



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO IN VITRO DEL IMATINIB Y DASATINIB EN LA
FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

HILDA JANNET SALDIVAR SANTOYO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA. FACULTAD DE MEDICINA.

**COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELÁZQUEZ. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.
DR. JESÚS CHIMAL MONROY. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.**

MÉXICO, D.F. ENERO DE 2014.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO IN VITRO DEL IMATINIB Y DASATINIB EN LA
FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

HILDA JANNET SALDIVAR SANTOYO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA. FACULTAD DE MEDICINA.

COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELÁZQUEZ. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.
DR. JESÚS CHIMAL MONROY. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.

MÉXICO, D.F. ENERO DE 2014.



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 14 de octubre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **SALDIVAR SANTOYO HILDA JANNET** con número de cuenta 512015398, con la tesis titulada **"EFECTO IN VITRO DEL IMATINIB Y DASATINIB EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES"**, realizada bajo la dirección de la DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA:

Presidente: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
Vocal: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Suplente: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Suplente: DRA. SARA HUERTA YÉPEZ

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de noviembre de 2013

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS.

- Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la formación académica brindada.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto con la beca No. 412853.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. Dirección de Prestaciones Médicas. Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud. Coordinación de Investigación en Salud. Programa de Formación de Investigadores. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Por el apoyo otorgado con la beca No. 005-12.
- Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Donde realicé el proyecto. A la Dra. Antonieta Chávez-González y al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, investigadores en esta unidad que participaron con colaboraciones para realizar este trabajo.
- Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas. Hospital Infantil Federico Gómez. A la Dra. Sara Huerta-Yepe, jefe de la unidad de investigación, por su colaboración en este trabajo.
- Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Departamento de Síntesis Orgánica. Al Dr. José Ignacio Regla Contreras por su colaboración en este trabajo.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. Coordinación de Unidades Médicas de Alta Especialidad y a la Coordinación de Investigación en Salud. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Dirección de Educación e Investigación en Salud y al Fondo de Investigación en Salud por el financiamiento de este proyecto bajo el no. del protocolo R-2006-3602-15.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.

- A los miembros del Comité Tutor: A la Dra. Eugenia Flores Figueroa, Dr. Jesús Chimal Monroy y al Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi Velázquez por su tiempo y dedicación en la asesoría para la formación del presente alumno. A mi tutor principal por su tiempo e interés en formar personas con mayor criterio y objetividad en el área profesional.
- A los sinodales por su tiempo y lecciones para enriquecer la presente tesis. El Dr. Jesús Chimal, la Dra. Leticia Rocha, el Dr. Marco Velasco, el Dr. Juan José Montesinos y a la Dra. Sara Huerta.
- A los investigadores que colaboraron en este trabajo. Dr. Ignacio Regla por la purificación de los fármacos, a la Dra. Sara Huerta y a la Dra. Guillermina Baay por el ensayo de TUNEL, el escáner de cultivos y el análisis de imagen, a la Dra. Antonieta Chávez por las muestras que nos otorgó para elaborar este trabajo de investigación y al Dr. Juan José Montesinos y el M.C. Oswaldo Silvestre por la estandarización de medios de inducción de la diferenciación.
- A todos los integrantes de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del H. Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Aprendí de todos Uds. y fue un verdadero privilegio conocerlos y poder trabajar con todos.
- A mi esposo Oswaldo Ibarra por su apoyo incondicional y enseñanzas. Él es un ejemplo de perseverancia, honestidad y trabajo constante que me impulsa ser una mejor persona.
- A mis papás, Aurelio Saldivar e Hilda Santoyo quienes serán por siempre el primer ejemplo de los mejores padres que un hijo pueda tener. Los amo y les agradezco que me hayan enseñado a trabajar por mis metas.
- A mis hermanos, Mariana Saldivar, Claudya Saldivar y José Saldivar que ahora son mis grandes amigos-hermanos. Con ellos he compartido experiencias, festejos y adversidades que juntos hemos podido solucionar. Particularmente a Mariana Saldivar por su fortaleza y por darme la felicidad de ser tía.
- A mis viejos amigos de toda la vida que no pudieron estar presentes en esta etapa pero que su presencia siempre ha sobresalido. A mis nuevos amigos: Lucero, Karol, Diana, Omar, Damián, Anna Karen, Dinhora, Mónica, Oswaldo, Lupita, Gerardo, Alberto y Rubicel, por pasar su tiempo y experiencias conmigo, sobre todo por sus opiniones y consejos.
- A todos mis profesores del posgrado, especialmente al próximo Dr. Daniel Espinosa de los Monteros del cual he aprendido algunas lecciones. La última de ellas: “No trato ocupar tu espacio, vengo a complementarte”. Gracias Daniel.

“Muchas veces, a lo largo de un mismo día, me doy cuenta que mi propia vida y sus logros se han construido gracias al trabajo de las personas que me rodean. También comprendo, con cuanta seriedad debo esforzarme para darles, en correspondencia, tanto como he recibido.”

Albert Einstein (1979-1955)

DEDICATORIA.

Deseo dedicarte el presente trabajo porque eres mi inspiración y porque tu presencia fue fundamental como fortaleza para concluir con éxito esta meta. Quiero celebrar este logro porque también es tuyo. Participaste no sólo como un apoyo emocional, además por el tiempo que dedicaste para escuchar, para aprender conmigo y para ofrecer siempre una opinión positiva. Con tu ejemplo he aprendido que con la dedicación, la disciplina y el trabajo constante todo problema tiene una solución.

Lo anterior tan sólo son un par de razones por el cual te has ganado un lugar muy importante y especial en mí.

Para ti, mi amado esposo Jesús Osvaldo Ibarra Gutiérrez.

“La constancia es el complemento indispensable de todas las demás virtudes humanas”.

Giuseppe Mazzini (1805-1872)

ÍNDICE.

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
2. ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
3. RESUMEN.....	13
4. ABSTRACT.....	14
5. INTRODUCCIÓN.....	15
5.1. Las células troncales.....	15
5.2. Las células troncales mesenquimales.....	15
5.2.1. Osteoblastos.....	16
5.2.2. Adipocitos.....	18
5.2.3. Condrocitos.....	18
5.3. La importancia de las células troncales mesenquimales en la Medicina.....	19
5.4. La importancia de las <i>MSC</i> en la remodelación ósea.....	20
5.5. La participación de receptores en la proliferación y la diferenciación de las <i>MSC</i>	21
5.6. Las cinasas de tirosina.....	22
5.7. Receptores con dominio de cinasa de tirosina.....	23
5.8. El receptor de PDGF.....	24
5.9. El receptor de EGF.....	28
5.9.1. Transducción de señales de los receptores de PDGF y del EGF.....	29
6. ANTECEDENTES.....	30
6.1. Imatinib.....	30
6.2. Dasatinib.....	31
6.3. El Imatinib y el Dasatinib, inhibidores de múltiples cinasas.....	31
7. OBJETIVO.....	34
7.1. Objetivo general.....	34
7.2. Objetivos específicos.....	34
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
8.1. Obtención de médula ósea de individuos hematológicamente sanos.....	34

8.2	Obtención de células adherentes para la caracterización.....	35
8.3.	Expansión de células adherentes para la caracterización.	36
8.4.	Caracterización de células troncales mesenquimales por inmunofenotipo.	37
8.5.	Diferenciación de las <i>MSC-N</i>	38
8.5.1.1.	Tinción cito-enzimática de la actividad de la fosfatasa alcalina.	39
8.5.2.1.	Tinción citoquímica de las vacuolas lipídicas con rojo oleoso.	40
8.5.3.1.	Inclusión en parafina de micromasas.	41
8.5.3.2.	Tinción citoquímica de tricrómico de Masson.....	42
8.6.	Obtención de una clona de la línea HS5 negativa para el receptor de PDGF y EGF. ...	43
8.7.	Proliferación de <i>MSC-N</i> y de HS5 PDGFR-/EGFR-.....	43
8.8.	Ensayo de TUNEL.....	43
8.9.	Actividad del Imatinib y el Dasatinib sobre la línea K562 Bcr-Abl positiva.	44
8.10.	Extracción de RNA total mediante tiocianato de guanidina/cloroformo.	44
8.11.	Síntesis de cDNA.....	45
8.12.	RT-PCR semicuantitativa de genes de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.....	45
8.12.1.	Análisis de imagen.....	46
8.13.	Análisis estadístico.....	46
9.	RESULTADOS.....	47
9.1.	Caracterizaciones de las <i>MSC-N</i> y de la línea HS5 derivadas de médula ósea.	47
9.2.	Elección de las concentraciones del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de las <i>MSC-N</i>	48
9.2.1.	Evaluación de la apoptosis en las <i>MSC-N</i> y en la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del Imatinib y el Dasatinib.....	49
9.2.2.	Potencial biológico del Imatinib y el Dasatinib sobre la línea K562.....	50
9.3.	El rhPDGF-BB incrementa la proliferación de las <i>MSC-N</i> y el Imatinib y el Dasatinib inhiben su efecto.....	50
9.4.	El rhEGF incrementa la proliferación de las <i>MSC-N</i> y el Imatinib y el Dasatinib inhiben su efecto.....	52

9.5.	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica de las <i>MSC-N</i> . ..	53
9.6.	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica de las <i>MSC-N</i> en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.	54
9.7.	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de <i>MSC-N</i>	55
9.8.	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las <i>MSC-N</i> en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.	57
9.9.	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica de las <i>MSC-N</i> .	59
9.10.	Efecto de Imatinib y Dasatinib en la diferenciación condrogénica de las <i>MSC-N</i> , en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.	60
10.	DISCUSIÓN.	61
11.	CONCLUSIONES.	67
12.	PERSPECTIVAS.	67
13.	FIGURAS DE RESULTADOS.	69
14.	BIBLIOGRAFÍA.	84

1. LISTA DE ABREVIATURAS.

ACAN	Agreecano.
APC	Alofocianina.
CD	Clúster de diferenciación.
DMEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
EphR	Receptor de efrina.
FAK	Cinasa de adhesión focal.
FGF	Factor estimulante de fibroblastos.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
g	Gravedad.
GAPDH	Gliceroaldehído 3-fosfato deshidrogenasa.
HS5 PDGFR/EGFR-	Línea celular HS5 negativa para la expresión del receptor de PDGF/EGF.
Ins	Insulina.
LPL	Lipo-proteína lipasa.
MAPK	Proteína cinasa activada de mitógenos.
min	Minutos.
μL	Microlitros.
MSC	Células troncales mesenquimales.
MSC-N	Células troncales mesenquimales de médula ósea normal, por sus siglas en inglés.
OSX	Osterix.
OCN	Osteocalcina.
PBS	Solución de buffer de fosfatos.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PE	Ficoeritrina.
PI3K	Cinasa 3 inositol fosfato.
PKC	Proteína cinasa C.
PLC	Fosfolipasa C.
PPAR	Receptores activados por el proliferador de peroxisomas.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
RPMI	Medio del Memorable Instituto del Parque Roswell.
RUNX2	Runt relacionada con el factor de transcripción 2.
SFB	Suero bovino fetal.
SOX9	Factor de transcripción relacionado a SRY.
VEGF	Factor estimulante de endotelio vascular.

2. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Nombre	
1	Células derivadas de la diferenciación <i>in vitro</i> de las células troncales mesenquimales.	17
2	Transferencia del grupo fosfato del ATP por la cinasa de tirosina a un residuo de tirosina de una proteína sustrato.	22
3	Familia de receptores con dominio tirosina cinasa.	24
4	Región intracelular del receptor de PDGF.	27
5	Transducción de señales activadas por el receptor de PDGF y EGF.	30
6	Caracterización de <i>MSC</i> derivadas de médula ósea de donadores hematológicamente normales.	69
7	Caracterización de HS5 PDGFR-/EGFR- derivada de médula ósea.	70
8	Elección de las concentraciones del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de <i>MSC-N</i> .	71
9	Evaluación de la apoptosis en las <i>MSC-N</i> y en HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del Imatinib y el Dasatinib. Actividad sobre línea K562 Bcr-Abl positiva.	72
10	Cinética de proliferación de las <i>MSC-N</i> y de la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en medio con suero en presencia del Imatinib o el Dasatinib en conjunto con el rhPDGF-BB.	73
11	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de <i>MSC-N</i> y en la línea HS5 PDGFR-/EGR- en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en cultivo libre de suero.	74
12	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica.	75
13	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en los genes de diferenciación osteogénica de <i>MSC-N</i> en presencia de rhPDGF o rhEGF.	76
14	Evaluación morfológica del efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las <i>MSC-N</i> .	77
15	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la expresión de genes de diferenciación adipogénicos en las <i>MSC-N</i> .	78
16	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las <i>MSC-N</i> en presencia del rhPDGF-BB.	79
17	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las <i>MSC-N</i> en presencia del rhEGF.	80
18	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en los genes de diferenciación adipogénica de las <i>MSC-N</i> en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.	81
19	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica de las <i>MSC-N</i> .	82
20	Efecto del Imatinib y el Dasatinib en los genes de diferenciación condrogénica de las <i>MSC-N</i> en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.	83

3. RESUMEN.

El Imatinib y el Dasatinib (fármacos que se desarrollaron para inhibir la actividad de la cinasa Bcr-Abl) también inhiben a la cinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y al epidérmico (EGF). El receptor de PDGF y el de EGF regulan la proliferación de las células troncales/estromales mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), las cuales participan en la homeostasis ósea.

El Imatinib y el Dasatinib inhiben la proliferación e incrementan la diferenciación osteogénica y adipogénica de las MSC, pero no está claro el mecanismo por el cuál tienen este efecto. La inhibición exclusiva del receptor de PDGF no restablece el efecto encontrado al utilizar Imatinib, lo que sugiere que este fármaco inhibe a cinasas adicionales.

En este trabajo se planteó conocer si dos de las vías que regulan la proliferación en las MSC como el receptor de PDGF y el de EGF, tienen efecto en su diferenciación hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico. También conocer si este efecto puede ser abatido por el Imatinib y el Dasatinib y si existen diferencias entre los fármacos. Para ello se examinó el efecto del PDGF y el EGF en la proliferación y diferenciación de las células troncales mesenquimales normales (MSC-N) en cultivos *in vitro*, así como el efecto de Imatinib y Dasatinib en cultivos con suero fetal bovino y en cultivos libre de suero. Para conocer si los fármacos inhiben vías adicionales utilizamos una clona de la línea celular HS5, la cual no expresa estos receptores (HS5 PDGFR-/EGFR-).

En este estudio se reportó que el Imatinib y el Dasatinib inhibieron la proliferación de las MSC-N e incrementaron su diferenciación hacia el linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico. El PDGF y el EGF incrementaron la proliferación de las MSC-N y tanto el Imatinib como el Dasatinib fueron capaces de abatir dicho efecto. El Imatinib inhibió la proliferación de las MSC-N a través de la inhibición del efecto del PDGF y EGF únicamente, mientras que Dasatinib fue capaz de inhibir estos efectos y se sugiere que también por otras vías adicionales, debido a que inhibió la proliferación de HS5 PDGFR-/EGFR-. En un cultivo libre de suero, el PDGF y el EGF no tuvo un efecto directo en la diferenciación adipogénica y condrogénica de las MSC-N. En cambio el PDGF inhibió la expresión de osteocalcina (en la etapa tardía del cultivo osteogénico) y el Imatinib y el Dasatinib contrarrestaron este efecto. Sin embargo, la inhibición exclusiva del efecto del PDGF (por los fármacos) no incrementó la diferenciación osteogénica; lo que sugiere que el Imatinib y el Dasatinib inhiben otros factores adicionales. El EGF no tuvo un efecto directo en la diferenciación osteogénica.

