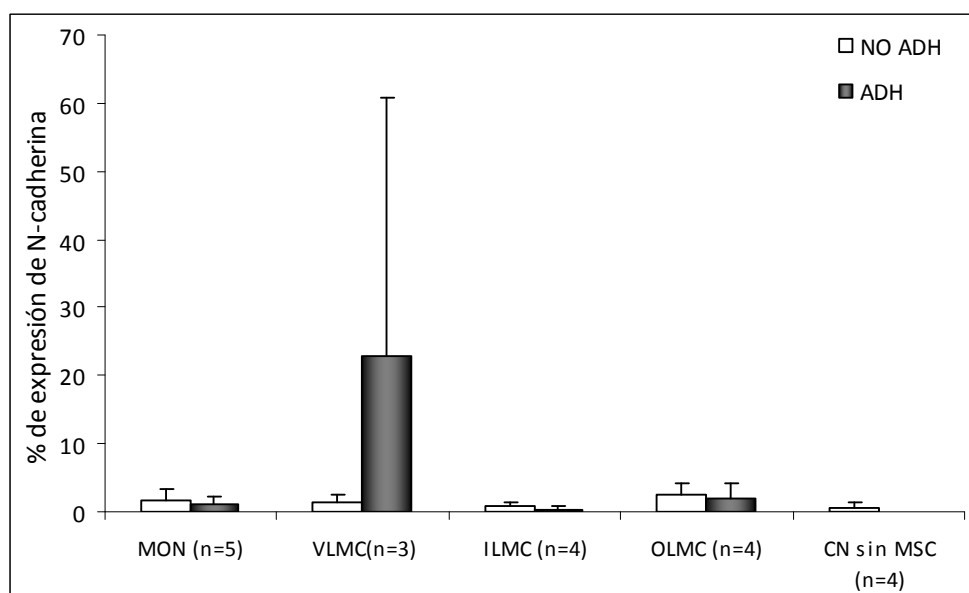


Figura 25. Porcentaje de expresión de N-cadherina en las HSC CD133+ CD34+ presentes en las CN co-cultivadas con MSC de MON, VLMC, ILMC, OLMC y CN cultivadas sin MSC al día 21. Los resultados se presentan como el promedio del porcentaje de expresión de N-cadherina en la población de CD133+ CD34+. HSC: Células troncales hematopoyéticas; CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

Por otro lado, en ambas fracciones del cultivo las tres subpoblaciones antes descritas (CD133+ CD34-, CD133- CD34+ y CD133- CD34-) expresaron N-cadherina en diferentes porcentajes. En este sentido, la subpoblación CD133- CD34+ expresó N-cadherina (0.5-5.6%) en ambas fracciones y sin diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio; asimismo la subpoblación CD133- CD34- mostró un ligero incremento en el porcentaje de expresión de N-cadherina (6.5-14.8%) que aunque no fue significativo, presentó un mayor porcentaje en la fracción adherente para las células obtenidas de los co-cultivos de MON,

VLMC e ILMC, con respecto a la fracción no adherente y finalmente la subpoblación CD133+ CD34- presentó el mayor porcentaje de expresión de N-cadherina (20-76%) en ambas fracciones del cultivo para los cuatro grupos de estudio, sin embargo, a pesar de no encontrar diferencias significativas se mostró una mayor expresión de N-cadherina en las células de los co-cultivos de MON y OLMC, principalmente en la fracción no adherente. La expresión de esta molécula tendió a ser menor en el control de CN cultivadas sin MSC (Tabla 10).

Población	Fracción	MON (n=5)	VLMC (n=3)	ILMC (n=5)	OLMC (n=4)	CN sin MSC (n=5)
CD133+ CD34+	No Adh	1.8 ± 1.6	1.3 ± 1.3	0.7 ± 0.6	2.6 ± 1.7	0.7 ± 0.9
	Adh	1.2 ± 1	23 ± 37.8	0.3 ± 0.4	1.9 ± 2.2	-----
CD133+ CD34-	No Adh	76.2 ± 47.6	25.9 ± 18	24.2 ± 42.6	58.5 ± 30.8	9.1 ± 6
	Adh	60.4 ± 37.8	55.7 ± 23.4	38.9 ± 35	28.5 ± 43.5	-----
CD133- CD34+	No Adh	3.2 ± 2	3 ± 2.9	4.6 ± 8.5	3.1 ± 2.5	3.4 ± 1.8
	Adh	2.6 ± 2.6	5.2 ± 7.5	0.5 ± 0.5	2.3 ± 1.9	-----
CD133- CD34-	No Adh	9.8 ± 7.9	7.5 ± 6.6	8.1 ± 6.7	8.1 ± 9.5	7.6 ± 6.4
	Adh	14 ± 9.1	12.3 ± 10.3	14.8 ± 7.4	6.5 ± 10.9	-----

Tabla 10. Porcentaje de expresión de N-cadherina en las subpoblaciones obtenidas a partir de la proliferación de HSC CD133+CD34+ en co-cultivo con MSC de MON, VLMC, ILMC, OLMC y CN cultivadas sin MSC en la fracción no adherente y en la fracción adherente, al día 21. Los resultados se muestran como el promedio ± desviación estándar de los porcentajes de expresión de N-cadherina obtenidos de la evaluación del inmunofenotipo de las CN co-cultivadas con las MSC. CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras; No Adh: No adherente; Adh: Adherente.

Por otra parte, las MSC de los cuatro grupos de estudio tuvieron la capacidad de expandir a la subpoblación CD133+ CD34+ N-cadherina+ en ambas fracciones del cultivo. A pesar de que las diferencias no fueron estadísticamente significativas, se observó que las células con este fenotipo se expandieron en todos los co-cultivos con respecto al control de CN cultivadas sin MSC, notándose que hay una tendencia a una mayor expansión en las células co-cultivadas con las MSC de VLMC y de OLMC principalmente en la fracción adherente (Figura 26).