Este es el primer estudio que reporta que el Imatinib y el Dasatinib tienen un efecto sobre la diferenciación condrogénica de las MSC-N; también asocia la inhibición del efecto de PDGF y EGF por ambos fármacos en la proliferación de MSC-N y por último se compara el efecto de ambos fármacos en la proliferación y diferenciación de las MSC-N. Debido a que el Imatinib tiene un efecto mayor en incrementar la osteogénesis será necesario realizar estudios clínicos que permitan conocer si el Imatinib tiene ventaja en pacientes con osteoporosis senil.

4. ABSTRACT.

Imatinib and Dasatinib (drugs that were developed to inhibit the kinase activity of Bcr-Abl) can also inhibit platelet derived growth factor receptor (PDGF) and epidermal growth factor receptor (EGF). These receptors promote proliferation of mesenchymal stem/stromal cells (MSC) that are involved in bone homeostasis.

Imatinib and Dasatinib inhibit proliferation and increase osteogenic and adipogenic differentiation of MSC, but we do not know by which pathway. A PDGF receptor inhibitor does not recapitulate Imatinib effects; suggesting that the drug inhibits additional kinases.

We compared the effect of Imatinib and Dasatinib on the proliferation, differentiation and their inhibition in two main proliferation pathways (PDGF and EGF receptor) in MSC on *in vitro* cultures in presence or absence of bovine fetal serum. To determine if the drugs inhibit additional pathways we use a clone of the cell line HS5, which does not express these receptors (HS5 PDGFR-/EGFR-).

Here, we report that Imatinib and Dasatinib inhibit the proliferation of normal bone marrow mesenchymal stem/stromal cells (MSC-N) by inhibiting PDGFR and EGFR. Dasatinib also inhibits additional pathways that need to be characterized. Both drugs promote osteogénesis, adipogénesis and chondrogenesis but at different levels, Imatinib is a better increaser of osteogénesis and Dasatinib of adipogénesis. Our study suggests that PDGR and EGFR do not have a direct role on the differentiation of MSC-N.

This is the first result which reports that Imatinib and Dasatinib increases the chondrogenic differentiation on MSC-N, and that explores the participation of PDGFR and EGFR pathways and to compare the effect of both drugs. Imatinib and Dasatinib inhibit Bcr-Abl efficiently, but our study showed that they have different effects on the MSC-N, so it will be necessary to conduct clinical studies that reveal if Imatinib has advantages in patients with senile osteoporosis.

5. INTRODUCCIÓN.

5.1. Las células troncales.

En los estudios del desarrollo embrionario se identificaron que diferentes especies desde nematodos hasta el ser humano son originados a partir de una célula (1, 2). Esta célula se denomina célula totipotencial (zigoto) ya que tiene la capacidad de originar a todos los grupos celulares que compone al embrión así como a los tejidos extraembrionarios. Las células troncales pluripotenciales tienen un potencial más restringido ya que sólo originan a las células del embrión y por último las células troncales multipotenciales que originan al tipo celular de acuerdo a la capa embrionaria que pertenecen (3).

En la mayoría de los tejidos existen poblaciones intermedias, que están en el intervalo de las células troncales hasta las células diferenciadas, las cuales se denominan células progenitoras. Estas células tienen dentro sus funciones la de incrementar el número de células diferenciadas para mantener el requerimiento celular. Por lo anterior, no debe confundirse la definición entre una célula progenitora y una célula troncal. Para esclarecer las diferencias se amplía su descripción considerando no sólo su potencial de diferenciación sino además sus criterios funcionales. Una célula troncal es una célula inmadura, no diferenciada con una capacidad de dividirse y originar al menos una de sus dos descendientes a una célula troncal (proceso denominado auto-renovación) y además tener la capacidad de originar a diversos tipos celulares de acuerdo a su jerarquía (4).

De las células troncales multipotenciales se pueden citar ejemplos como las células troncales hematopoyéticas, las cuales son células que dan origen a todo el estirpe de células sanguíneas; las células troncales neurales son aquellas que originan a las neuronas, los astrocitos y a los oligodendrocitos, y las células troncales mesenquimales son células que dan origen a hueso, cartílago y tejido adiposo (4).

5.2. Las células troncales mesenquimales.

Las células troncales/estromales mesenquimales (*MSC*, por sus siglas en inglés) son componentes del estroma de la médula ósea y tienen el potencial de dar origen a tejido conjuntivo. Los trabajos realizados por Friedenstein y Owen demostraron que trasplantes

heterópicos de células estromales de médula ósea de cobayo y de conejo dieron origen a hueso y cartílago (26, 27). Posteriormente se realizaron estudios en regeneración de tejido y cultivos *in vitro* para evaluar la capacidad de las *MSC* para dar origen a múltiples tipos de células estromales como los adipocitos, los tendocitos, las células del músculo y el hueso. Debido a su potencial de dar origen a múltiples tipos celulares Caplan acuñó el término para denominar a este tipo celular como células troncales mesenquimales (7).

El hecho es que la población de *MSC* de médula ósea es heterogénea. Pittenger y cols., han observado *in vitro* que clonas de *MSC* tienen la capacidad de originar a tres linajes como los osteoblastos, los adipocitos y los condrocitos, mientras que otras clonas sólo dan origen a los osteoblastos, o bien hacia dos linajes en donde prevalecen los osteoblastos (8). Adicionalmente se han obtenido a las *MSC* a partir de diferentes antígenos. El primer anticuerpo que se utilizó fue dirigido al STR0-1 (9), posteriormente se comenzaron a emplear anticuerpos contra el Thy-1(CD90), el CD44, el CD146, el receptor de NGF, el CD140b, hacía el receptor de EGF, hacía el receptor de insulina-1, el CD105, el CD73 y el CD200 (10).

Debido a la identificación de múltiples antígenos celulares en las *MSC* y a la falta de procedimientos homogéneos para aislar a esta población, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*ISCT*, por sus siglas en inglés) postuló en 2006 algunos criterios mínimos para su selección. 1) La propiedad de adherirse al plástico de los frascos de cultivo, 2) La expresión de los antígenos de superficie CD90, CD73 y CD105; y la ausencia de los antígenos hematopoyéticos CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19, CD79a y HLA-DR y 3) La capacidad de diferenciarse *in vitro*, en presencia de medios inductores de la diferenciación hacia los osteoblastos, los adipocitos y los condrocitos.

5.2.1. Osteoblastos.

Son células derivadas de las *MSC*. Adicional a los estudios de Friedenstein y Owen, Kadiyala y cols., demostraron que el trasplante heterópico de las *MSC* obtenidas de la médula ósea canina, dieron origen a hueso y cartílago (11, 26, 27). En cultivos *in vitro*, los osteoblastos se identifican por una morfología cuboides (Figura 1A); por la expresión de factores de transcripción como RUNX2 y OSX que regulan genes como el de la

fosfatasa alcalina (ALP), colágena tipo I, osteopontina (OPN), sialoproteína de hueso (BSP) y osteocalcina (OCN) (12); también por la presencia de la fosfatasa alcalina (capaz de hidrolizar el p-nitrofenol fosfato) y por forman matriz extracelular y depósitos de calcio positivos a la tinción rolo alizarina y von Kossa.

En cultivos *in vitro* la proteína morfogénica de hueso (BMP) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) regulan la expresión de marcadores osteogénicos de las MSC inducidas a la diferenciación osteogénica (osteogénesis). La BMP induce la activación de ERK/MAPK o PI3K/Akt y estos a RUNX2 y OSX y rio abajo la expresión de ALP (13–15). Por el contrario el PDGF actúa como un regulador negativo de la diferenciación osteogénica. En cultivos osteogénicos de líneas celulares, cultivos primarios murinos o de MSC humano se observó que la presencia del PDGF inhibe la expresión de la ALP, la OCN y calcio en estos tipos celulares (16–18).

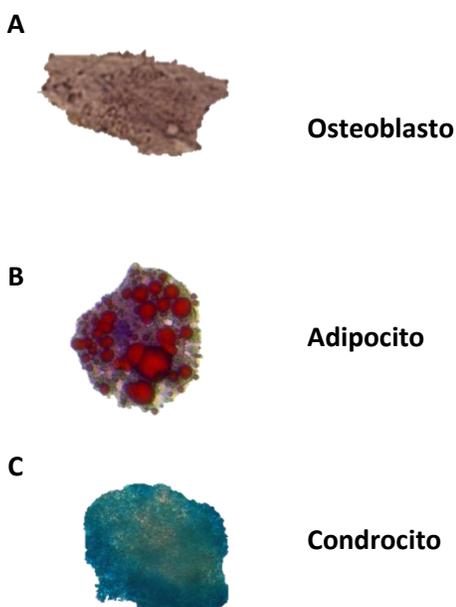


Figura 1· Células derivadas de la diferenciación *in vitro* de las células troncales mesenquimales. Las MSC son diferenciadas en presencia de medio inductor para dar origen a diferentes linajes como **A.** Célula osteogénica expresando fosfatasa alcalina. **B.** Célula adipogénica con vacuolas lipídicas teñidos con rojo oleoso. **C.** Conglomerado de células condrogénicas expresando proteoglicanos teñidos con azul alciano.

En la medula ósea, los osteoblastos tienen un rol importante en la generación de células sanguíneas. En estudios *in vivo* los osteoblastos tienen una asociación espacial estrecha con las células troncales hematopoyéticas (HSC), y la ausencia de estas células provoca una drástica disminución de progenitores y de HSC. Debido a esto, se reconoció que los osteoblastos es el nicho endosteal de las HSC. El nicho, es un lugar específico que

además de retener a las HSC, regula su fisiología y le confiere protección de señales de maduración o proliferación (19).

5.2.2. Adipocitos.

En cultivos *in vitro* los adipocitos son células que derivan de las *MSC* (Figura 1B). El contenido lipídico de un adipocito es casi el 95% de su peso celular; por lo que almacena una gran cantidad de ácidos grasos como los triglicéridos, los esteres de colesterol, la leptina, la adiponectina y la lipoproteína. La cantidad de lípido progresa conforme a su maduración. Estudios en microscopia electrónica revelaron que adipocitos derivados de tejido graso de cerdo contienen multioculares al día cero, mientras que al día 3 incrementa de 2 a 9 gotas grandes lipídicas en el centro, con la presencia de gotas más pequeñas en la periferia. De tal manera, que al día 9 se observó la presencia de vacuolas uniloculares cada vez más grandes (20).

La generación de nuevos adipocitos (adipogénesis) es imprescindible ya que previene los adipocitos hipertrofiados, los de insulina-resistentes, así como la deposición de adipocitos en el músculo, el páncreas y el hígado (21). En cultivos *in vitro* se relacionó que la adipogénesis derivada de las *MSC* depende de hormonas pro-adipogénicas (insulina) y anti-adipogénicas (PDGF) así como del arresto del ciclo celular (22).

En la adipogénesis derivada de las *MSC* están presentes factores de transcripción como el SREBP1 (proteína de unión 1 al elemento de respuesta del estero), la C/EMPa (proteína de unión al *enhancer* CAAT), el PPAR (receptor activado-peroxisoma proliferador), además de los genes relacionados con la maduración de los adipocitos: la adiponectina, la proteína de unión de adipocito (aP2), la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la lipoproteína lipasa (LPL) (21, 22).

5.2.3. Condrocitos.

Los condrocitos derivan de las *MSC* (Figura 1C) (27, 32). Son células que forman al cartílago y producen matriz extracelular como colágena tipo II y IX, además de proteoglicanos que constituyen el 95 % del tejido. La formación de cartílago es

imprescindible para el proceso de la osificación endocondreal en la formación de hueso. Durante el proceso de formación de cartílago (condrogénesis) se observa 3 etapas morfológicas y 5 para la osificación endocondral. Este proceso fue descrito Yamashita y cols., en un modelo de diferenciación condrogénica a partir de células troncales embrionarias de ratón (23).

- 1) Condensación de células. En esta etapa se forman esferas celulares, debido a la participación de los factores de crecimiento de la familia de TGF β .
- 2) Cambios morfológicos celulares acompañado por la expresión de factores de transcripción como SOX9 los cuales, inducen la expresión de colágena tipo II y por lo tanto la diferenciación condrogénica (24).
- 3) Síntesis y deposición de la matriz extracelular.
- 4) y 5) son procesos que involucran a la hipertrofia y degradación del condrocito y posterior remplazo por hueso (23).

En la condrogénesis participan SOX9 y PDGF para incrementar la expresión de colágena tipo II (24–26). El PDGF tiene como efecto inhibir la hipertrofia del condrocito e incrementar la síntesis de colágena, de los proteoglicanos y de las integrinas en estadios tempranos de la diferenciación de células derivadas de fémur de caninos (26). Por otro lado, Lin Jim y cols., evaluaron la correlación de la expresión del mRNA de SOX9 con la colágena tipo II en embriones de ratón (en estadio 8.5 d.p.c) (24) y Ataliotis evaluó la relación que tiene la expresión de mRNA del receptor de PDGF y su ligando en el desarrollo de extremidades en embriones de pollo (E27-30) y que éstas células *ex vivo* en presencia de medio inductor condrogénico, expresan proteoglicanos positivos a azul alciano (25). De la misma manera, la vía de Wnt-B-catenina es requerida en la etapa de maduración y proliferación de condrocitos (27).

5.3. La importancia de las células troncales mesenquimales en la Medicina.

Las *MSC* tienen una participación en distintas áreas de la biomedicina y su interrelación entre estas ciencias. La Hematología fue la primera área en donde se reconoció la participación de las *MSC* regulando la producción de células sanguíneas a través de su

progenie: osteoblastos y adipocitos. En la Reumatología y Traumatología tienen gran relevancia al ser reguladores centrales de la osteogénesis. Contribuyen a la formación ósea generando osteoblastos y osteocitos, así como indirectamente al regular la producción y activación de los osteoclastos en el proceso de reabsorción ósea. Recientemente se encontró que contribuyen en la regulación de la respuesta inmune, siendo ahora parte del complejo campo de la Inmunología. Las MSC inhiben la activación de los linfocitos B, T, células NK y dendríticas, y favorecen la producción de linfocitos T citotóxicos.

Las MSC han sido exitosamente trasplantadas y son parte de ensayos clínicos para probar su utilidad como coadyuvantes en el trasplante de médula ósea con el fin de mejorar el injerto y disminuir la enfermedad injerto contra huésped; así como para enfermedades no hematológicas al lograr que *in vitro* estas células originen a células no medulares como las neuronas, los cardiomiocitos y el endotelio (19).

5.4.La importancia de las MSC en la remodelación ósea.

Como se mencionó anteriormente, el papel de las MSC en disciplinas como la Reumatología y Traumatología tienen gran relevancia al ser reguladores centrales de la osteogénesis debido a que contribuyen a la formación ósea generando osteoblastos y osteocitos y de forma indirecta ya que regulan la producción y activación de los osteoclastos en el proceso de reabsorción ósea (19).

En el proceso de la remodelación ósea, el hueso se forma y se reabsorbe. La reabsorción del hueso la realizan los osteoclastos (parte del componente hematopoyético) y la formación de éste la realizan los osteoblastos. En cultivos *in vitro* se observó que la activación de los osteoclastos son regulados por los osteoblastos a través de la señalización del receptor activador del factor nuclear kappa-B ligando (RANKL) y osteoprotegerina (OPG) (28).

Las MSC dan origen a los osteoblastos y condrocitos los cuales son tipos de células que participan en la osificación endocondral. La mayoría de los huesos, incluyendo los largos donde está presente la actividad hematopoyética, son formados por osificación

endocondral. En la primera etapa, el condrocito prolifera en dirección unidireccional hasta formar columnas paralelas, después estas células se vuelven hipertróficas y mueren. Durante este tiempo, se produce matriz extracelular y producción de factores solubles como el factor de crecimiento vascular-endotelial, el cual promueve la llegada de componentes hematopoyéticos que se diferencian hacia osteoclastos. La participación de éstas células es la de degradar la matriz extracelular y condrocitos hipertróficos; para que después sean remplazados por osteoblastos y finalmente osteocitos (29) y formen el hueso.

Una vez formado el hueso, éste participa en el soporte de órganos suaves y del sistema nervioso central, en la liberación de calcio para el metabolismo, y en la regulación de la hematopoyesis.

5.5. La participación de receptores en la proliferación y la diferenciación de las MSC.

Las MSC expresan receptores de factores de crecimiento que regulan su proliferación. Simmons y cols., demostraron en cultivos libres de suero que las MSC tienen una dependencia absoluta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y del factor de crecimiento epidérmico (EGF) para proliferar (9). Por otro lado, el uso de antagonistas y modelos *ex vivo* de un ratón condicionado para el receptor de PDGF, han demostrado el requerimiento del receptor de PDGF para el crecimiento de células estromales (14, 77, 78, 83).

En la diferenciación el PDGF actúa como inhibidor de la adipogénesis y de la osteogénesis. En líneas celulares estromales de ratón y en las MSC derivadas médula ósea humana en presencia de medio inductor de la diferenciación y del PDGF, la expresión de calcio disminuye (39, 73) así como inhibe la expresión de moléculas adipogénicas como SREBP1, C/EBPa, PPAR, adiponectina y aP2 (22). En las células pluripotentes inducidas humanas y de ratón existe la dependencia de PDGF, TGF y BMP para la diferenciación condrogénica y en las MSC el PDGF regula desde los estadios tempranos, y TGF en los estadios de maduración (45, 79–81).

5.6. Las cinasas de tirosina.

En el humano existen 58 cinasas de tirosina (cuya función es la de incorporar y transferir grupos fosfato a partir del adenosin trifosfato (ATP) a residuos de tirosinas en proteínas sustrato) que pertenecen a receptores y 32 itinerantes o no asociadas a receptores (54).

Para que se lleve a cabo la fosforilación se requiere de la presencia de una cinasa de tirosina, del ATP y una proteína sustrato con residuos de tirosina, la cual va ser fosforilada. La cinasa de tirosina hidroliza el grupo fosfato γ -terminal del ATP y lo transfiere hacia los grupos hidroxilo de un residuo de tirosina localizado en la proteína sustrato (55) (Figura 2).

En condiciones normales, las cinasas de tirosina regulan las vías de señalización como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la migración, la comunicación y el metabolismo celular. Las alteraciones en la funcionalidad de éstas cinasas como la activación autócrina y el incremento de la expresión de los receptores con actividad cinasa están involucrados en el desarrollo del cáncer (56,57).

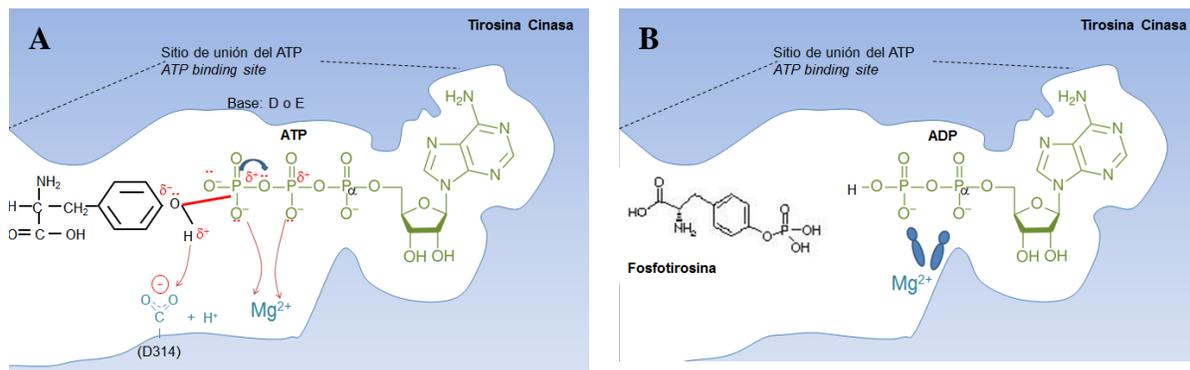


Figura 2. Transferencia del grupo fosfato del ATP por la cinasa de tirosina a un residuo de tirosina de una proteína sustrato. A. El ATP se une al sitio de activación de la cinasa de tirosina (azul). Ésta produce un reacomodo en los electrones entre el magnesio (Mg^{+2}) y el oxígeno del grupo fosfato del ATP. Dicho reacomodo promueve el rompimiento del grupo fosfato entre el beta y el gamma (de derecha a izquierda de los fosfatos de ATP). **B.** Transferencia del grupo fosfato gamma del ATP al residuo de tirosina (fosfotirosina) de una proteína sustrato.

5.7. Receptores con dominio de cinasa de tirosina.

Los receptores de cinasa de tirosina (RTK) se clasifican en 20 sub-familias de acuerdo a la similitud del dominio cinasa. La estructura general de un RTK incluye una región extracelular, transmembranal, juxtamembranal y citoplásmica. La región extracelular está compuesta por dominios que puede ser de tipo inmunoglobulinas, ricos en prolinas, lisinas, leucinas o de fibronectina (Figura 3B); la región transmembranal es una cadena alfa simple que atraviesa la membrana celular; y la región citoplasmática, la cual incluye el dominio cinasa así como la región juxtamembranal que junto al carboxilo terminal regulan la actividad de los RTK (58).

Dentro de la sub-familia de los RTK se encuentran los receptores del factor de crecimiento epidérmico (ErbB/HER/EGF), el receptor de insulina (IR), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el receptor del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la proteína cinasa de tirosina 7 (PTK7), el receptor del factor de crecimiento de nervios (Trk/NGF) (Figura 3A), por mencionar algunos.

Existe una activación general para los RTK. En estudios de cristalografía de la región extracelular de estos receptores se observó que el acoplamiento del ligando induce un cambio en su conformación. Por ejemplo, el c-KIT/SCFR (receptor del factor de células troncales) contiene 5 dominios extracelulares del tipo inmonoglobulina (DI-DV), su ligando se une a cada lado del receptor entre los dominios DI-III. Después los dominios DIV y DV sufren una re-orientación y posteriormente la dimerización del receptor (59). Esta dimerización provoca la fosforilación en forma de trans en los residuos de tirosina, en el asa de activación, en la región juxtamembranal y en la región c-terminal del dominio cinasa. De esta manera la fosforilación del receptor induce la activación del receptor (58).

Los RTK participan activamente en la reparación de tejidos y en la homeostasis celular. Por lo que alteraciones en su expresión o regulación, están relacionadas con varias enfermedades. Los receptores del EGF y del PDGF son expresados por células epiteliales y mesenquimales, respectivamente. Estos han recibido una mayor atención en el área

clínica y farmacológica debido su alteración está asociada a el cáncer, la fibrosis y el asma (60).

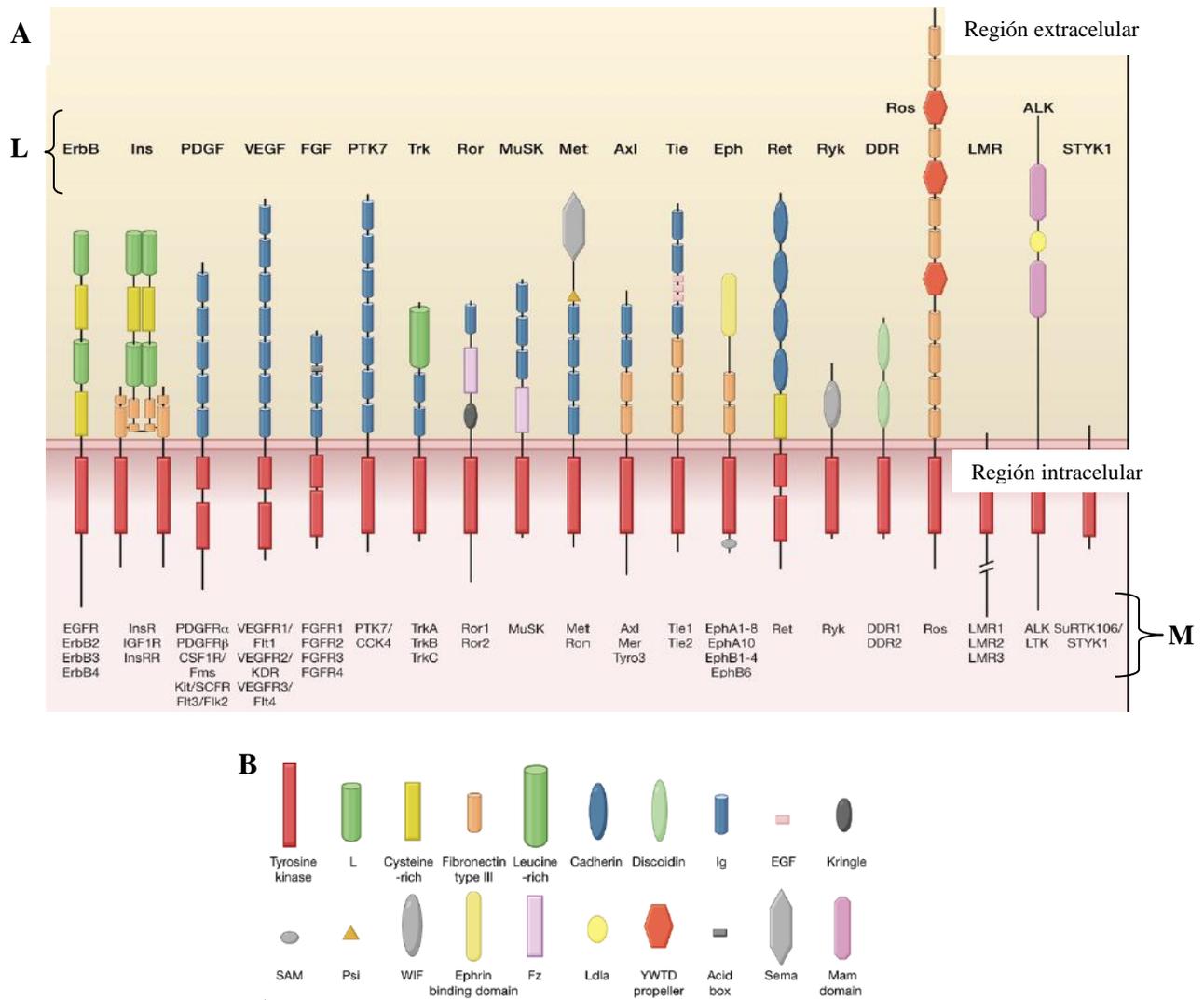


Figura 3. Familia de receptores con dominio cinasa de tirosina. Clasificación de los RTK de acuerdo a su similitud en el dominio cinasa. **A.** El dominio cinasa está representado por rectángulos rojos (continuos o segmentados) en la región intracelular. L. ligando, respectivo de cada receptor. M. Miembros de la familia del receptor. **B.** La región extracelular es representada por las acotaciones, según el tipo dominio que corresponde a cada receptor (58).

5.8. El receptor de PDGF.

El ligando del receptor de PDGF fue purificado en 1981 por Heldin y cols., (37) el cual fue considerado como un potente mitógeno (estimulador de la división celular) de las células de tejido conjuntivo como el de músculo liso y de fibroblastos (32). Actualmente

se reconocen cuatro isoformas: A, B, C y D. Las isoformas A y B son expresadas por diversos tipos celulares como las endoteliales, las epiteliales y las hematopoyéticas y en tejidos embrionarios (Cuadro 1). La isoforma C es expresada por los cardiomiocitos, los hepatocitos, las nefronas, así como por las células del páncreas y de ovario (38). Finalmente, la isoforma D es expresada por las células endoteliales y los fibroblastos de la adventicia (39).

Cuadro 1. Expresión de PDGF en diferentes tipos celulares y tejidos.

Célula humana	Proteína	mRNA	
		PDGF-A	PDGF-B
Células de tejido conectivo			
Fibroblastos de dermis	+	+	-
Del hígado que almacenas grasa	+	+	+
Masangiales	+	+	+
De aorta femoral	+	+	-
Células del epitelio/endotelio			
Renales	+	+	+
Vena umbilical	+	+	+
De las venas	+	+	+
De la cornea	+	+	+
Keratinocitos	+	+	+
Células de la islas pancreáticas	+	+	ND
Pleura	ND	+	ND
Células hematopoyéticas			
Monocitos alveolares	+	ND	+
Monocitos activados	+	+	+
Plaquetas y megacariocitos	+	+	+
Tejido			
Riñón	+	+	ND
Hígado	ND	+	ND
Pulmón	ND	+	ND
Músculo	ND	+	ND
Páncreas	+	+	ND
Placenta			
Primer trimestre	+	ND	+
Segundo trimestre	ND	+	+
Tercer trimestre	+	+	ND
Tiroides	ND	+	ND
Testis	ND	+	ND

(39). ND. No determinado.

Existe dos tipos del receptor de PDGF: el tipo alfa y el beta. Estos forman combinaciones en homo o heterodímeros. Esta combinación va a depender del tipo celular y a la presencia de uno o ambos tipos del receptor (Cuadro 2).

Cuadro 2. Presencia de receptor de PDGF alfa y beta en células de tejido conectivo.

Tipo de célula	Receptor de PDGF	
	alfa	beta
Fibroblastos	+	+
Macrófagos		+
Células Leydig	+	+
Células endoteliales sinusoidales del hígado	+	
Pericitos		+
Células endoteliales de capilares		+
Células mesangiales del riñón	+	+
Células Itoh (hígado)		+
Células epiteliales mamarias		+
Células del epitelio pigmentario (retina)	+	+
Células mieloides hematopoyéticas		+
Mioblastos		+
Células musculares lisas	+	+
Plaquetas/megacariocitos	+	
Células T		+
Células Schwann	+	+
Atrocitos	+	
Neuronas	+	+

(37).