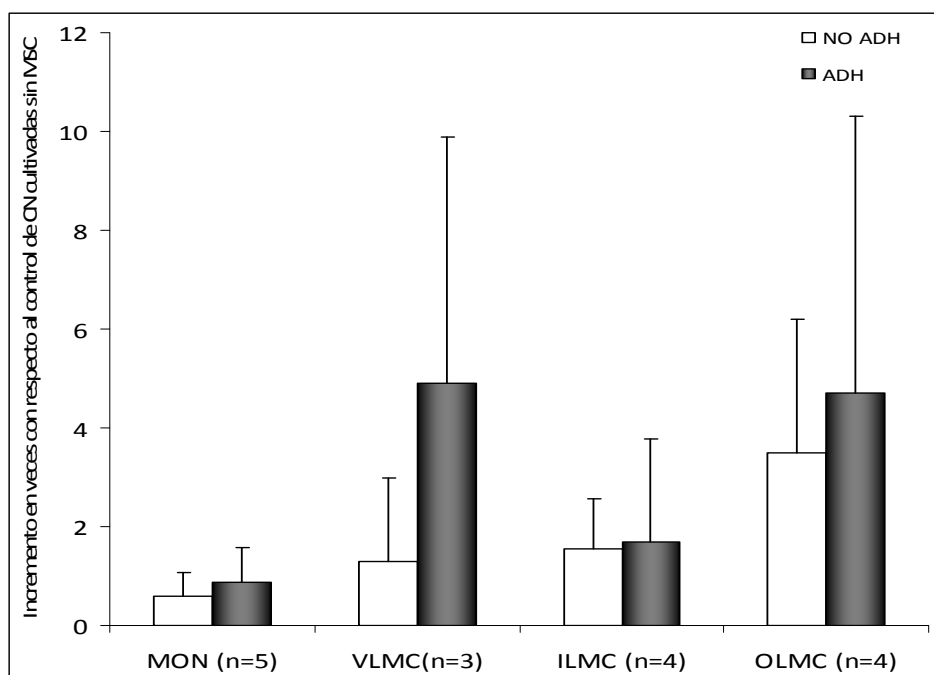


Figura 26. Expansión de la subpoblación CD133+ CD34+ N-cadherina+ presente en las CN co-cultivadas con MSC de MON, VLMC, ILMC y OLMC en la fracción no adherente y en la fracción adherente, al día 21. Los resultados se presentan como el promedio de células CD133+ CD34+ N-cadherina+ en incremento en veces con respecto al control de CN cultivadas sin MSC. CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

6.2 Expresión de N-cadherina en las MSC

Finalmente, al día 21 se evaluó la expresión de la N-cadherina por citometría de flujo en las MSC, en presencia y ausencia de CN en el cultivo. Las capas de MSC de VLMC, ILMC y OLMC en ausencia de CN, presentaron una disminución no significativa en la expresión de N-cadherina con respecto a las MSC de MON sin CN. Sin embargo, en las MSC co-cultivadas con CN se observó un efecto contrario, a pesar de no encontrar diferencias significativas, la expresión de N-cadherina mostró una tendencia a disminuir en las MSC de MON y a incrementarse en las MSC de ILMC (Figura 27).

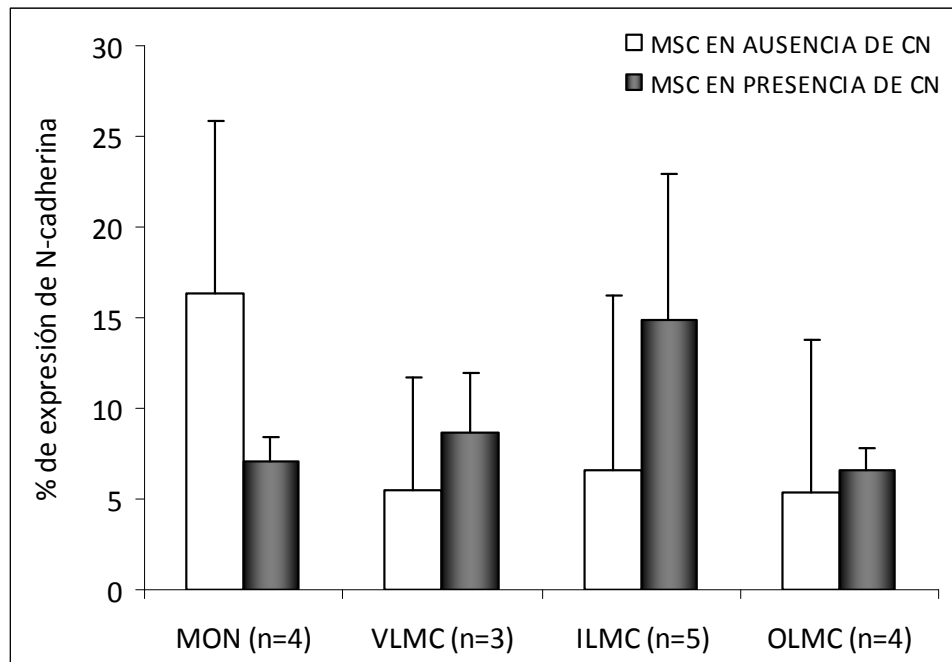


Figura 27. Porcentaje de expresión de N-cadherina en las MSC de MON, VLMLC, ILMC y OLMC en ausencia y presencia de CN al día 21. Los resultados se muestran como el porcentaje de expresión de N-cadherina obtenido en las MSC. CN: Células nucleadas; MSC: Células troncales mesenquimales; MON: Médula ósea normal; VLMLC: Leucemia mieloide crónica sin tratamiento; ILMC: Leucemia mieloide crónica tratados con Imatinib; OLMC: Leucemia mieloide crónica tratados con otros fármacos; n=: Número de muestras.

IX. DISCUSIÓN

Debido a que existen datos de alteración en el metabolismo óseo de pacientes con LMC tratados con Imatinib, se han realizado diversos estudios *in vitro* donde se ha reportado que este fármaco al bloquear el PDGF-R, inhibe la proliferación de las MSC e incrementa su diferenciación hacia osteoblastos. No obstante, a pesar de que las MSC tienen un papel sumamente importante en el mantenimiento de la hematopoyesis normal, no se ha estudiado si las MSC de pacientes tratados con Imatinib tienen alterada su capacidad funcional. Por lo que, el presente trabajo es el primero en estudiar la capacidad funcional para soportar la hematopoyesis normal *in vitro* de las MSC de pacientes con LMC tratados con Imatinib y compararlas con MSC de individuos sanos, con MSC de pacientes de LMC sin tratamiento y con MSC de pacientes con LMC tratados con otros fármacos.

Los grupos de investigación que han estudiado la capacidad funcional para soportar la hematopoyesis de las MSC de LMC, se han enfocado en pacientes sin tratamiento o tratados con fármacos que no son inhibidores de cinasas de tirosina. En el trabajo publicado por Jootar y cols. (2006), se estudió la capacidad para soportar la expansión de células troncales de SCU CD133+ normales en MSC obtenidas de pacientes recién diagnosticados que no habían recibido tratamiento. Estos autores demostraron que las MSC de LMC tienen la capacidad de expandir HSC CD133+ al mismo nivel que su contraparte normal. Zhao y cols. (2006) por su parte, evaluaron la capacidad para soportar la hematopoyesis de las MSC de pacientes con LMC sin tratamiento y de MSC de pacientes tratados con Hidroxiurea e IFN- α , co-cultivándolas con CMN no adherentes de médula ósea. Estos autores, concluyeron que tanto las MSC de pacientes sin tratamiento como las MSC de pacientes tratados muestran la capacidad de mantener LTC-IC de manera similar a las MSC de donadores sanos. Ambos reportes concuerdan con los datos obtenidos en nuestro estudio, donde encontramos que las MSC de pacientes con LMC sin tratamiento no tienen alterada su capacidad para soportar la proliferación, expansión y diferenciación de HSC CD133+ CD34+ Lin-. Lo anterior sugiere, que las MSC provenientes de LMC *in vitro* son funcionalmente normales, considerando además que estas células no expresan el re-arreglo *BCR-ABL* ni muestran daños en su cariotipo, pero si mantienen la capacidad de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Gómez, 2009; Carrara y cols., 2007; Jootar y cols., 2006; Zhao y cols., 2006). No

obstante, no se puede descartar que *in vivo* las MSC de LMC puedan ser anormales, ya que se ha reportado que las células hematopoyéticas leucémicas pueden provocar cambios en el microambiente, generando así un microambiente leucémico que modifica la expresión de citocinas en el nicho, causa disfunción de HPC normales y afecta sus patrones de migración (Colmone y cols., 2008). De hecho, en otro estudio se demostró que células CD45+ provenientes de pacientes con LMC, presentan cambios funcionales y morfológicos durante cultivos primarios a largo plazo, formando un nicho leucémico y produciendo una gran cantidad de citocinas que promueven la proliferación de las células de LMC. Si este fenómeno se reproduce *in vivo*, dichas citocinas interactuarían con el resto del microambiente y probablemente favorecerían el fenotipo leucémico (Shirasaki y cols. 2011). En contraparte, Zhang y Zhang (2009) demostraron por medio de un ensayo de co-cultivo la influencia de las MSC obtenidas de donadores sanos en la inhibición de la proliferación de CMN de LMC, al expresar niveles altos de INF- α . Esta inhibición de la proliferación, sugiere una alteración de las MSC al interactuar con células malignas, pues este incremento en la expresión del INF- α solo se dió en la presencia de las mismas. Asimismo, se ha demostrado que al co-cultivar células CD34+ obtenidas de pacientes con LMC y MSC obtenidas de donadores sanos, éstas últimas preservan a las células leucémicas de una muerte inducida por un inhibidor de cinasa de tirosina, reduciendo la activación de la caspasa-3 y la modulación de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-XL (Vianello y cols., 2010).

A pesar de que las MSC de LMC presentan características similares a su contraparte normal, las evidencias anteriores muestran que la influencia ejercida por las células leucémicas puede tener consecuencias en su funcionamiento, incluso en la presencia de inhibidores de cinasas de tirosinas como el Imatinib.

De acuerdo a esto, la disminución en la frecuencia de las MSC en la MO de pacientes con LMC encontrada en el presente trabajo y reportada previamente en nuestro grupo de investigación (Gómez, 2009), podría deberse a la interacción entre las células leucémicas y las MSC *in vivo*. Sin embargo, también podría deberse a un efecto diluyente por la presencia de células leucémicas en la fracción de CMN, lo cual disminuiría la proporción de MSC en el volumen de la muestra, con lo que también se esperaría una disminución en la generación de colonias hematopoyéticas. No obstante, el promedio de colonias que obtuvimos entre los cuatro grupos de estudio fue similar, sugiriendo que la baja frecuencia de las MSC encontrada

hasta el momento no se debe a un efecto diluyente y reforzando así que podría deberse a un efecto negativo de las células leucémicas sobre las MSC. No obstante, en un trabajo reciente se reportó que la frecuencia de MSC en pacientes con LMC está incrementada (Shirasaki y cols., 2011), sin embargo esta diferencia podría deberse al bajo número de muestras utilizadas (n=3), puesto que la disminución en la frecuencia de las MSC de VLMC que se observó en el presente estudio y en el estudio independiente reportado previamente en nuestro grupo de investigación (Gómez, 2009) contaron con un mayor número de muestras (n=8 y n=29 respectivamente).

Además, encontramos que la frecuencia de MSC en pacientes con LMC tratados con Imatinib y con otros fármacos como el Dasatinib, se encuentra disminuida aunque en menor proporción a lo observado en las muestras de LMC sin tratamiento. Esta reducción podría deberse a que el Imatinib así como el Dasatinib pueden inhibir la proliferación de las MSC *in vivo*, de forma similar a lo que se ha observado *in vitro* (Jönsson y cols., 2010; Fitter y cols., 2008; Fierro y cols., 2007;), lo cual provocaría que su frecuencia dentro de la MO se reduzca durante el tratamiento.

Por otra parte, encontramos que el porcentaje del tamaño de las colonias de CFU-F es similar en las muestras de los pacientes sanos y los pacientes con LMC tratados con Imatinib donde prevalecen las colonias medianas y grandes, lo que concordó con lo reportado previamente en nuestro grupo de investigación (Gómez, 2009), no obstante en las muestras de los pacientes con LMC sin tratamiento encontramos una prevalencia de las colonias grandes, lo que sugiere que el potencial proliferativo de estas MSC esta incrementado aunque su frecuencia en la médula ósea esta disminuida. Por otro lado, se ha reportado *in vitro* que al agregar el Imatinib en los cultivos de MSC de donadores sanos, prevalecen las colonias pequeñas (Fitter y cols., 2008), lo cual no fue observado en nuestro trabajo. Esta discrepancia podría deberse a que durante los 14 días de cultivo, el efecto del Imatinib administrado *in vivo* se pierda con el tiempo, por lo cual no observamos diferencias entre las muestras de MON y de ILMC.

Además, observamos una diferencia morfológica en las células que conformaban las CFU-F independientemente del grupo de estudio, la cual podría ser un indicativo de diferentes subpoblaciones de MSC, pues en un estudio reciente se encontraron subpoblaciones que se observaron al cultivar MSC de manera individual, las cuales presentaron distintos potenciales

de proliferación y diferenciación. Asimismo, al darle seguimiento al cultivo de cada subpoblación, éstas mostraron diferencias en su morfología (Lee y cols., 2010;).

Por otra parte, observamos que los potenciales de diferenciación *in vitro* de las MSC no se encuentran alterados en ninguno de los cuatro grupos de estudio. Cabe mencionar, que en la diferenciación osteogénica el control de MSC sin medio de diferenciación también resultó positivo para la tinción de fosfatasa alcalina. Es posible que las MSC de los cuatro grupos de estudios se hayan diferenciado a pre-osteoblastos, pues se ha reportado que este fenómeno ocurre en cultivos a largo plazo aun sin la presencia de medio osteogénico (Aldahmash y cols., 2011, Kozhevnikova y cols., 2008). Como se ha mencionado anteriormente, en diversos estudios *in vitro* se ha demostrado que el Imatinib puede modificar la proliferación y diferenciación de las MSC al ser cultivadas en presencia del fármaco (Tibullo y cols., 2009; O'Sullivan, 2007; Fitter y cols., 2008; Fierro y cols., 2007). Además, este efecto también se ha observado *in vivo*, ya que los pacientes tratados con Imatinib presentan alteraciones en la homeostasis ósea (Fitter y cols., 2008; Osorio y cols., 2007; Grey y cols., 2006; Berman y cols., 2006.). En nuestro estudio, no observamos diferencias en los resultados obtenidos de los análisis de diferenciación de las MSC; esto probablemente se deba a que en nuestro modelo los análisis se llevaron a cabo en ausencia del fármaco, ya que el objetivo principal de nuestro estudio fue determinar si las MSC obtenidas de pacientes de LMC sin tratamiento y tratados con Imatinib, tienen alterada su capacidad funcional para soportar la hematopoyesis normal *in vitro*. Estos resultados son importantes, ya que permiten establecer si el efecto que tiene el Imatinib *in vivo* sobre las MSC de los pacientes es o no reversible.