La estructura general del receptor de PDGF consta de los siguientes componentes:

- Región extramembranal. Contiene 5 dominios tipo inmunoglobulina (DI – DV). El DII y el DIII interaccionan con el ligando (40) el cual es específico del tipo de receptor de PDGF. Esta interacción depende de al menos tres aspectos: 1) La constante de disociación con el ligando (41), 2) Del tipo de receptor que se encuentre en la célula y 3) De acuerdo a la secuencia complementaria con las cargas del receptor (40). Es decir, la isoforma BB tiene mayor afinidad que AB y DD sobre el receptor de PDGF beta-beta, mientras que la isoforma AA, BB y CC se une al receptor tipo alfa-alfa (38). Sin embargo el receptor también puede formar heterodímeros y entonces la activación de éste depende de la presencia de las isoformas del ligando: BB, AB, CC y DD (42).

- Región transmembranal y juxta-membranal. Desde 1993 se sabe que la región juxta-membranal participa en la fosforilación de las cinasas gracias a los estudios de Seiji Mori y cols., quienes aislaron de células endoteliales la región juxtamembranal (entre los residuos 568-597) y encontraron residuos de tirosina fosforilados (Tyr579, Tyr581 y Tyr589) (43). Después se comprobó en ensayos de mutación dirigida, que la región juxta-membranal regula la activación de proteínas como c-Src y STAT en la transducción de señales de manera independiente a través de las tirosinas fosforiladas (43,44).
- Dominio cinasa. Después de la dimerización del receptor (homo o heterodimérica) cada uno de los monómeros es fosforilado por un proceso denominado trans-fosforilación (que consiste en la fosforilación de los residuos de tirosina de cada lado de monómero del receptor, en forma de trans). La fosforilación por parte de una tirosina en particular (en el dominio cinasa) es la responsable de reclutar sustratos como STAT, PI3K, Src, PLC gamma (Figura 2) (43-45). De esta manera se lleva a cabo la activación de diversas funciones celulares, tales como la proliferación, la diferenciación, la migración, la apoptosis, la reorganización de la actina, etc.

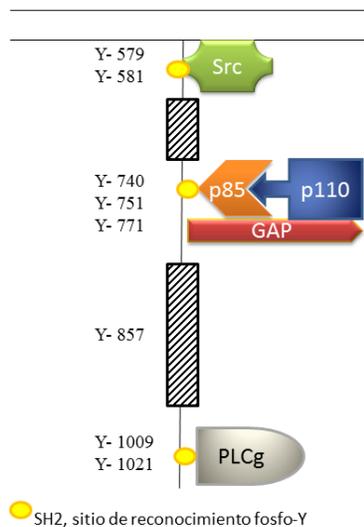


Figura 4. Región intracelular del receptor de PDGF. Sitios de reconocimiento de proteínas tirosina cinasa en la región juxta-membranal y el dominio cinasa. Modificado de Mori y cols., 1993.

5.9. El receptor de EGF.

En 1962 Cohen y cols., aislaron el ligando del receptor de EGF a partir de glándulas maxilares de ratón. Posteriormente, este mismo autor inyectó el extracto a ratones recién nacidos y observó la apertura precoz de ojos y erupción de dientes (46). Para 1975 ya se había logrado purificar y secuenciar el EGF humano, del que se observó su capacidad para estimular la proliferación de fibroblastos humanos y células epiteliales de pollo (47).

El receptor de EGF es miembro de la familia de proteínas ERBB o HER (1 al 4) y tiene una estrecha homología con el oncogén del virus de eritroblastoma (v-erbB). Las proteínas HER fueron descritas en células del carcinoma epidérmico y de ratones adultos. La fosforilación del receptor se ha observado en piel, músculo esquelético y en órganos internos durante la embriogénesis (47).

La estructura general del receptor de EGF consta de los siguientes componentes:

- **Región extramembranal.** Esta región contiene 4 dominios (DI-DIV) de los cuales dos son ricos en cisteína y dos en lisina. El DI y el DIII tienen afinidad con el ligando. Una vez que el ligando se aproxima a la región extramembranal produce una conformación denominada “atadura”. Posteriormente el DII de cada monómero provoca directamente la dimerización del receptor (48). Sin embargo, no sólo dímeros de EGF sino también otros ligandos como neuregulina (Cuadro 3) pueden activar de manera específica al receptor de EGF (49).

Cuadro 3. Activación del receptor de EGF por diferentes tipos de ligandos.

RECEPTOR	LIGANDOS
ErbB1/HER1	EGF
	TGF-a
	Amfiregulina
	Epiregulina
	Unión de Heparina parecido EGF
	Beta-celulina
ErbB2/HER2/c-Neu	Desconocido
ErbB3/HER3	Neuregulina
ErbB4/HER4	Neuregulina
	Epiregulina
	Unión a EGF-Heparina
	Beta-celulina

(49).

- Región transmembranal y juxta-membranal. Esta región contiene aproximadamente 30 residuos de aminoácidos que ejercen una carga positiva. Estos residuos son los responsables de hacer contacto con las cargas negativas de los lípidos de la membrana, de tal manera que la interacción electroestática formada regula la actividad del sitio catalítico (50).
- Dominio cinasa. La regulación del dominio cinasa en el receptor de EGF es producido por una configuración asimétrica que depende de la fosforilación del asa de activación en sitio catalítico (51). En estudios de mutación donde se inhibió la interacción entre C-terminal y el asa de activación en el dominio cinasa se perdió la regulación de la activación del receptor de EGF (52, 53).

5.9.1. Transducción de señales de los receptores de PDGF y del EGF.

Después de la dimerización del receptor continúa una serie de señalizaciones intracelulares como la fosforilación de proteínas, el reconocimiento y acoplamiento de grupos de proteínas a través de dominio SH2, etc. Adicionalmente se requiere de la adaptación de segundos mensajeros a los receptores para la formación de complejos entre receptores fosforilados y las moléculas que inician la señalización. Algunos ejemplos son: PI3K-Akt, PLC gamma-PKC, Src-FAK y Ras-MAPK (Figura 5).

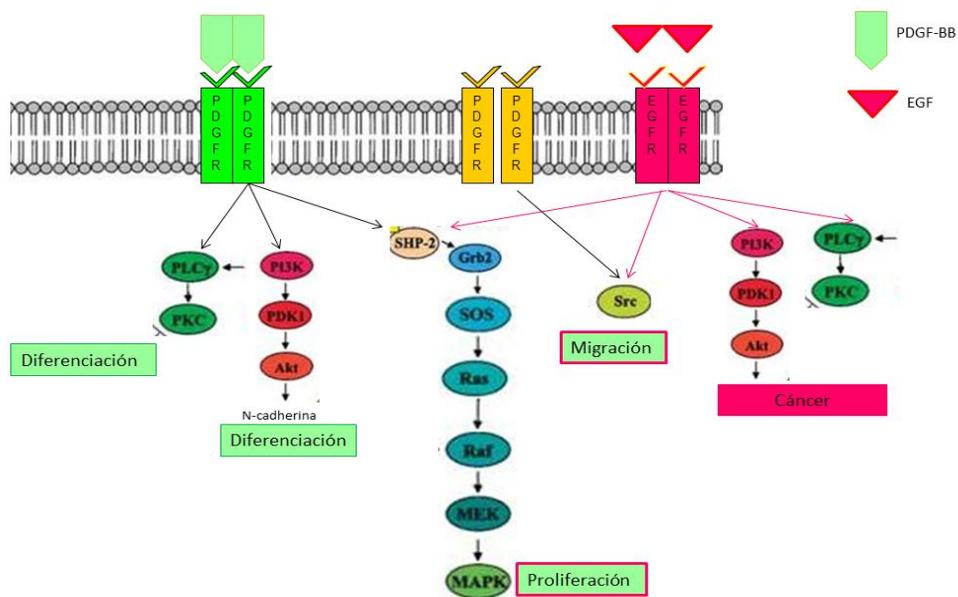


Figura 5. Transducción de señales activadas por el receptor de PDGF y del EGF. La dimerización del receptor de PDGF (verde y amarillo) o EGF (rosa) activa la vía de señalización mostrada en los recuadros respectivamente con el mismo color, o cuando la vía es activada por ambos receptores (verde/rosa) Modificado de Yang y col., 2008, KEGG pathway, Tokunaga 2008.

6. ANTECEDENTES.

6.1. Imatinib.

El Imatinib es un fármaco que se desarrolló en 1990 por el bioquímico Nicholas Lydon (investigador de Novartis), Charles Sawyers (investigador del Instituto de Medicina Howard) y el oncólogo Brian Druker (de la Universidad de Ciencia y Salud de Oregon). Éste fue obtenido por diseño racional (tecnología que tiene como objetivo la búsqueda de compuestos con base a la complementariedad de la estructura y las cargas parciales o netas sobre la molécula con la que va a interactuar) en el cual se obtuvo una molécula denominada 2-fenilaminopirimidina que después se le adicionó grupos de metilación y grupos bencénicos. El resultado de estas modificaciones dieron origen a la forma que ahora se conoce como el Mesilato de Imatinib (61).

El Imatinib fue desarrollado para inhibir la onco-proteína Bcr-Abl (62) (es una cinasa que deriva de la unión entre Bcr del cromosoma 9q y Abl del cromosoma 22q) la cual es responsable de transformar a las células hematopoyéticas y causar la Leucemia Mieloide

Crónica (LMC) (51, 52). En la LMC, el tratamiento del Imatinib es utilizado para inhibir el sitio de unión del ATP de Bcr-Abl (64) y de esta manera se evita su activación y la transducción de señales (65).

En casos particulares, los pacientes con LMC que presentan al Bcr-Abl son intolerantes o resistentes al momento de recibir por primera vez el fármaco (denominada resistencia primaria), mientras que otros desarrollan la resistencia después del tratamiento con el Imatinib (resistencia secundaria) (66). Algunos mecanismos de resistencia al fármaco son: 1) El incremento de la amplificación genómica de Bcr-Abl, 2) Las mutaciones puntuales en sitios de reconocimiento e interacción con el Imatinib y 3) El incremento en la expresión de transportadores de la familia ABC como el ABCB1 y ABCG2 (67).

Debido a las mutaciones en Bcr-Abl y la intolerancia que causa a las mínimas dosis administradas (25 mg/día) (62) el tratamiento con el Imatinib no es efectivo, por lo que se desarrolló un fármaco de nueva generación para contrarrestar estos efectos.

6.2. Dasatinib.

El Dasatinib es un fármaco con inhibición dual hacia Bcr-Abl y c-Src, el cual es administrado en pacientes resistentes o intolerantes al Imatinib. En estudios *in vitro* el Dasatinib es capaz de inhibir 14 isoformas mutadas de Bcr-Abl de las 15 que tienen resistencia al Imatinib, con la excepción de T315I (57, 58).

6.3. El Imatinib y el Dasatinib, inhibidores de múltiples cinasas.

Elisabeth Buchdunger y cols., observaron que el Imatinib además de tener como blanco a Bcr-Abl también inhibe la vía del receptor de PDGF (61) y a la cinasa del receptor c-Kit (70). En estudios de inhibición de actividades enzimáticas se identificaron más blancos del Imatinib. Por otra parte el Dasatinib no sólo inhibe a la misma cinasa que el Imatinib, adicionalmente es capaz de inhibir a un número mayor de cinasas de receptores (Cuadro 4).

El hecho de que se identificaran otros blancos del Imatinib y el Dasatinib provocó que su administración se ampliara hacia patologías donde está alterada una de las cinasas blanco de estos fármacos. Algunos ejemplos de estas patologías son en el glioblastoma (71), cáncer de pulmón (72) y de mama, fibrosis, artritis y asma, los cuales tienen relación con la alteración en el receptor de EGF y PDGF (60).

Cuadro 4. Blancos del Imatinib y el Dasatinib.

Cinasa	Imatinib IC50(μM)	Dasatinib IC50(nM)
Bcr-Abl	0.02	1.0
Src	ND	0.50
c-Kit	0.41	28.0
EGFR	>100	180
PDGFR	0.38	28.0
FGFR	31.2	880
IGFR	>10	>50000
VEGFR	10.7	2000
EphR	ND	25.0

ND: no determinado. Modificado de Chang y cols., 2008; Deininger y cols., 2005 y Lombardo y cols., 2004 (73–75).

Después del tratamiento con el Imatinib y el Dasatinib se observó algunos efectos secundarios que involucran alteraciones en el metabolismo de lípidos y en la homeostasis ósea. En pacientes tratados con el Imatinib se observó que incrementan los niveles de adiponectina en el plasma (76). La alteración en la homeostasis ósea en pacientes adultos se relacionó con el incremento en el número de trabéculas en la médula ósea e incremento del hueso cortical, así mismo esto correlaciona con la variación en plasma de OPG/RANK, las cuales participan en la reabsorción ósea (39, 66, 67) después del tratamiento con el Imatinib o el Dasatinib; por otro lado en pacientes pediátricos se ha observado que después del tratamiento con el Imatinib disminuyó el valor percentil de la talla (medida de crecimiento en individuos pediátricos) e incrementó los niveles de calcio y fosfato en suero y el calcio en orina (79).

Con el fin de explicar los efectos secundarios obtenidos después del tratamiento con el Imatinib y el Dasatinib, diversos grupos de investigadores realizaron estudios *in vitro* en

las *MSC* (cultivándolas en medios de inducción osteogénico y adipogénico) en presencia de los fármacos. Las *MSC* derivadas de los pacientes con LMC no expresan Bcr-Abl (80) no obstante el Imatinib y el Dasatinib (a concentraciones que están en el intervalo de las reportadas en plasma en estos pacientes) afectan la proliferación de las *MSC* (30, 31, 81, 82) y su potencial para diferenciarse hacia el linaje osteogénico y adipogénico. Las células estromales murinas, las *MSC* normales y de pacientes con LMC en presencia de los fármacos incrementaron la expresión de genes osteogénicos (18,30,81,83–85) y adipogénicos, así como las proteínas relacionadas con el respectivo tipo celular (18, 31, 76, 86).

El hecho de que las *MSC* son afectadas por el Imatinib y el Dasatinib, sugiere que estos fármacos inhiben a cinasas de receptores que participan en su funcionalidad.

En cuanto al mecanismo por el cual el Imatinib afecta la diferenciación, O'Sullivan y cols., así como Fitter y cols., observaron una correlación entre la presencia del Imatinib y la inhibición del receptor de PDGF en cultivos de las *MSC* inducidas a la diferenciación osteogénica y adipogénica (65, 73). Sin embargo, al utilizar un antagonista del receptor de PDGF (en ausencia del Imatinib) se observó una inhibición en la proliferación, pero ningún efecto en la diferenciación (87). Ya que la inhibición exclusiva del receptor de PDGF no restablece el efecto del Imatinib, sugiere que el Imatinib inhibe a cinasas de otros receptores (adicionalmente a la del receptor de PDGF) como podría ser el receptor del EGF.

Hasta ahora, no existe evidencia sobre el mecanismo por el cual el Dasatinib afecta la proliferación y la diferenciación adipogénica de las *MSC*. Tampoco se ha explorado el efecto que tiene el Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica en estas células, lo cual sería importante debido a que existen estudios clínicos en pacientes pediátricos en donde se administran estos fármacos, en los cuales se verían más afectados si existe un efecto secundario relacionado con la homeostasis ósea.

Aún no está claro si el Imatinib es capaz de inhibir sólo al receptor de PDGF o si el Dasatinib afecta a las *MSC* por ésta o más vías; así como si existe alguna diferencia entre sus capacidades de inhibición, debido a que tienen diferentes afinidades hacia las cinasas de los receptores. Por lo que el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del

Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica, así como evaluar si éstos son capaces de abatir el efecto del PDGF y el EGF en la proliferación y la diferenciación de las *MSC* normales.