En este sentido, el presente trabajo es el primero en establecer que las MSC de pacientes con LMC tratados con Imatinib, no tienen alterada su capacidad para soportar la hematopoyesis *in vitro*, ya que estas capas permitieron la proliferación, expansión y diferenciación de las HSC (CD133+CD34+Lin-) a largo plazo.

Por otra parte, las MSC de los cuatro grupos de estudio tuvieron la capacidad de expandir en diferentes porcentajes tres subpoblaciones que mantuvieron o perdieron la expresión de los marcadores CD133 y CD34. En este sentido, la subpoblación mas abundante fue la doble negativa, lo que indica que la mayor parte de las células se diferenció y perdió estos marcadores. La población CD34+ CD133- fue la segunda más abundante, lo que sugiere que el marcador CD133 se pierda conforme se va diferenciando la célula, ya que la población

contraria, CD133+ CD34- fue muy escasa. De acuerdo a lo reportado en la literatura y a los porcentajes obtenidos en el presente trabajo podríamos asumir que las HSC más primitivas se encuentran en esta última fracción, pues se ha reportado que éstas tienen la capacidad de reconstituir ratones NOD/SCID y que adquieren la expresión del marcador CD34+ durante la proliferación en cultivo refiriéndola como la subpoblación de células más primitivas y de menor porcentaje (Gallacher y cols., 2000; Yin y cols., 1997). Considerando que la población con la que se inició el cultivo fue la CD133+ CD34+ Lin- con un 97% de pureza es probable que la subpoblación CD133+ CD34- se encontrara en el 3% restante.

Con lo resultados obtenidos, podemos decir que, el efecto del Imatinib es reversible en cuanto a los parámetros evaluados, ya que las MSC de ILMC presentaron un potencial de diferenciación y una capacidad para soportar la hematopoyesis similar a las MSC de MON y VLMC. Además, en un trabajo realizado previamente por nuestro grupo, se encontró que las MSC obtenidas de pacientes tratados con Imatinib fueron capaces de responder al estímulo mitogénico de PDGF, confirmando que el fármaco ya no se encuentra en las células inactivando al receptor de esta citocina, lo que corrobora de forma indirecta que la inhibición es reversible (Gómez, 2009). Asimismo, en otro estudio se demostró que no es posible detectar el rearrreglo *BCR-ABL* en HSC aisladas de pacientes con LMC tratados con Imatinib. Sin embargo, conforme se mantienen en cultivo, la clona leucémica aparece y es posible amplificar el rearrreglo mediante PCR anidado (Chávez-González y cols., 2006). Esto sugiere, que al principio del cultivo la clona leucémica se encuentra inhibida por el Imatinib, pero con el paso del tiempo en cultivo, el fármaco pierde su efecto y la clona reaparece. Lo anterior concuerda con lo que nosotros observamos en las MSC de estos pacientes y confirma que el efecto del Imatinib es reversible, tanto en las células hematopoyéticas como mesenquimales, ya que ambas son capaces de sobreponerse a la inhibición mediada por este fármaco.

Finalmente, el presente trabajo es el primero en establecer que las HSC CD133+ CD34+ Lin- de sangre periférica movilizada de donadores sanos expresan N-cadherina. Los grupos de investigación que han estudiado la expresión de esta molécula en HSC se han enfocado en modelos murinos y solo dos trabajos han utilizado células humanas. En ambos trabajos se reportó la expresión de esta molécula en una población de células primitivas CD34+ aisladas de aspirados de médula ósea y SCU, y solamente en uno de ellos se evaluó su interacción con las MSC obtenidas de médula ósea de donadores sanos (Wein y cols., 2010; Puch y cols.,

2001). Las características de la población de HSC CD133+ CD34+ Lin- que utilizamos en el presente trabajo nos permiten señalar la expresión de N-cadherina en una población mucho más primitiva que la población CD34+, lo cuál es interesante puesto que la controversia que ha surgido con respecto a la expresión de esta molécula se debe a su papel en el mantenimiento de las HSC y no en las células más maduras. En este sentido, retomando la jerarquía de las HSC de acuerdo a la expresión de los marcadores CD133 y CD34, el hecho de que la mayor expresión de N-cadherina se encontrara en la subpoblación de CD133+ CD34- independientemente del grupo de estudio o de la fracción del cultivo, refuerza que ésta contiene a las HSC más primitivas.

La disminución encontrada en la expresión de la N-cadherina tras 21 días de cultivo independientemente del grupo de estudio y de la fracción del cultivo, podría explicarse por una rápida degradación de la N-cadherina pues se ha sugerido que su expresión puede disminuir tras un cambio dinámico que provoque la salida de las células primitivas como es el caso de la movilización de las células de la MO hacia la sangre periférica, lo que podría traer como consecuencia que no haya una unión célula-célula estable. De hecho se ha reportado que células primitivas de SPM y de SCU expresan N-cadherina en menor porcentaje que la MON (Wein y cols., 2010). Esto a su vez explicaría que haya una menor expresión de N-cadherina en la fracción adherente del cultivo. No obstante, el hecho de que las CN co-cultivadas con las MSC obtenidas de pacientes con LMC sin tratamiento mostraran una tendencia a mantener la expresión de N-cadherina tras 21 días de cultivo en la fracción adherente, sugiere que el fenotipo leucémico podría estar formando una interacción importante entre las MSC leucémicas y las células hematopoyéticas, sin embargo, es necesario realizar más estudios para establecer el papel de la N-cadherina en la LMC pues hasta el momento no se han realizado.

Por otra parte, la expresión de esta molécula en las MSC fue mucho mayor con respecto a las HSC independientemente del grupo de estudio. La expresión de esta molécula ya había sido reportada en las MSC de MON (Wein y cols., 2010), sin embargo el presente trabajo es el primero en evaluar la expresión de N-cadherina en MSC de VLM, ILMC y OLMC.