7. OBJETIVO.

7.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto *in vitro* del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación y diferenciación de las células troncales mesenquimales de médula ósea normal y el mecanismo por el cual los fármacos tienen este efecto.

7.2. Objetivos específicos.

- Comparar el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de *MSC* de médula ósea normal.
- Comparar el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de las *MSC* de médula ósea normal.
- Evaluar si el efecto del Imatinib y el Dasatinib en las *MSC* de médula ósea normal es dependiente de la inhibición del receptor de PDGF y EGF.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Obtención de médula ósea de individuos hematológicamente sanos.

Se obtuvieron 4 muestras bajo consentimiento informado, de pacientes candidatos a cirugía ortopédica en el Hospital Regional No. 2 Villa Coapa del Instituto Mexicano del Seguro Social. Estos pacientes tuvieron un diagnóstico hematológico normal por lo que fueron sometidos a cirugía para instalar una prótesis de cadera. De esta zona, el reumatólogo realizó un raspado de la cabeza del fémur con el fin de ajustar la propia prótesis. El raspado del fémur se colocó en medio RPMI estéril suplementado con 3% de suero fetal bovino más heparina como anticoagulante, y posteriormente fue transportado al hospital Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Oncología en condiciones de refrigeración (utilizando geles refrigerantes).

La toma de dichas muestras no representó ningún riesgo para los pacientes ya que fueron obtenidas del tejido que el cirujano elimina como parte del procedimiento de ajuste de la prótesis al hueso. Cabe mencionar que todo este procedimiento se realizó de acuerdo a los lineamientos institucionales aprobados por la comisión de ética del Hospital General Regional No. 2. Villa Coapa del IMSS y con el previo consentimiento informado del paciente y en estricto apego a la declaración de Helsinki, el código de Núremberg y al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.

8.2 Obtención de células adherentes para la caracterización.

La obtención de células estromales/mesenquimales adherentes se llevó a cabo en el Laboratorio de Células Troncales Leucémicas, dirigido por la Dra. Antonieta Chávez González. A continuación se describe el proceso que se utilizó. El tejido se lavó 4 veces con 5 mL de buffer de fosfatos (PBS 1X, pH 7.4, GIBCO). En cada ocasión se agitó por 20 segundos (utilizando un vórtex) y se tomaron los sobrenadantes donde cada uno fue colectado en un tubo cónico estéril. Estos se centrifugaron a 1, 200 rpm durante 8 min y el resultado fue la obtención de tres fases formadas el plasma en la parte superior, las células blancas en medio y las células rojas en el fondo. Se tomó 1mL aproximadamente de células blancas y se transfirió a un tubo cónico para ser re-suspendidas en 2 volúmenes de PBS 1x estéril (Cuadro 5).

En otro tubo cónico estéril, se adicionó el volumen de ficoll-paque (GE Health) de acuerdo al volumen de la muestra (Cuadro 5). Sobre éste se adicionaron las células blancas, teniendo el cuidado de no mezclar las células con el ficoll. Para la separación por gradiente el tubo anterior se centrifugó a 400 g durante 30 min (BELCKMAN COULTER). De lo anterior se consiguió la formación de tres capas la superior se encuentra el PBS, en la parte media las células mononucleares y en la inferior están los granulocitos y eritrocitos. Se recuperó en un tubo cónico estéril la capa media (denominada mononucleares) y posteriormente se lavó con 3mL de PBS 1x estéril y se recuperó el botón celular centrifugando a 1, 200 rpm durante 8 min. Se retiró el sobrenadante y se adicionó un volumen conocido de DMEM bajo en glucosa, suplementado con suero fetal bovino. Posteriormente se contaron las células con solución de turck y con azul de tripano 0.4 % (GIBCO).

Cuadro 5. Relación de volumen de ficoll con volumen de muestra para la separación de componentes celulares por gradiente de densidad.

Volumen de la muestra	PBS 1x	Ficoll-Paque	Tipo de tubo
1 mL	2 mL	5 mL	15 mL
2 mL	4 mL	5 mL	15 mL
5 mL	10 mL	1 mL	50 mL
10 mL	20 mL	15 mL	50 mL

8.3. Expansión de células adherentes para la caracterización.

A partir de las células mononucleares (obtenidas en el punto 8.2) se sembraron 200×10^6 de éstas células en cajas de plástico para cultivo celular de 100mm x 20mm (FALCON) con 10 mL de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Todos los cultivos celulares se llevaron a cabo a 37° C en atmósfera húmeda y con 5 % de CO₂. Después de 24 horas se realizó el cambio de medio y se conservó en cultivo a las células adheridas al plástico. Se realizaron cambios de medio semanalmente, manteniendo las condiciones de cultivo mencionadas.

Transcurrido el tiempo de 1 semana y media aproximadamente, las células llegaron a confluencia de un 80 % de la superficie del plástico y se cosecharon con Tripsina/ EDTA 0.05% (GIBCO). Al cultivo se le adicionaron 5 mL de tripsina/0.05 % de EDTA y se incubó durante 5-8 min a 37° C hasta observar bajo un microscopio invertido que las células se hayan desprendido del plástico. Pasado el tiempo, se adicionaron 500 uL de SFB y se recuperó la suspensión celular y se transfirió a un tubo de 15 mL estéril, etiquetado con el folio correspondiente. Después se adicionaron 5 mL de PBS a la caja de cultivo, con el fin de recuperar las células remanentes y se transfirieron al tubo anterior. La suspensión celular se centrifugó a 1, 200 rpm durante 8 min y después se desechó el sobrenadante. Se adicionó un volumen conocido de DMEM y se contó el número de células con azul de tripano al 0.4 % (GIBCO).

Al cultivo anterior se le domina R0, de resiembra cero. Se continua el mismo procedimiento para la R1 en la cual se sembraron de $80-100 \times 10^3$ de células provenientes

de la R0. Estas se incuban hasta obtener la confluencia de 80 % y posteriormente se cosechan y así consecutivamente hasta obtener una siembra de R2.

De la R0 y R1 se obtienen células para crio preservar en nitrógeno líquido, las cuales están en un vehículo con 10 % de DMSO/ 50 % de SFB/DMEM con antibiótico (Penicilina/Streptomycin 10u/mL).

El procedimiento de crio preservación incluyó obtener un rango de entre 3×10^5 a 1×10^6 células estromales/mesenquimales a congelar. Para ello se preparó el vehículo (100 uL de DMSO, SIGMA; 500 uL de SFB, GIBCO) en un tubo crio vial de 2 mL previamente etiquetado con el folio, densidad celular y fecha del procedimiento. El vial se incubó durante 15 min a 4° C y después se adicionaron las células contenidas en 400uL de medio DMEM. Para almacenar las células, el crio vial se conservó por dos horas en un contenedor de temperatura controlada (NALGEN) y se congeló a -70° C. Al cabo de 2 horas y no más de una semana los viales se depositaron en el tanque de nitrógeno líquido.

8.4. Caracterización de células troncales mesenquimales por inmunofenotipo.

A partir de las células adherentes en R2 se realizó la evaluación de inmunofenotipo con el objetivo de reconocer la presencia de marcadores característicos de las MSC: CD90, CD73, CD105 y ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45 y CD14. Para esto se utilizó un panel que incluye anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o aloficocianina (APC). CD73-PE (BECTON-DICKINSON) co-expresado con CD90-APC (CALTAG), CD105-PE (CALTAG); además de la evaluación de CD14-PE, y CD45-APC (ambos CALTAG) para descartar la presencia de células hematopoyéticas, también se evaluó la expresión de CD140b-PE (BECTON-DICKINSON) y EGFR-APC (R&D).

100, 000 células fueron incubadas en tubos separados con los siguientes anticuerpos Tubo 1. CD73 PE y CD90 APC (1:50uL cada uno), Tubo 2. CD105 FITC (1:50 uL), Tubo 3. CD14 PE (1:50 uL) y CD45 APC (1:50uL), Tubo 4. CD140b PE (1:50uL) y Tubo 5. EGFR APC (5:50 uL) en *buffer* PBS1x/1mM de EDTA/ 2 % de SFB durante 20 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Trascorrido el tiempo se adicionaron 250 uL de 10 % de solución fijadora (BD FACS) a cada tubo y se incubaron a temperatura

ambiente durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se adicionó 1 mL de PBS1x y se centrifugó a 2, 500 rpm durante 5 min para recuperar el botón celular. Por último, se adicionaron 300uL de PBS1x, en el cual se conservaron a 4° C hasta su análisis. En cada paso se agitó con vórtex a durante 3-5 segundos. Para retirar el sobrenadante, se decantó la solución.

Para el análisis de los antígenos se utilizó el citómetro Facs Calibur (BECTON. DICKINSON) considerando 10,000 eventos y posteriormente los datos obtenidos de intensidad de fluorescencia se analizaron en el *Software* FlowJo.

8.5. Diferenciación de las MSC-N.

8.5.1. Diferenciación osteogénica.

Para caracterizar la capacidad de diferenciación de las MSC-N hacía osteoblastos se utilizaron las células provenientes de la R2. Se sembraron 5, 000 células/cm² en placas de 48 pozos (FALCON) en medio DMEM suplementado con SFB y se incubó en condiciones de cultivo celular por 24 horas. Cumplido el tiempo se les realizó cambio con medio de inducción osteogénico y con DMEM suplementado para el control negativo. Se mantuvieron las condiciones de cultivo por 14 días o 21 días realizando cambios de medio por semana. La positividad se reveló mediante la actividad de la fosfatasa alcalina, para la caracterización y el análisis semi-cuantitativo (*Software* Image J) de transcritos de genes de la diferenciación osteogénica: RUNX2 y OCN.

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto de 2.5 µM del Imatinib y 50 nM del Dasatinib sobre el PDGF y el EGF se utilizó DMEM suplementado con sustituto de suero para el control, medio osteogénico suplementado con sustituto de suero para el control positivo y para los tratamientos el medio inductor en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF (ambos PEPROTECH) solos y en conjunto con el Imatinib o el Dasatinib.

Medio osteogénico Base DMEM/ 10 % de SFB o bien 20 % de sustituto de suero/ 0.1 µM de Dexametasona (SIGMA)/ 50 µg/mL de Ac. Ascórbico (SIGMA)/ 50 µg/mL de Ascorbato 2-fosfato (SIGMA) / 10 µM de beta-glicerofosfato (SIGMA).

8.5.1.1. Tinción cito-enzimática de la actividad de la fosfatasa alcalina.

Se retiró el medio de cultivo y posteriormente se añadieron 300uL de metanol frío durante 5 minutos y se incubó a -20° C. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con 1mL de agua desionizada, posteriormente se retiró el sobrenadante y se añadió 44 mg/mL del FAST BCIP/NBGT (SIGMA) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. El sustrato hidrolizado por la enzima fosfatasa alcalina-osteogénica es de color amarillo claro en suspensión, mientras que la positividad se observa en la célula con una coloración morada en el citosol. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 500 uL de agua desionizada. Las células se montaron con solución *Super Mount* (BIOGENEX) para finalmente observar las células bajo al microscopio invertido (OLYMPUS) e identificar aquellas células positivas y negativas a la reacción.

8.5.2. Diferenciación adipogénica.

A partir de las células provenientes de la R2 se sembraron 10, 000 células/cm² en placas de 48 pozos (FALCON) en medio DMEM suplementado con SFB y se incubó en condiciones de cultivo celular por 24 horas. Al día siguiente se realizó cambio de medio con inducción adipogénico y con DMEM suplementado para el control negativo. Se mantuvieron las condiciones de cultivo durante 14 días con cambios de medio por semana y al transcurrir el tiempo la positividad se reveló mediante la tinción citoquímica de rojo oleoso, por el análisis semi-cuantitativo (*Software Image J*) de transcritos de genes de la diferenciación adipogénica: PPAR γ y LPL y por el análisis de imagen de células positivas al rojo oleoso evaluado por intensidad de píxeles (APERIO, *Software ScanScope*).

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto de 2.5 μ M del Imatinib y 50 nM del Dasatinib sobre el PDGF y el EGF se utilizó DMEM suplementado con sustituto de suero para el control, medio adipogénico suplementado con sustituto de suero para el control positivo y medio inductor en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF (ambos PEPROTECH) solos y en conjunto con el Imatinib o el Dasatinib.

Medio adipogénico Base DMEM/ 10 % de SFB o bien 20 % de sustituto de suero/ 1.0 μ M de Dexametasona (SIGMA)/ 10 μ M de Insulina (INVITROGEN)/ 200 mM de Indometacina (SIGMA)/ 0.5 mM de Isobutilmetil-xantanina (SIGMA).

8.5.2.1. Tinción citoquímica de las vacuolas lipídicas con rojo oleoso.

Se retiró el medio de cultivo y después de adicionaron 300 uL de formaldehído al 4 % durante 3 min, después se retiró el sobrenadante y se adicionaron 300 uL de propilen glicol absoluto durante 10 min. Pasado el tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300uL del reactivo de rojo oleoso filtrado y se incubó a 60° C durante 30 min. Transcurrido el tiempo se retiró el exceso de colorante y después se adicionaron 300 uL de propilen glicol 85 % por 3 min. Por último las células se lavaron con agua destilada y se contra-tiñeron con 300 uL del reactivo de hematoxilina de Harris (GOLDEN BELL), durante 10 minutos, posteriormente se retiró el exceso de colorante y se realizó nuevamente un lavado. Finalmente las células se montaron con solución de montar *Super Mount* (BIOGENEX) y la tinción se observó bajo al microscopio invertido (OLYMPUS) para identificar aquellas células positivas y negativas a la reacción. Se consideran células adipogénicas positivas aquellas que presentan la aparición de una coloración rojo brillante en las vacuolas lipídicas que fueron afines por el rojo oleoso.

8.5.3. Diferenciación condrogénica.

Para caracterizar la capacidad de diferenciación de las *MSC-N* hacía condrocitos se utilizaron las células provenientes de la R2. Para ello se obtuvo mediante centrifugación a 1, 800 rpm por 8 min un botón de 80, 000 células, a éste se le adicionaron 5 uL de DMEM suplementado con SFB y se sembró en forma de gota en placas de 48 pozos (FALCON), para después ser cultivadas en condiciones de cultivo celular por 2 horas. Transcurrido este tiempo se adicionaron 500 uL de medio de inducción condrogénico y 10 ng/mL de TGFb-3 y para el control negativo DMEM suplementado con SFB. El cultivo se llevó a cabo durante 14 días realizando cambios de medio por semana de manera muy cuidadosa para evitar el desprendimiento del conglomerado celular que se formó. Transcurrido el tiempo se corroboró la diferenciación condrogénica mediante la tinción de azul alciano, la cual indica la formación de proteoglicanos.