Los resultados de nuestro estudio tienen una implicación clínica muy importante, pues es probable que el efecto que tiene el Imatinib en la homeostasis ósea *in vivo*, sea reversible al suspender el tratamiento. Además, como ya se ha mencionado el potencial de diferenciación de las MSC, hace que éstas sean una fuente atractiva de células para terapia celular. El hecho

de que las MSC de los pacientes de LMC sin tratamiento y tratados con Imatinib, tengan la capacidad de diferenciarse a condrocitos, adipocitos y osteoblastos, hace que estas células puedan ser utilizadas para terapia celular. Además, el que las MSC de LMC proliferen, se expandan y soporten la hematopoyesis de la misma forma que las derivadas de individuos sanos, permitiría que los pacientes con LMC reciban un trasplante de sus propias MSC y sean co-infundidas con células hematopoyéticas alogénicas, lo cual podría incrementar el injerto de estas últimas. Por otra parte, aunque ya se ha observado que las MSC de LMC tienen la capacidad de suprimir la actividad de linfocitos T (Zhao y cols., 2008), aún no se sabe si las MSC de obtenidas de pacientes tratados con Imatinib se comportan de la misma manera. Si se estudia la capacidad que tienen las MSC de estos pacientes para regular la respuesta inmune y tratar la enfermedad de injerto contra hospedero, también podrían ser utilizadas con este fin, mejorando el éxito del trasplante de médula ósea. Finalmente, todo lo anterior podría contribuir a aumentar la eficiencia y las posibilidades de tratamiento de estos pacientes.

X. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los datos obtenidos podemos concluir que el fenotipo, la capacidad de diferenciación y la capacidad funcional para mantener la hematopoyesis de las MSC obtenidas de pacientes con LMC tratados con Imatinib y cultivadas *in vitro* no se encuentran alterados, lo que sugiere que el Imatinib tiene un efecto reversible.

XI. PERSPECTIVAS

A pesar de que las MSC de LMC presentan características similares a su contraparte normal, las evidencias muestran que la influencia ejercida por las células leucémicas puede tener consecuencias en el funcionamiento de las mismas, incluso en la presencia de inhibidores de cinasas de tirosinas como el Imatinib, por lo que sería importante evaluar la capacidad que tienen estas células para interactuar con células hematopoyéticas tanto normales como leucémicas, en ausencia y presencia del fármaco. Además, se podría estudiar la producción de citocinas y moléculas de matriz extracelular *in vitro*.

De acuerdo a lo observado en la morfología de las células que conformaban las CFU-F, sería interesante analizar si las colonias que difieren en tamaño y morfología presentan características distintas en cuanto a expresión de marcadores, proliferación, diferenciación y funcionalidad, mediante estudios clonogénicos *in vitro*.

Debido a que la jerarquía de las HSC que presentan los marcadores CD133 y CD34 no ha sido establecida, sería interesante realizar estudios funcionales que permitan esclarecer las características de cada subpoblación encontrada en el presente trabajo.

Debido a la controversia que existe en la expresión de la N-cadherina en las HSC humanas, sería interesante realizar ensayos que corroboren la expresión de la misma por otras técnicas como “PCR cuantitativo” o “Western blot”, así mismo profundizar los ensayos que evalúen las interacciones de las HSC con el nicho normal y el nicho leucémico.

Finalmente, en cuanto al posible uso de estas células para terapia celular, es necesario realizar más estudios que permitan establecer de forma más precisa si su capacidad de diferenciación condrogénica se encuentra alterada, pues los realizados en este trabajo fueron cualitativos, ya que el cultivo de condrocitos con la técnica de micromasa presenta dificultad

para evaluar la diferenciación. Además, se podría estudiar el potencial que tienen estas células para inhibir la activación de linfocitos T y de esta manera regular la respuesta inmunológica para ser utilizadas en el tratamiento de enfermedad de injerto contra hospedero, abriendo la posibilidad de que los pacientes con LMC reciban un trasplante de su propias MSC y sean co-infundidas con células hematopoyéticas alogénicas, contribuyendo a aumentar la eficiencia y las posibilidades de tratamiento de estos pacientes.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Citocinas. *Inmunología Celular y Molecular*. McGraw-Hill-Interamericana. 2008;(6):267-270.
2. Abelson HT, Rabstein LS. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res*. 1970;30(8):2213-2222.
3. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 2006;439(7076):599-603.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell*. Garland Science; 2008;(5):1178-1194.
5. Aldahmash A, Haack-Sørensen M, Al-Nbaheen M, et al. Human Serum is as Efficient as Fetal Bovine Serum in Supporting Proliferation and Differentiation of Human Multipotent Stromal (Mesenchymal) Stem Cells In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Rev*. 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21603946>. Accedido Julio 19, 2011.
6. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-161.
7. Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, et al. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2009;1176:36-46.
8. Astori G, Malangone W, Adami V, et al. A novel protocol that allows short-term stem cell expansion of both committed and pluripotent hematopoietic progenitor cells suitable for clinical use. *Blood Cells Mol. Dis*. 2001;27(4):715-724; discussion 725-727.
9. Bain BJ. *Bone marrow pathology*. Wiley-Blackwell. 2001; 1-5.
10. Belaid-Choucair Z, Lepelletier Y, Poncin G, et al. Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. *Stem Cells*. 2008;26(6):1556-1564.
11. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2004;36(4):607-620.

12. Berman E, Nicolaides M, Maki RG, et al. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N. Engl. J. Med.* 2006;354(19):2006-2013.
13. Bhatia M. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia.* 2001;15(11):1685-1688.
14. Bianco P, Sacchetti B, Riminucci M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(1):37-47.
15. Bovolenta P. Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *J. Neurobiol.* 2005;64(4):405-416.
16. Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1966;44(3):287-299.
17. Broxmeyer HE. Chemokines in hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 2008;15(1):49-58.
18. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.* 2006;169(2):338-346.
19. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;295(1):139-145.
20. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996;56(1):100-104.
21. Cáceres-Cortés JR. Factor Steel: lecciones de supervivencia celular. *Hematología.* 2011;12(1):32-38.
22. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841-846.
23. Carrara RCV, Orellana MD, Fontes AM, et al. Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007;40(1):57-67.
24. Chang MK, Raggatt L-J, Alexander KA, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 2008;181(2):1232-1244.

25. Chatelain C, De Bast M, Symann M. Identification of a light density murine megakaryocyte progenitor (LD-CFU-M). *Blood*. 1988;72(4):1187-1192.
26. Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*. 2004;34(3):402-411.
27. Chávez-González A, Ayala-Sánchez M, Sánchez-Valle E, et al. Functional integrity in vitro of hematopoietic progenitor cells from patients with chronic myeloid leukemia that have achieved hematological remission after different therapeutic procedures. *Leuk. Res*. 2006;30(3):286-295.
28. Chávez-González MA, Ayala-Sánchez M, Mayani H. [Chronic myeloid leukemia in the 21st century: biology and treatment]. *Rev. Invest. Clin*. 2009;61(3):221-232.
29. Chitteti BR, Cheng Y-H, Poteat B, et al. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood*. 2010;115(16):3239-3248.
30. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med*. 2011;208(2):261-271.
31. Cohen MH, Williams G, Johnson JR, et al. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res*. 2002;8(5):935-942.
32. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008;322(5909):1861-1865.
33. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*. 2006;107(11):4532-4539.
34. Corbeil D, Röper K, Weigmann A, Huttner WB. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood*. 1998;91(7):2625-2626.
35. Craig W, Kay R, Cutler RL, Lansdorp PM. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med*. 1993;177(5):1331-1342.

36. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-313.
37. Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2011;117(23):6083-6090.
38. De Castro FA, Jacysyn JF, Bueno-da-Silva AE, et al. Apoptosis resistance in chronic myelogenous leukemia. *Einstein*. 2005;3(3):207-212.
39. De Figueiredo LL, de Abreu e Lima RS, Rego EM. Granulocyte colony-stimulating factor and leukemogenesis. *Mediators Inflamm*. 2004;13(3):145-150.
40. De Kogel CE, Schellens JHM. Imatinib. *Oncologist*. 2007;12(12):1390-1394.
41. De Wynter EA, Buck D, Hart C, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells*. 1998;16(6):387-396.
42. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105(7):2640-2653.
43. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96(10):3343-3356.
44. Deininger MWN, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev*. 2003;55(3):401-423.
45. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*. 2002;20(3):205-214.
46. Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med*. 2009;15(9):417-429.
47. Dewar AL, Cambareri AC, Zannettino ACW, et al. Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib. *Blood*. 2005;105(8):3127-3132.
48. Dexter TM, Wright EG, Krizsa F, Lajtha LG. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine*. 1977;27(9-10):344-349.
49. DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, et al. Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J. Immunol*. 2007;178(6):3511-3520.
50. Domen J, Wagers A, Wessman IL. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. Regenerative Medicine. The National Institutes of Health resource for stem cell research. 2006; 13-28.

51. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
52. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 1996;2(5):561-566.
53. Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003;17(9):984-992.
54. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J. Exp. Med.* 2011;208(3):421-428.
55. Engelhardt M, Lübbert M, Guo Y. CD34(+) or CD34(-): which is the more primitive? *Leukemia*. 2002;16(9):1603-1608.
56. Fausel C. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(8 Suppl A):8-12.
57. Fierro F, Illmer T, Jing D, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptorbeta by imatinib mesylate suppresses proliferation and alters differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Prolif.* 2007;40(3):355-366.
58. Fitter S, Dewar AL, Kostakis P, et al. Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood*. 2008;111(5):2538-2547.
59. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2002;17(4):405-426.
60. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, et al. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk. Res.* 2008;32(9):1407-1416.
61. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin.* 2006;58(5):498-511.
62. 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(4):334-344.

63. Fraser CC, Szilvassy SJ, Eaves CJ, Humphries RK. Proliferation of totipotent hematopoietic stem cells in vitro with retention of long-term competitive in vivo reconstituting ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(5):1968-1972.
64. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 1976;4(5):267-274.
65. Fujimori T, Takeichi M. Disruption of epithelial cell-cell adhesion by exogenous expression of a mutated nonfunctional N-cadherin. *Mol. Biol. Cell.* 1993;4(1):37-47.
66. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, et al. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood.* 2000;95(9):2813-2820.
67. Gasper PW. The hematopoietic system. *Schalm's veterinary hematology.* Wiley-Blackwell; 2000;(5):63-80.
68. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone.* 1996;19(5):421-428.
69. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 2003;349(15):1451-1464
70. Gómez L. Estudio de las células troncales mesenquimales en pacientes con leucemia granulocítica crónica tratados con Imatinib. *Tesis de grado, Maestría en Ciencia Biológicas, UNAM.* 2009. pp 132.
71. Góngora-Bianchi R, Selva-Pallares J, Gómez-Almaguer D, et al. Declaración mexicana de posición para el tratamiento de leucemia mieloide crónica. *Revista de Hematología.* 2005;6(Supl2): S1-S14.
72. Gordon PR, Leimig T, Babarin-Dorner A, et al. Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2003;31(1):17-22.
73. Grassinger J, Haylock DN, Williams B, Olsen GH, Nilsson SK. Phenotypically identical hemopoietic stem cells isolated from different regions of bone marrow have different biologic potential. *Blood.* 2010;116(17):3185-3196.
74. Gregory CJ, Eaves AC. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. *Blood.* 1977;49(6):855-864.

75. Grey A, O'Sullivan S, Reid IR, Browett P. Imatinib mesylate, increased bone formation, and secondary hyperparathyroidism. *N. Engl. J. Med.* 2006;355(23):2494-2495.
76. 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(4):929-940.
77. Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell. Sci.* 2003;116(Pt 9):1827-1835.
78. Hahn EA, Glendenning GA, Sorensen MV, et al. Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study. *J. Clin. Oncol.* 2003;21(11):2138-2146.
79. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, et al. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;996:141-151.
80. Haug JS, He XC, Grindley JC, et al. N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):367-379.
81. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2007;370(9584):342-350.
82. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.* 2003;21(23):4342-4349.
83. Hooper AT, Butler JM, Nolan DJ, et al. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell.* 2009;4(3):263-274.
84. Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, et al. Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;363(3):578-583.
85. Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, et al. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood.* 2010;116(4):554-563.

86. Igura K, Zhang X, Takahashi K, et al. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*. 2004;6(6):543-553.
87. Ishikawa T, Eguchi M, Wada M, et al. Establishment of a functionally active collagen-binding vascular endothelial growth factor fusion protein in situ. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(9):1998-2004.
88. Isidori A, Motta MR, Tani M, et al. Positive selection and transplantation of autologous highly purified CD133(+) stem cells in resistant/relapsed chronic lymphocytic leukemia patients results in rapid hematopoietic reconstitution without an adequate leukemic cell purging. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007;13(10):1224-1232.
89. Iwasaki H, Suda T. Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci.* 2009;100(7):1166-1172.
90. Jones, E, English A, Churchman SM. et al. Large-scale extraction and characterization of CD271+ multipotential stromal cells from trabecular bone in health and osteoarthritis: implications for bone regeneration strategies based on uncultured or minimally cultured multipotential stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2010;(62):1944-1954.
91. Jones RJ, Celano P, Sharkis SJ, Sensenbrenner LL. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood.* 1989;73(2):397-401.
92. Jönsson S, Hjorth-Hansen H, Olsson B, et al. Second-generation TKI dasatinib inhibits proliferation of mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation in vitro. *Leukemia.* 2010;24(7):1357-1359.
93. Jönsson S, Olsson B, Ohlsson C, et al. Increased cortical bone mineralization in imatinib treated patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica.* 2008;93(7):1101-1103.
94. Jootar S, Pornprasertsud N, Petvises S, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from chronic myeloid leukemia t(9;22) patients are devoid of Philadelphia chromosome and support cord blood stem cell expansion. *Leuk. Res.* 2006;30(12):1493-1498.