Para evaluar el efecto de 2.5 µM del Imatinib y 50 nM del Dasatinib en la diferenciación de las *MSC-N* hacía condrocitos se utilizaron 250, 000 células provenientes de la R2-R3 suspendidas en medio DMEM suplementado con SFB, las cuales se adicionaron en un tubo cónico de 15 mL. Después se concentró un botón celular mediante centrifugación a

2, 500 rpm por 5 min Después se concentró un botón celular mediante centrifugación a 2, 500 rpm por 5 min. Se retiró el exceso de medio y se adicionaron 500 uL de PBS 1x estéril, después se centrifugó nuevamente a las rpm indicadas y posteriormente se retiró el sobrenadante. Se adicionaron 500 uL de medio de inducción condrogénico y 10 ng/mL de TGFb-3 y para el control negativo las células se sembraron en monocapa en medio DMEM suplementado con SFB. El cultivo se llevó a cabo durante 28 días realizando cambios de medio de una vez a la semana de manera muy cuidadosa para evitar el desprendimiento del conglomerado celular (micromasas) que se formó. La positividad de la diferenciación se reveló mediante el análisis semi-cuantitativo (*Software Image J*) de transcritos de genes de la diferenciación: SOX9 y ACAN y por la tinción de tricrómico de Masson.

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto de 2.5 μ M del Imatinib y 50 nM del Dasatinib sobre el PDGF y el EGF, se utilizó DMEM suplementado con SFB para el control, medio condrogénico suplementado para el control positivo y medio inductor más la presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF (ambos PEPROTECH) solos y en conjunto con el Imatinib o el Dasatinib.

Medio Condrogénico. Base DMEM/ 10 % de SFB/ 100 nM de Dexametasona (SIGMA)/ 50 μ M de Ascorbato 2-fosfato/ 100 μ g/mL de Piruvato de sodio (SIGMA)/ 40 μ g/mL de Prolina (SIGMA)/ 0.5 μ g/mL de Selenito de sodio (SIGMA), 0.55 mg/mL de Transferrina (SIGMA), 470 μ g/mL de Ácido linoléico (SIGMA), 1 mg/mL de Insulina (SIGMA), 50 ng/mL de BSA (SIGMA).

8.5.3.1. Inclusión en parafina de micromasas.

De las células diferenciadas a condrocitos se fijaron durante 2 horas con 4 % de paraformaldehído y posteriormente se deshidrataron con el siguiente tren de concentración de alcoholes: 70 %, 80 %, 90 % y absoluto durante 30 minutos cada uno. Posteriormente éstas se pasaron a xilol y se incubaron por el mismo periodo hasta que se obtuvo una micromasa clara. Después se incluyeron en parafina de las cuales se realizaron cortes de 4 μ m para realizar un microarreglo.

8.5.3.2. Tinción citoquímica de tricrómico de Masson.

A partir de cortes de 4µm la muestra se desparafinó a 60° C toda la noche y posteriormente se realizó la tinción. Se realizó un tren de hidratación (Xilol, alcohol absoluto, alcohol al 96 %, al 70 %, se hidrató en agua de la llave y posteriormente en agua destilada durante 1 min). Se incubó durante 12 horas en solución Bowin (solución de 40 % de ácido pícrico saturada/formalina / 50 % de ácido acético glacial). Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con agua corriente durante 3 min para quitar el exceso de la solución (amarilla). Después se tiñó con hematoxilina férrica de Weigerts (filtrada: 1 % de hematoxilina en alcohol etílico/ 29 % de cloruro férrico/ 2 % de ácido clorhídrico) durante 15 min. Se realizaron lavados con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Posteriormente se tiñó con solución de escarlata de Bebrich-fusina (1 % de escarlata de Bebrich/ 1 % de fucsina ácida/ 1 % de ácido acético glacial) durante 10 min, y se realizaron lavados con agua destilada. Después se tiñó con una solución de Masson (5 % de ácido fosfomolibdico/ 5 % de ácido fosfotungsténico) durante 5-7 min. Se contra-tiñó con solución de anilina (2.5 % de azul de anilina/ 2% de ácido acético glacial). Se realizaron lavados con agua destilada y por último se aclara con 1 % de agua acética y se montó en resina. La positividad de la diferenciación se reveló con la tinción en color azul en las fibras de colágena.

8.5.3.3. Tinción citoquímica de proteoglicanos con azul alciano.

Las células se fijaron con 300 uL de 4 % de formaldehído y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionaron 300 uL del reactivo azul alciano (filtrado) y se incubó durante 30 min. Posterior al tiempo se realizó un lavado con 1 mL de agua destilada. Para montar se adicionaron 2 gotas de la solución *Super Mount* (BIOGENEX). Finalmente la placa fue observada bajo el microscopio para analizar la positividad de la diferenciación condrogénica, para lo cual se consideró al observar el conglomerado celular y la aparición de una coloración azul en el mismo.

8.6. Obtención de una clona de la línea HS5 negativa para el receptor de PDGF y EGF.

De la línea HS5 (parental) se realizó una dilución limitante en placas de 96 pozos (FALCON) con el fin de obtener una célula por pozo. Se adicionaron 500 uL de RPMI suplementado con 10 % de SFB para después ser cultivadas en condiciones de cultivo celular durante 1 semana, posteriormente se realizó cambio de medio. Después de obtener una confluencia de 30-50% de la superficie de la placa de cultivo, las clonas fueron cosechadas y transferidas a placas de 6 pozos (FALCON) hasta obtener una confluencia del 50-80 %. A partir de las células obtenidas del cultivo anterior se evaluó por citometría la expresión de antígenos de *MSC* y así como la expresión de CD140b (el receptor de PDGF) y del receptor de EGF.

8.7. Proliferación de *MSC-N* y de HS5 PDGFR-/EGFR-.

La proliferación se evaluó por conteo celular de las células excluyentes al azul de tripano al 0.4 %. Se sembraron 1,300 células de *MSC-N* en R2 o R3 y de la clona HS5 PDGFR-/EGFR- en placas de cultivo de 24 pozos (FALCON) en medio DMEM o RPMI suplementado con 10 % de SFB durante toda la noche en condiciones de cultivo. Posteriormente el medio fue cambiado por 1 mL de medio suplementado con SFB para el control y medio suplementado en presencia del Imatinib o el Dasatinib a las concentraciones mencionados en los gráficos. El cultivo se mantuvo durante 14 días con cambios de medio cada 7 días respectivamente para cada tratamiento. Se utilizó DMEM para el cultivo de *MSC-N* y RPMI para la línea HS5.

En los experimentos diseñados para evaluar el efecto de 2.5 μ M del Imatinib y 50 nM del Dasatinib sobre el rhPDGF-BB y el rhEGF se utilizó DMEM o RPMI suplementado con 20% de sustituto de suero para el control y medio suplementado en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF solos y en conjunto con el Imatinib o el Dasatinib.

8.8. Ensayo de TUNEL.

La apoptosis se evaluó en las *MSC-N* y en la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del Imatinib y el Dasatinib. Se sembraron 1,300 células/cm² por duplicado en placas de 6

pozos (FALCON) y después fueron cultivadas en medio DMEM o RPMI suplementado con SFB durante toda la noche en condiciones de cultivo. Transcurrido el tiempo se realizó cambio de medio por medio suplementado para el control, medio libre de suero para el control positivo y medio suplementado conteniendo 2.5 μ M del Imatinib o 50 nM del Dasatinib realizando cambios de medio semanalmente. Posteriormente las células fueron cosechadas (al día 9 y 14) y goteadas mediante un cito-espín en laminillas conteniendo 10,000 células en 50 uL. Para la fijación, se utilizó 4 % de formaldehído frío durante 20 min, después se realizó dos lavados con PBS1x para después recuperar el antígeno con una solución de 0.01M de citrato de sodio a 90° C durante 15 min. Después se realizaron 2 lavados con PBS1x y se desactivó la peroxidasa endógena con una solución 9:1 metanol: 30 % de peróxido de hidrógeno durante 10 min. Se continuó con las recomendaciones hechas por el fabricante para la detección *in situ* de la apoptosis por un kit para TUNEL (ROCHE). Se contaron 200 células por tratamiento y se cuantificó el porcentaje de células positivas a TUNEL.

8.9. Actividad del Imatinib y el Dasatinib sobre la línea K562 Bcr-Abl positiva.

Se evaluó la capacidad de los fármacos en inhibir la proliferación de K562. Para ello, se sembraron 10, 000 células por triplicado en placas de cultivo de 6 pozos (FALCON) durante toda la noche en medio RPMI suplementado con 10% de SFB en condiciones de cultivo. Después el medio fue cambiado por RPMI suplementado para el control y RPMI suplementado en presencia de 2.5 μ M del Imatinib o de 50 nM del Dasatinib durante 48 horas. La proliferación celular se evaluó por el número de células excluyentes al azul de tripano 0.4 %.

8.10. Extracción de RNA total mediante tiocianato de guanidina/cloroformo.

A partir de los cultivos de diferenciación se obtuvo el RNA total. Se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 700 uL de trizol (GE HEALTHCARE) para lisar las células. Se recuperó el volumen en un tubo de 1.5 mL estéril. Posteriormente se adicionaron 200 uL de cloroformo (SIGMA-ALDRICH) y se agitó el tubo, después se incubó por 10 min en refrigeración. Posteriormente se centrifugó a 12, 500 rpm durante 15 min a 4° C y al término del tiempo, el resultado fue la obtención de tres fases: arriba la fase inorgánica

donde se encuentra el RNA, y dos fases orgánicas media y final donde se encuentra el DNA y las proteínas. La fase inorgánica se transfirió a un tubo de 1.5 mL, teniendo cuidado de no romper la interfase. Posteriormente se adicionaron 500 uL de alcohol isopropílico frío absoluto (MEYER) y se incubó a -20° C toda la noche. Al día siguiente se precipitó el RNA centrifugando a 12,000 rpm durante 10 min a 4° C. Transcurrido el tiempo se desechó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de alcohol etílico (MEYER) frío al 75% para lavar la pastilla de RNA. Se recuperó la pastilla centrifugando a 7,500 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. El RNA se hidrató con 30 uL de agua tratada con dietilpircarbonato, DEPC. A continuación se realizaron alícuotas y se cuantificó el RNA realizando mediciones por duplicado en un espectrofotómetro UV (Nanodrop, THERMO SCIENTIFIC).

8.11. Síntesis de cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total en 10uL del RT buffer mix/ 1 uL de la enzima MultiScribe™ MuLV, RT enzima mix (LIFE TECHNOLOGIES) completando un volumen de la reacción de 20 uL. El volumen de reacción se completó con agua tratada con DEPC. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de tapa caliente (BIORAD) a 37° C por 60 min, seguido de 95° C durante 5 min para desactivar la enzima.

8.12. RT-PCR semicuantitativa de genes de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

A partir del cDNA sintetizado se tomó 1 uL y se adicionó al siguiente mix: 4 uL (1.5 mM de MgCl₂, 1x PCR buffer, 10 mM cada uno de los dNTPs, 1U de *Taq platinum* (INVITROGEN), 1 uL de cada oligo: 10 pmol/uL del oligo sentido y del antisentido (Cuadro 6) y 5.4 uL de agua tratada con DEPC para completar el volumen de reacción de 12.5 uL. La reacción se llevó acabo en un termociclador de tapa caliente (BIORAD) con el siguiente programa: Después de la activación de la enzima por 94° C durante 4 min cada ciclo consistió en la desnaturalización con 94° C durante 1 min, una hibridación de 50-60° C durante 30 segundos, y una extensión de 72° C durante 1 min durante 25 ciclos, seguido de la elongación de 72° C por 10 min. Posteriormente los productos de PCR

fueron separados por electroforesis en un 1.5 % de gel de agarosa (peso/volumen), (INVITROGEN) en buffer SB1x (Ácido Bórico/Hidróxido de sodio) y fueron visualizados con la tinción de *syber gold* (INVITROGEN) para lo cual se utilizó un transiluminador con cámara digital (ALPHA INNOTECH).

Cuadro 6. Oligos usados para evaluar por RT-PCR la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de MSC-N en medio de inducción.

Nombre		Secuencia 5'- 3'	(pb) producto	Tm empleada	# ciclos
RUNX2	Sentido	AAGAAGGACAGACAGAAGC	428	60	25
	Anti sentido	AGGTGGCAGTGTTCATCATCT			
OSX	Sentido	GGCACAAAGAAGCCGTACTC	269	60	25
	Anti sentido	GCCTTG TACCAGGAGCCATA			
OCN	Sentido	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	294	60	25
	Anti sentido	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC			
PPAR	Sentido	GCTGTTATGGGTGAAACTCTG	351	52.8	25
	Anti sentido	ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC			
LPL	Sentido	GAGATTTCTCTGTATGGCACC	276	50.5	25
	Anti sentido	CTGCAAATGAGACACTTTCTC			
SOX9	Sentido	GTACCCGCACTTG CACAAC	72	57	25
	Anti sentido	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC			
ACAN	Sentido	GCCTTGAGCAGTTTCACCTTC	392	55.8	25
	Anti sentido	CTCTTCTACGGGGACAGCAG			
GAPDH	Sentido	TCCACCACCCTGTTGCTGT	268	50-60	25
	Anti sentido	ACCACAGTCCATGCCATCA			

pb. Pares de bases, Tm. Temperatura de alineación, #. Número de ciclos.

8.12.1. Análisis de imagen.

La PCR obtenida por electroforesis se evaluó por densitometría, en donde la intensidad de pixeles obtenidos por cada condición fue normalizada con respecto GAPDH como control interno. Para ello se utilizó el *Software Image J*.

8.13. Análisis estadístico.

Los resultados son expresados como la media y el error estándar de la media (SEM) de experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado por análisis de varianza (ANOVA). Bonferroni, Dunet y Tukey se utilizaron para la comparación de las medias de los grupos. La diferencia estadística significativa se estableció con valores de p de 0.05, 0.01 o 0.001, como lo indica cada figura. *Software GraphPad Prism 5*.

9. RESULTADOS.

9.1. Caracterizaciones de las MSC-N y de la línea HS5 derivadas de médula ósea.

Con el fin de realizar los estudios a partir de células caracterizadas se consideraron los criterios de selección de *MSC* de acuerdo a la ISCT (ver punto 5.2). Se estudiaron 4 muestras derivadas de médula ósea normal (*MSC-N*) y una línea celular de fibroblastos de médula ósea denominada HS5 la cual es heterogénea al receptor de PDGF y EGF. De ésta se identificó una clona que no expresa el receptor de PDGF y EGF.

En la Figura 6 se muestra la caracterización de las *MSC-N* por inmunofenotipo y capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Los plots de citometría (Figura 6A) muestran la expresión de antígenos como el CD90 coexpresado con el CD73 y el CD45 co-evaluado con el CD14; el CD105, la expresión del receptor de PDGF y del EGF se muestran en histogramas, donde el color rojo indica el isotipo y el color azul los eventos teñidos con el anticuerpo. Se encontró que el CD90, el CD73, el CD105 y el receptor de PDGF está expresado en mayor del 90% (90.7 ± 12.96) y el 24% (24.0 ± 4.41) del receptor de EGF en las *MSC-N*, no se detectó la expresión de marcadores hematopoyéticos como el CD14 y el CD45 (Figura 6B).

La Figura 6C muestra un experimento representativo de las células *MS-N* inducidas *in vitro* al linaje adipogénico, al condrogénico y al osteogénico. En el respectivo linaje, las células fueron positivas al rojo oleoso con acumulación de vacuolas lipídicas, también mostraron capacidad de formar un agregado celular y la presencia de fibras de colágena de color azul a la tinción de tri-crómico de Masson; además expresaron la coloración morada en el citoplasma como resultado de la actividad de la fosfatasa alcalina en presencia del sustrato de p-nitrofenol fosfato.

De acuerdo con los resultados elegimos muestras de *MSC-N* que cumplieron los criterios de selección de inmunofenotipo; positivo para la expresión de CD90, CD73, CD105, para el receptor de PDGF y de EGF, negativa para CD45 y CD14; además por su potencial de diferenciación similar hacia osteoblastos, adipocito y condrocitos.

La caracterización de la clona de la línea HS5 (Figura 7) fue realizada bajo los mismos criterios de selección de *MSC*, en acuerdo a la ISCT (Ver punto 5.5.).

La clona de HS5 expresó los antígenos de superficie CD90, CD73, (co-expresión del 67%) y un porcentaje similar de CD105 (90%) con respecto a las *MSC-N*, y es negativa para la expresión de linajes hematopoyéticos CD45 y CD14, así como del receptor de PDGF y del EGF (Figura 7A). En cuanto a su capacidad de diferenciación la HS5 PDGFR-/EGFR- posee una capacidad limitada para diferenciarse hacia el linaje adipogénico, al condrogénico y al osteogénico (Figura 7B).

Identificamos a una clona de HS5 negativa a la expresión del receptor de PDGF y EGF (HS5 PDGFR-/EGFR-) la cual se utilizó para evaluar el efecto del Imatinib y el Dasatinib sobre vías adicionales a éstas. Debido a que su potencial de diferenciación es limitado, sólo se utilizó para fin de evaluar la proliferación.

9.2. Elección de las concentraciones del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de las *MSC-N*.

Con el fin de elegir las concentraciones de inhibición del Imatinib y el Dasatinib en las *MSC-N*, se evaluó su efecto en la proliferación mediante una cinética de crecimiento durante 14 días de cultivo. El número de células fue evaluado a los 3, 6, 9 y 14 de cultivo en 2 muestras por duplicado Figura 8.

Se realizó una curva de dosis respuesta del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de las *MSC-N*, a partir de las dosis reportadas en plasma de pacientes tratados con los fármacos (83, 84). También se incluyó una condición con DMSO para descartar un posible efecto tóxico del diluyente, y una condición sin el fármaco y sin DMSO (control). Como se observa en la Figura 8A, las *MSC-N* en condición control tuvieron una cinética ascendente hasta el día 9 de cultivo, la cual se mantuvo hasta el día 14. A los 14 días de cultivo, el número de células se incrementó 26.6 veces, con respecto al día 1. El efecto tóxico del diluyente se descartó, debido a que la cinética de proliferación en presencia de DMSO no tuvo diferencia significativa con respecto al control. Se observó una inhibición en la proliferación desde la concentración de 2 μM hasta 3 μM se encontró que al día 14 estas inhibieron la proliferación 4.4 veces con respecto al control ($p < 0.05$). No encontramos diferencias entre las concentraciones entre 2 a 3 μM de Imatinib.

Debido a que no hubo diferencias significativa entre las concentraciones de 2 a 3 μM de Imatinib sobre la proliferación de las *MSC-N*, elegimos utilizar la concentración de 2.5 μM del Imatinib debido a que es la IC_{50} usada en estudios de inhibición de K562 y células provenientes de pacientes tratados con el fármaco (70, 84, 85).

En la Figura 8B podemos observar el efecto de Dasatinib sobre la proliferación de las *MSC-N*, en ésta se muestra nuevamente la cinética control como referencia. Desde la concentración menor de Dasatinib (30 nM) se observó una inhibición en la proliferación, sin embargo hasta la concentración de 50 nM se encontró una inhibición significativa ($p < 0.05$) de la proliferación de las *MSC-N*, inhibiendo a los 14 días 4.4 veces con respecto al control.

De acuerdo con los resultados, elegimos utilizar la concentración de 50 nM de Dasatinib debido a que inhibe significativamente la proliferación de las *MSC-N*. Adicionalmente, a las concentraciones elegidas del Imatinib y el Dasatinib inhiben 6.5 veces la proliferación con respecto al control al día 14. (Figura 8A y 8B, 2.5 μM del Imatinib y 50 nM del Dasatinib). Lo anterior es importante ya que se desea comparar el efecto de ambos fármacos en la diferenciación de éstas células.

9.2.1. Evaluación de la apoptosis en las *MSC-N* y en la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del Imatinib y el Dasatinib.

Con el fin de descartar que el Imatinib y el Dasatinib induzcan apoptosis en las *MSC-N*, y que el efecto observado en la disminución de la proliferación sea debido a este proceso, se evaluó su efecto mediante el ensayo de TUNEL en una cinética de crecimiento durante 14 días de cultivo.

En las microfotografías (Figura 9A) se muestra los controles del ensayo de TUNEL: sin inducción (control) o con inducción a la apoptosis, en medio libre de suero (positivas). Se cuantificó el porcentaje de células positivas a la apoptosis a los días 9 y 14 de la proliferación de las *MSC-N* y de la línea HS5 en experimentos independientes por duplicado, evaluando 200 células por condición (Figura 9B). El control alcanzó un 18 % de células positivas a la apoptosis. En la condición con inducción se encontró un 80% de

células positivas a la apoptosis. Por otro lado, en presencia del Imatinib y el Dasatinib el número de células positivas a la apoptosis, no tienen diferencia significativa con respecto al tratamiento control ($p < 0.05$). Sólo el Imatinib incrementó en un punto el número de células positivas a la apoptosis en la HS5, sin embargo consideramos despreciable este punto, ya que por sí mismas en cultivo se desprenden cuando están sin los fármacos.

Con base en los resultados anteriores se demuestra que 2.5 μ M del Imatinib y 50 nM del Dasatinib no inducen la apoptosis en las MSC-N o en la HS5.

9.2.2. Potencial biológico del Imatinib y el Dasatinib sobre la línea K562.

Para evaluar si las concentraciones de 2.5 μ M del Imatinib y 50 nM del Dasatinib elegidas en la inhibición de la proliferación de las MSC-N, tienen el potencial biológico de inhibir la proliferación de la línea K562 (célula hematopoyética transfectada con Bcr-Abl) ésta se evaluó en presencia de los fármacos a las 48 horas de cultivo. Se cuantificó el porcentaje de inhibición de las células obtenidas de un experimento por triplicado, en presencia del Imatinib y el Dasatinib con respecto al control (sin los fármacos).

Como se muestra en la Figura 9C, el Imatinib inhibe el 65% ($p < 0.0001$) de la proliferación de la K562, mientras que Dasatinib la inhibe un 85.5% ($p < 0.0001$).

Con base a los resultados queda demostrado que el Imatinib y el Dasatinib inhiben la proliferación de MSC-N, no inducen apoptosis y tienen potencial biológico de inhibir la proliferación de K562.

9.3. El rhPDGF-BB incrementa la proliferación de las MSC-N y el Imatinib y el Dasatinib inhiben su efecto.

Con el fin de evaluar si el Imatinib y el Dasatinib inhiben la vía del receptor de PDGF en la proliferación de las MSC-N, su efecto se evaluó mediante una cinética de crecimiento durante 14 días. Se cuantificó el número de células a los 3, 6, 9 y 14 días de cultivo en 4 muestras por duplicado (Figura 10).

Para evaluar el efecto que tiene rhPDGF-BB en incrementar la proliferación de las *MSC-N*, se adicionaron 10 ng/mL al cultivo. Para evaluar si el Imatinib o el Dasatinib inhiben el efecto de rhPDGF-BB se adicionaron en conjunto con rhPDGF-BB, y como control las *MSC-N* sin fármaco y sin rhPDGF-BB. Adicionalmente estas condiciones se evaluaron en la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en 2 experimentos, por duplicado.

En la Figura 10A, se observa el efecto del Imatinib en la proliferación de las *MSC-N* en presencia de rhPDGF-BB. El rhPDGF-BB incrementó 3 veces la proliferación de las *MSC-N* al día 9, en comparación con el control, en donde se observa el máximo punto en la proliferación. En la condición rhPDGF-BB en conjunto con el Imatinib, se observó una inhibición total en la proliferación. El Imatinib inhibió 10.3 veces en comparación con la condición rhPDGF al día 9 ($p < 0.001$), y al mismo nivel cuando el Imatinib está sólo.

En la Figura 10B se puede observar el efecto del Imatinib sobre la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia de rhPDGF-BB. En ésta se muestra una cinética ascendente hasta los 14 días de cultivo, en el control el número de células se incrementó 26.6 veces con respecto al día de inicio del cultivo. La presencia del rhPDGF-BB y del Imatinib solos y en combinación no tuvieron efecto sobre la proliferación de la HS5 PDGFR-/EGFR- con respecto a la condición sin tratamiento.

De acuerdo con los resultados encontrados se sugiere que el Imatinib inhibe la proliferación de las *MSC-N* al inhibir el efecto del rhPDGF-BB.

En la Figura 10C, se muestra el efecto del Dasatinib sobre las *MSC-N* y en la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del rhPDGF-BB. Nuevamente la cinética del rhPDGF-BB como referencia. En la condición rhPDGF-BB en conjunto con el Dasatinib se observó una inhibición parcial en la proliferación, en comparación con el Dasatinib sólo. El Dasatinib inhibió 4.64 veces en comparación con el rhPDGF al día 9 ($p < 0.001$).

En la Figura 10D, se observa el efecto del Dasatinib sobre la HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del rhPDGF-BB. La cinética del control es ascendente hasta los 14 días de cultivo con un incremento del número de células de 7.6 veces con respecto al día de inicio del cultivo. Nuevamente en la condición con el rhPDGF-BB no hubo efecto sobre la proliferación con respecto el control sin tratamiento. Sin embargo, el Dasatinib y el

Dasatinib en conjunto con el rhPDGF-BB inhibieron 2 veces la proliferación de la HS5 PDGFR-/EGFR- con respecto al control ($p < 0.05$).

De acuerdo a los resultados encontrados se sugiere que el Dasatinib inhibe la proliferación de las MSC-N al inhibir parcialmente el efecto del rhPDGF-BB. Es indudable que el Dasatinib inhibe a vías adicionales a la del PDGF para abatir la proliferación. En HS5 PDGFR-/EGFR- Dasatinib inhibió su proliferación.

Por lo que estudiamos si el Dasatinib, y también Imatinib pueden inhibir a vías adicionales como al receptor de EGF, la cual participa en la proliferación de las MSC.

9.4. El rhEGF incrementa la proliferación de las MSC-N y el Imatinib y el Dasatinib inhiben su efecto.

Para evaluar la vía adicional por la cual Dasatinib inhibe la proliferación en las MSC-N, y saber si Imatinib inhibe a otras vías en las MSC. Se realizaron cultivos en medio suplementado con sustituto de suero. Con el fin de evitar la presencia de componentes que pudieran alterar los resultados, y que están presentes en el SFB. Para ello se evaluó en presencia de rhEGF sólo y en conjunto con el Imatinib y el Dasatinib tanto en la proliferación de MSC-N así como en la línea HS5 PDGFR-/EGFR-. Y para corroborar los resultados sobre el efecto de ambos fármacos sobre el rhPDGF-BB, se evaluó la proliferación en estas mismas condiciones de cultivo. Para ello se evaluó el número de células obtenidas al día 14, en tres muestras por duplicado (Figura 11).

La Figura 11A muestra el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de las MSC-N en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF. En la condición control hubo un incremento de 7.69 veces (con respecto al día de inicio del cultivo), mientras que la presencia del rhPDGF-BB incrementó 3.68 veces la proliferación con respecto al control ($p < 0.001$). El Imatinib en presencia del rhPDGF-BB abatió el efecto en comparación con el rhPDGF-BB sólo ($p < 0.001$). Por otro lado, se encontró una inhibición parcial del efecto de rhPDGF-BB en presencia del Dasatinib. El Dasatinib inhibió 1.8 veces la proliferación con respecto a el rhPDGF-BB sólo ($p < 0.05$).

La presencia del rhEGF incrementa 2.9 veces la proliferación de las *MSC-N* con respecto al control ($p < 0.05$). El Imatinib y el Dasatinib en presencia del rhEGF abaten el efecto que tiene el rhEGF en incrementar la proliferación de las *MSC-N*.

De acuerdo a los resultados observados, ambos fármacos inhiben el efecto del rhPDGF-BB y de rhEGF; sin embargo, existe una diferencia en el número de veces en la inhibición. Mientras que el Imatinib abate el efecto del rhPDGF-BB, el Dasatinib tiene un efecto parcial.

Debido a que la HS5 no soporta el cultivo hasta los 14 días, bajo estas las condiciones de medio libre de suero, los siguientes experimentos se realizaran hasta el día 6 de la proliferación para asegurar el mantenimiento de estas células.

En la Figura 11B se observa el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de la línea HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del rhPDGF-BB y el rhEGF al día 6 de cultivo. La condición control tuvo un incremento en la proliferación de 6.15 veces con respecto al día del inicio del cultivo. El rhPDGF-BB o el rhEGF solos y en conjunto con el Imatinib no tuvieron efecto sobre la proliferación, mientras que la presencia del Dasatinib inhibe la proliferación 2 veces con respecto al control ($p > 0.05$).

Por lo anterior se sugiere que el Dasatinib inhibe una vía adicional, ya que inhibió a la HS5 PDGFR-/EGFR-.

9.5. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica de las *MSC-N*.

Con el objetivo de evaluar el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica, se utilizaron las mismas concentraciones evaluadas en la proliferación. Su efecto se evaluó por la medición semi-cuantitativa de RUNX2 y OCN, marcadores de diferenciación osteogénica temprana y tardía, respectivamente en las *MSC-N* inducidas a la diferenciación osteogénica (suplementado con SFB) al día 14 y 21 de cuatro muestras en experimentos independientes (Figura 12).

En la fotografía del gel de agarosa, se observa la amplificación de un experimento representativo (Figura 12A). Se evaluó la expresión de RUNX2, OCN y GAPDH en las

diferentes condiciones de cultivo. En medio de inducción osteogénica (+), en medio de inducción osteogénica más la presencia del Imatinib o el Dasatinib. El control positivo expresó RUNX2 y OCN a los 14 y 21 días. La expresión de GAPDH no se modificó con el tratamiento, y su expresión es homogénea entre las diferentes condiciones.

Se evaluó de forma semi-cuantitativa la amplificación de los genes de cada condición mediante análisis de imagen (*Software Image J*) y se reportó la expresión relativa con respecto al gen de GAPDH (Figura 12B). En el control positivo se mantuvo la expresión de RUNX2 y OCN en ambos días. El Imatinib incrementó 4.18 veces la expresión de RUNX2 y OCN desde el día 14 y se mantuvo hasta el día 21 ($p < 0.05$) y DA incrementó la expresión de RUNX2 y OCN 1.83 veces hasta el día 21 ($p < 0.05$).

Con lo anterior se comprueba que el Imatinib y el Dasatinib incrementan la diferenciación de *MSC-N* hacia osteoblastos; además de que el Imatinib incrementa la expresión de OCN desde el día 14 y el Dasatinib hasta el día 21.

9.6. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica de las *MSC-N* en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.

Para evaluar el efecto que tiene el Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF, se evaluaron genes de la diferenciación a partir del cultivo de las *MSC-N* inducidas a la diferenciación osteogénica (suplementado con sustituto de suero) a los 21 días de cultivo en cuatro muestras en experimentos independientes (Figura 13).