95. Juan M, Colobran R. Chemokines and Chemokine Receptors. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2009;(1):1-11.
96. Junttila I, Bourette RP, Rohrschneider LR, Silvennoinen O. M-CSF induced differentiation of myeloid precursor cells involves activation of PKC-delta and expression of Pkare. *J. Leukoc. Biol.* 2003;73(2):281-288.
97. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, et al. Analysis of the impact of imatinib mesylate therapy on the prognosis of patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia treated with interferon-alpha regimens for early chronic phase. *Cancer.* 2003;98(7):1430-1437.
98. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer.* 2003;97(4):1033-1041.
99. Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, et al. Imatinib mesylate for Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon-alpha: follow-up results. *Clin. Cancer Res.* 2002;8(7):2177-2187.
100. Katayama Y, Battista M, Kao W-M, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell.* 2006;124(2):407-421.
101. Katsumi A, Kiyoi H, Abe A, et al. FLT3/ITD regulates leukaemia cell adhesion through $\alpha 4\beta 1$ integrin and Pyk2 signalling. *Eur. J. Haematol.* 2011;86(3):191-198.
102. Kiel MJ, Acar M, Radice GL, Morrison SJ. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell.* 2009;4(2):170-179.
103. Kiel MJ, Radice GL, Morrison SJ. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell.* 2007;1(2):204-217.
104. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-1121.
105. Klion AD, Robyn J, Akin C, et al. Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to imatinib mesylate treatment in patients with the myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood.* 2004;103(2):473-478.

106. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat. Med.* 2006;12(6):657-664.
107. Koutna I, Peterkova M, Simara P, et al. Proliferation and differentiation potential of CD133+ and CD34+ populations from the bone marrow and mobilized peripheral blood. *Ann. Hematol.* 2011;90(2):127-137.
108. Kozhevnikova MN, Mikaelian AS, Paiushina OV, Starostin VI. [Comparative characterization of mesenchymal bone marrow stromal cells at early and late stages of culturing]. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2008;(2):156-162.
109. Kuçi, S. *et al.* CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica.* 2010;(95): 651-659.
110. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.* 2002;30(9):973-981.
111. Lee CCI, Christensen JE, Yoder MC, Tarantal AF. Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells. *Exp. Hematol.* 2010;38(1):46-54.
112. Lee J-L, Kim JY, Ryu M-H, et al. Response to imatinib in KIT- and PDGFRA-wild type gastrointestinal stromal associated with neurofibromatosis type 1. *Dig. Dis. Sci.* 2006;51(6):1043-1046.
113. Lévesque J-P, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal «osteoblastic» niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia.* 2010;24(12):1979-1992.
114. Levi B, James AW, Wan DC, et al. Regulation of human adipose-derived stromal cell osteogenic differentiation by insulin-like growth factor-1 and platelet-derived growth factor-alpha. *Plast. Reconstr. Surg.* 2010;126(1):41-52.
115. Lewis JM, Baskaran R, Taagepera S, Schwartz MA, Wang JY. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93(26):15174-15179.

116. Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yoder MC. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp. Hematol.* 2004;32(12):1226-1237.
117. Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature.* 2009;457(7225):92-96.
118. Lu S-J, Feng Q, Caballero S, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat. Methods.* 2007;4(6):501-509.
119. Lund JE. Toxicologic effects on blood and bone marrow. *Schalm's veterinary hematology.* Wiley-Blackwell; 2000;(5): 44-50.
120. Lympieri S, Ersek A, Ferraro F, Dazzi F, Horwood NJ. Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood.* 2011;117(5):1540-1549.
121. Macías-Abraham C, Del Valle-Perez LO, Hernandez-Ramirez P, et al. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter(online).* 2010;26(4)256-275.
122. Marley SB, Gordon MY. Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin. Sci.* 2005;109(1):13-25.
123. Martín-Henao GA, Quiroga R, Sureda A, et al. L-selectin expression is low on CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukemia and interferon- α up-regulates this expression. *Haematologica.* 2000;85(2):139-146.
124. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc. Res.* 2003;58(2):390-398.
125. Matsumoto K, Yasui K, Yamashita N, et al. In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells.* 2000;18(3):196-203.
126. Matsunaga T, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. *Blood.* 1998;92(2):452-461.
127. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch. Med. Res.* 2003;34(6):476-488.
128. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología.* 2007; 2: 95-107.

129. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur. J. Haematol.* 1992;49(5):225-233.
130. Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch. Med. Res.* 2003;34(1):3-15.
131. McSweeney PA, Rouleau KA, Storb R, et al. Canine CD34: cloning of the cDNA and evaluation of an antiserum to recombinant protein. *Blood.* 1996;88(6):1992-2003.
132. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 2008;452(7186):442-447.
133. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466(7308):829-834.
134. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood.* 2008;111(2):485-491.
135. Metcalf D. Some general aspects of hematopoietic development. *Hematopoiesis: a developmental approach.* Oxford University Press US; 2001:3-14.
136. Miura Y, Gao Z, Miura M, et al. Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells.* 2006;24(11):2428-2436.
137. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2010;7(2):150-161.
138. Mughal TI, Goldman JM. Leucemia mieloide crónica: STI 571 magnifica el dilema terapéutico. *European Journal of Cancer (Ed. Española).* 2001;(1):303-310.
139. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011;32(7):315-320.
140. Nair RR, Tolentino J, Hazlehurst LA. The bone marrow microenvironment as a sanctuary for minimal residual disease in CML. *Biochem. Pharmacol.* 2010;80(5):602-612.
141. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature.* 2009;460(7252):259-263.
142. Neuroinformatica-homepage. Available at:
<http://vmicroscope.case.edu:8080/index.jsp>. Accedido Julio 15, 2011.

143. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001;97(8):2293-2299.
144. O'Brien S, Berman E, Borghaei H, et al. Chronic Myelogenous Leukemia. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ (on line)*.2010;(v2)
<http://www.24hmb.com/Upload/Editor/2010/1/4/2010010471144545.pdf>
145. O'Sullivan S, Naot D, Callon K, et al. Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms. *J. Bone Miner. Res.* 2007;22(11):1679-1689.
146. Oh I-H, Kwon K-R. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. *Stem Cells*. 2010;28(7):1243-1249.
147. Ohneda O, Fennie C, Zheng Z, et al. Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonad-mesonephros region-derived endothelium. *Blood*. 1998;92(3):908-919.
148. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-399.
149. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-644.
150. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 2000;1(1):57-64.
151. Osorio S, Noblejas AG, Durán A, Steegmann JL. Imatinib mesylate induces hypophosphatemia in patients with chronic myeloid leukemia in late chronic phase, and this effect is associated with response. *Am. J. Hematol.* 2007;82(5):394-395.
152. Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(13):5431-5436.
153. Péault B. Hemangioblasts: back to the future? *Blood*. 2010;116(16):2864-2865.
154. Pelletier SD, Hong DS, Hu Y, Liu Y, Li S. Lack of the adhesion molecules P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 accelerate the development of BCR/ABL-

- induced chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice. *Blood*. 2004;104(7):2163-2171.
155. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002;100(9):3203-3208.
 156. Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt L-J. Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. 2008;43(6):976-982.
 157. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
 158. Puch S, Armeanu S, Kibler C, et al. N-cadherin is developmentally regulated and functionally involved in early hematopoietic cell differentiation. *J. Cell. Sci.* 2001;114(Pt 8):1567-1577.
 159. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):671-684.
 160. Quinn JMW, Saleh H. Modulation of osteoclast function in bone by the immune system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009;310(1-2):40-51.
 161. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-1630.
 162. Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc.* 2006;81(7):973-988.
 163. 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(7):783-791.
 164. Quittet P, Ceballos P, Lopez E, et al. Low doses of GM-CSF (molgramostim) and G-CSF (filgrastim) after cyclophosphamide (4 g/m²) enhance the peripheral blood progenitor cell harvest: results of two randomized studies including 120 patients. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38(4):275-284.
 165. Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-857.
 166. Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech.* 2010;43(1):55-62.

167. Rohrbacher M, Hasford J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009;22(3):295-302.
168. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324-336.
169. Salter AB, Meadows SK, Muramoto GG, et al. Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo. *Blood.* 2009;113(9):2104-2107.
170. Santa María del Pilar, Bachillerato Biología y Geología. Available at: http://www.santamariadelpilar.org/attachments/239_Hematopoyesis.pdf Accedido Febrero 3, 2011.
171. Sauvageau G, Iscove NN, Humphries RK. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene.* 2004;23(43):7223-7232.
172. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *N. Engl. J. Med.* 2002;346(9):683-693.
173. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood.* 2002;99(10):3530-3539.
174. Schroeder T. Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. *Cell Stem Cell.* 2010;6(3):203-207.
175. Shi Y, Liu CH, Roberts AI, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 2006;16(2):126-133.
176. Shirasaki R, Tashiro H, Mizutani-Noguchi M, Kawasugi K, Shirafuji N. Chronic myelogenous leukemia cells convert to myofibroblasts in vitro: effect of vascular endothelial growth factor on development of the microenvironment. *Leuk. Res.* 2011;35(5):663-669.
177. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch. Med. Res.* 2003;34(6):565-571.
178. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* 1992;148(1):267-271.

179. Singbrant S, Russell MR, Jovic T, et al. Erythropoietin couples erythropoiesis, B-lymphopoiesis, and bone homeostasis within the bone marrow microenvironment. *Blood*. 2011;117(21):5631-5642.
180. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*. 2005;435(7044):969-973.
181. Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*. 2003;10(1):9-16.
182. Söderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009;1176:55-69.
183. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp. Hematol.* 2008;36(8):1035-1046.
184. Sträter N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal*. 2006;2(2):343-350.
185. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-988.
186. Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, et al. AC133+ G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(5):704-715.
187. Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;87(9):3584-3588.
188. Szilvassy SJ, Hoffman R. Enriched hematopoietic stem cells: basic biology and clinical utility. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 1995;1(1):3-17.
189. Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res.* 2003;34(6):446-460.

190. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99(6):1928-1937.
191. Thorén LA, Liuba K, Bryder D, et al. Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J. Immunol*. 2008;180(4):2045-2053.
192. Tibullo D, Giallongo C, La Cava P, et al. Effects of imatinib mesylate in osteoblastogenesis. *Exp. Hematol*. 2009;37(4):461-468.
193. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res*. 1961;14:213-222.
194. Till JE, McCulloch EA. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*. 1980;605(4):431-459.
195. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, et al. PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J. Bone Miner. Res*. 2008;23(9):1519-1528.
196. Tormin A, Li O, Brune JC, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*. 2011;117(19):5067-5077.
197. Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2010;10(3):201-209.
198. Tsao AS, Kantarijian H, Talpaz M. STI-571 in chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2002;119(1):15-24.
199. Uher F, Hajdu M, Vas V. Self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: a molecular approach (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2003;50(1):3-21.
200. Usuki K, Iijima K, Iki S, Urabe A. CML cytogenetic relapse after cessation of imatinib therapy. *Leuk. Res*. 2005;29(2):237-238.
201. Vaziri C, Faller DV. Down-regulation of platelet-derived growth factor receptor expression during terminal differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 1996;271(23):13642-13648.
202. Veillette A. SLAM-family receptors: immune regulators with or without SAP-family adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(3):a002469.

203. Vianello F, Villanova F, Tisato V, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica*. 2010;95(7):1081-1089.
204. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, et al. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004;103(9):3258-3264.
205. Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J*. 2005;19(1):1-11.
206. Wein F, Pietsch L, Saffrich R, et al. N-cadherin is expressed on human hematopoietic progenitor cells and mediates interaction with human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res*. 2010;4(2):129-139.
207. Weisberg E, Manley P, Mestan J, et al. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br. J. Cancer*. 2006;94(12):1765-1769.
208. Wiesmann A, Bühring H-J, Mentrup C, Wiesmann H-P. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med*. 2006;2:8.
209. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2004;18(22):2747-2763.
210. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol*. 2006;6(2):93-106.
211. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*. 2010;116(23):4815-4828.
212. Winslow. Leucemia mielógena crónica: Tratamiento (PDQ®) (2007). Available at: <http://www.meb.uni-bonn.de/Cancernet/CDR0000256791.html>. Accedido Julio 16, 2011.
213. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res*. 2003;34(6):461-475.
214. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*. 2001;294(5548):1933-1936.

215. Xie Y, Yin T, Wiegraeb W, et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*. 2009;457(7225):97-101.
216. Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S-ichiro, et al. TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood*. 2009;113(6):1250-1256.
217. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90(12):5002-5012.
218. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J. Clin. Invest*. 2006;116(5):1195-1201.
219. Yokota T, Meka CSR, Kouro T, et al. Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J. Immunol*. 2003;171(10):5091-5099.
220. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-697.
221. Zhang H-M, Zhang L-S. Influence of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation of chronic myeloid leukemia cells. *Ai Zheng*. 2009;28(1):29-32.
222. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-841.
223. Zhao Z, Tang X, You Y, et al. Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hemotopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res*. 2006;30(8):993-1003.
224. Zhao Z-G, Li W-M, Chen Z-C, You Y, Zou P. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with chronic myeloid leukemia. *Immunol. Invest*. 2008;37(7):726-739.