En el gel de agarosa (Figura 13A) se observa la amplificación de RUNX2, OCN y GAPDH de un experimento representativo en las diferentes condiciones de cultivo. En inducción osteogénica (+), en inducción osteogénica más la presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en conjunto con el Imatinib o el Dasatinib. El control positivo expresó RUNX2 y OCN a los 21 días. La expresión de GAPDH no se modificó con el tratamiento, y su expresión es homogénea entre las diferentes condiciones.

Posteriormente se evaluó de forma semi-cuantitativa la amplificación de los genes de cada condición mediante análisis de imagen (*Software Image J*) y se reportó la expresión relativa con respecto al gen de GAPDH (Figura 13B). En el control positivo se mantuvo la expresión de RUNX2 de 0.29 en relación con GAPDH en todos los tratamientos y la expresión de OCN alcanzó una expresión relativa de 0.4 con respecto a GAPDH. El tratamiento de rhPDGF-BB abatió la expresión de OCN 5 veces ($p < 0.05$) con respecto al control positivo. El Imatinib y el Dasatinib contrarrestaron este efecto. El rhEGF no tuvo efecto en la expresión de OCN.

Observamos que en medio libre de suero, el rhEGF no tuvo ningún efecto en la diferenciación osteogénica. El rhPDGF-BB inhibió la expresión de OCN y el Imatinib y el Dasatinib fueron capaces de anular este efecto (se reestableció la expresión de OCN al valor del control positivo). Sin embargo el Imatinib y el Dasatinib no incrementaron la diferenciación osteogénica, efecto que había sido observado en medio con suero.

9.7. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de MSC-N.

Con el objetivo de evaluar el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica, se utilizaron las mismas concentraciones evaluadas en la proliferación. Para ello se cuantificaron células positivas al rojo oleoso por análisis de imagen (APERIO, *Software ScanScope*) y por la evaluación semi-cuantitativa de genes de diferenciación, ambos obtenidos del cultivo de las MSC-N inducidas a la diferenciación adipogénica (suplementado con SFB) a los 14 días en cuatro muestras en experimentos independientes (Figura 14).

En la Figura 14A, las células en el medio control tienen una morfología fibroblastoide que después de ser inducidas durante 14 días en presencia de medio inductor adipogénico adoptan una forma redonda o poliédrica en presencia de múltiples vacuolas lipídicas. Al término del cultivo, las células fueron teñidas con rojo oleoso, escaneadas a 40x y posteriormente se realizó el análisis de imagen. Se consideró la intensidad de la tinción, en píxeles (Figura 14B) considerando el color azul: células negativas a la tinción; células positivas a la tinción en color amarillo: intensidad débil; color anaranjado: intensidad

media; y color rojo: intensidad fuerte. Para ello se consideraron 5 campos con áreas establecidas en cada condición de cultivo (Figura 14C), lo que se muestra en la figura es uno de los 5 campos.

La Figura 14D muestra el porcentaje de células positivas al rojo oleoso para cada tratamiento: con medio de inducción, con medio de inducción y en presencia del Imatinib y el Dasatinib. La condición sin medio de inducción adipogénico tuvo el 15 % de células positivas. En el control positivo las células con medio de inducción tuvo 2.6 veces más con respecto a la condición sin inducción. Se observó que el Imatinib y el Dasatinib expresaron 1.3 veces más con respecto al control positivo.

Por lo tanto el Imatinib y el Dasatinib no tuvieron efecto significativo en cuanto al porcentaje de células positivas a la tinción con rojo oleoso.

En cuanto al efecto del Imatinib y el Dasatinib sobre los genes de la diferenciación adipogénica, se evaluó la expresión relativa de PPAR y LPL a partir del cultivo de las MSC-N inducidas a la diferenciación adipogénica (suplementado con SFB) a los 14 días de cultivo en cuatro muestras en experimentos independientes.

En la fotografía del gel de agarosa se observa la amplificación de un experimento representativo, en cuál se evaluó la expresión de PPAR, LPL y GAPDH en las diferentes condiciones de cultivo. En inducción adipogénica (+), en inducción adipogénica más la presencia del Imatinib o el Dasatinib (Figura 15A). En el control positivo se expresó el PPAR y LPL a los 14 días. La expresión de GAPDH no se modificó con el tratamiento, y su expresión es homogénea entre las diferentes condiciones.

Posteriormente se evaluó de forma semi-cuantitativa la amplificación de los genes de cada condición mediante análisis de imagen (*Software Image J*) y se reportó la expresión relativa con respecto al gen de GAPDH (Figura 15B). En el control positivo se encontró la expresión de PPAR y LPL de 0.6 veces con respecto a GAPDH. El Imatinib incrementó significativamente la expresión de LPL 2.3 veces con respecto al control positivo ($p < 0.05$), mientras que el Dasatinib incrementó la expresión de PPAR y LPL 2 veces más que el Imatinib. Este incremento no fue significativo.

Con lo anterior se comprueba que el Imatinib y el Dasatinib incrementan la expresión de genes de la diferenciación de *MSC-N* hacia adipocitos; además de que Dasatinib tiene un efecto mayor sobre las *MSC-N* en incrementar la diferenciación adipogénica. A pesar de que no encontramos un incremento en el porcentaje de células positivas al rojo oleoso, consideramos que el Imatinib y el Dasatinib incrementan la diferenciación adipogénica de *MSC-N*.

9.8. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las *MSC-N* en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.

Con el fin de evaluar si las vías de PDGF o EGF tienen un efecto en la diferenciación adipogénica, las *MSC-N* se cultivaron en medio de inducción adipogénico en presencia del rhPDGF-BB y el rhEGF en medio libre de suero. Adicionalmente, fueron añadidos el Imatinib y el Dasatinib a los cultivos, para conocer si la inhibición de estas vías son las responsables del incremento en la adipogénesis que se observa al tratar a las *MSC-N* con estos fármacos.

La diferenciación se evaluó a los 14 días de cultivo en cuatro muestras en experimentos independientes, por un lado se cuantificó el porcentaje de células positivas al rojo oleoso con base en la intensidad de píxeles, el cual identifica la presencia de vacuolas lipídicas y por otro lado se cuantificó la expresión de genes de la diferenciación.

En las microfotografías de la Figura 16A se observan los cultivos de las *MSC-N* inducidas a la diferenciación adipogénica teñidas con rojo oleoso y escaneadas a 4x (APERIO, *Software* ScanScope). Las células en medio de inducción si tratamiento muestra un número reducido de células positivas a rojo oleoso. El rhPDGF-BB incrementó la proliferación de células con morfología fibroblastoide y la presencia de vacuolas lipídicas. El Imatinib y el Dasatinib en presencia de rhPDGF-BB inhibieron este efecto. El Dasatinib con un efecto parcial.

En la Figura 16B podemos observar un cultivo de *MSC-N* en medio control (16B izquierda) y células positivas a la diferenciación (16B derecha), en donde se aprecia el cambio en la morfología de las células al ser inducidas a la diferenciación, éstas pierden

la morfología fibroblastoide y adoptan una forma redonda o poliédrica con la presencia de vacuolas lipídicas. A pesar de que en los cultivos en sustituto de suero el porcentaje de diferenciación fue menor, estas fotografías nos demuestran que si alcanzaron a tener una diferenciación comparable con el medio con suero (Figura 14A).

En la Figura 16C se observa el porcentaje de células positivas al rojo oleoso en las diferentes condiciones de cultivo. En el control positivo se encontró un 3 % de células positivas al rojo oleoso. El rhPDGF-BB incrementó el porcentaje a 10 veces con respecto al control positivo ($p < 0.05$). El Imatinib en presencia de rhPDGF-BB incrementó el porcentaje a 3.6 veces con respecto al control positivo ($p < 0.05$). En el tratamiento con el Dasatinib en presencia del rhPDGF-BB, se observó 7.66 veces más células positivas al rojo oleoso que el control positivo.

Para conocer si la inhibición de la vía del EGF se encuentra involucrada en la diferenciación adipogénica, se evaluó las mismas condiciones de cultivo, en presencia del rhEGF sólo y en combinación con el Imatinib o el Dasatinib. En las microfotografías de la Figura 17A se muestran los cultivos de las MSC-N inducidas a la diferenciación adipogénica, células en medio inductor más rhEGF sólo, y en conjunto con el Imatinib o el Dasatinib.

En la Figura 17B se observa el porcentaje de células positivas a la tinción de rojo oleoso para cada una de las condiciones. Las MSC-N inducidas a la diferenciación, nuevamente como control positivo. El rhEGF incrementó la proliferación de las células fibroblastoides y además esto correlaciona con un incremento de vacuolas positivas al rojo oleoso. Por otro lado en la condición del Imatinib o el Dasatinib en presencia de rhEGF, no se observó que éstos hayan abatido la proliferación o la presencia de vacuolas lipídicas.

A pesar de que el rhPDGF-BB y rhEGF incrementaron el porcentaje de células positivas al rojo oleoso consideramos que es debido a un efecto indirecto al incrementar su proliferación y no a un incremento en su diferenciación adipogénica. La morfología de las células permaneció fibroblastoide a lo largo del cultivo y el tamaño de las vacuolas lipídicas fue menor que en el control positivo. Por lo que posteriormente fue evaluado el cambio en la expresión de genes marcadores de adipogénesis, para descartar dicha posibilidad.

Para lo anterior se evaluó la expresión relativa de PPAR y LPL con respecto a GAPDH como gen constitutivo. En la Figura 18A se observa un gel de agarosa de un experimento representativo en donde se evaluó la amplificación de PPAR, LPL y GAPDH. El control positivo fue las MSC-N en medio de inducción, en él se observa la expresión de PPAR y LPL. La expresión de GAPDH no se modificó con el tratamiento, y su expresión es homogénea entre las diferentes condiciones.

La amplificación de PPAR y LPL fue evaluada de manera semi-cuantitativa mediante densitometría (*Software Image J*) y se reportó la expresión relativa con respecto al gen de GAPDH (Figura 18B). Como se observa en el gráfico, el rhPDGF-BB y el rhEGF no tuvieron un efecto en la expresión de PPAR y LPL. El Imatinib y el Dasatinib no fueron capaces de incrementar los genes adipogénicos en medio libre de suero, en presencia del rhPDGF y el rhEGF.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el Imatinib y el Dasatinib en presencia del rhPDGF-BB o del rhEGF, en condiciones libres de suero no se pudo observar el efecto que tienen en incrementar la adipogénesis. Tampoco se puede descartar que ambos fármacos utilicen estas vías en la diferenciación adipogénica.

9.9. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica de las MSC-N.

Con el objetivo de evaluar el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica, se utilizaron las mismas concentraciones evaluadas en la proliferación. Su efecto se evaluó por la medición semi-cuantitativa de SOX9 y ACAN a partir de los cultivos de las MSC-N inducidas a la diferenciación condrogénica (suplementado con SFB) a los 28 días de cuatro muestras en experimentos independientes.

En la fotografía del gel de agarosa se observa la amplificación de SOX9, ACAN y GAPDH de un experimento representativo, en las diferentes condiciones de cultivo: MSC-N en medio de inducción condrogénica (+), en medio de inducción condrogénica más la presencia del Imatinib o el Dasatinib (Figura 19A). El control positivo se expresó SOX9 y

ACAN a los 28 días. La expresión de GAPDH no se modificó con el tratamiento, y su expresión es homogénea entre las diferentes condiciones.

Posteriormente se evaluó la amplificación de los genes mediante análisis de imagen (*Software Image J*) y se reportó la expresión relativa con respecto al gen de GAPDH (Figura 19B). En el control positivo se observó la expresión de SOX9 y ACAN con una media de 0.4 veces con respecto a GAPDH. El Imatinib incrementó significativamente 2 veces la expresión de SOX9 y ACAN con respecto al control positivo ($p < 0.05$), mientras que el Dasatinib incrementó significativamente la expresión de SOX9 y ACAN 2.3 veces con respecto al control positivo ($p < 0.05$).

Con lo anterior se comprueba que el Imatinib y el Dasatinib incrementaron la diferenciación de las *MSC-N* de médula ósea hacia condroblastos; además de que el Dasatinib tiene un efecto mayor sobre la expresión de ACAN.

9.10. Efecto de Imatinib y Dasatinib en la diferenciación condrogénica de las *MSC-N*, en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF.

Con el fin de evaluar si el Imatinib y el Dasatinib incrementan los genes de las *MSC-N* en la diferenciación a través de la inhibición de la vía del receptor de PDGF o EGF, se evaluó su efecto mediante el análisis semi-cuantitativo de genes obtenidos a partir del cultivo de las *MSC-N* inducidas a la diferenciación condrogénica, suplementado con SFB, a los 28 días de cultivo de cuatro muestras en experimentos independientes.

En la fotografía del gel de agarosa (Figura 20A) se observa la amplificación de un experimento representativo. Se evaluó la expresión del SOX9, ACAN y GAPDH en las diferentes condiciones de cultivo, las *MSC-N* en medio de inducción condrogénica (+), en medio de inducción condrogénica más la presencia del rhPDGF-BB, el rhEGF en combinación con el Imatinib o el Dasatinib. El control positivo se expresó el SOX9 y ACAN a los 28 días. La expresión de GAPDH no se modificó con el tratamiento, y su expresión es homogénea entre las diferentes condiciones.

Posteriormente cada amplificación se evaluó de manera semi-cuantitativa de cada condición (*Software Image J*) y se reportó la expresión relativa de SOX9 y ACAN con

respecto al gen de GAPDH (Figura 20B). En el control positivo la expresión de SOX9 fue de 0.25 veces con relación a GAPDH. El rhPDGF-BB incrementó 2 veces la expresión de SOX9 ($p < 0.05$), lo mismo ocurre cuando está en presencia con el Imatinib o el Dasatinib ($p < 0.05$), ambos con respecto al control positivo. La presencia del rhEGF incrementó 1.6 veces la expresión de SOX9, mientras que en presencia del Imatinib lo incrementó 2.4 veces ($p < 0.05$) y con el Dasatinib 2.16 veces ($p < 0.05$), ambos con respecto al control positivo. El ACAN tiene una expresión en el control positivo de 0.1 veces con respecto a GAPDH. El rhPDGF-BB y el rhEGF no tuvieron efecto sobre la expresión del ACAN; sin embargo en presencia del Imatinib y el Dasatinib se incrementó la expresión, 5 veces con respecto al control positivo.

De acuerdo con los resultados, el Imatinib y el Dasatinib no modificaron el efecto del rhPDGF-BB o del rhEGF. Debido a lo anterior el rhPDGF-BB y el rhEGF no participan en el incremento de la diferenciación condrogénica en presencia del Imatinib y el Dasatinib.

10. DISCUSIÓN.

De acuerdo con los resultados obtenidos encontramos que el Imatinib y el Dasatinib inhiben la proliferación de las MSC-N e incrementan su diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica. Este es el primer estudio en reportar que estos fármacos tienen un efecto sobre la diferenciación condrogénica. El rhPDGF-BB y el rhEGF incrementan la proliferación de las MSC-N y tanto el Imatinib como el Dasatinib son capaces de abatir dicho efecto. El Imatinib inhibe la proliferación de las MSC-N a través de la inhibición del efecto del rhPDGF-BB y el rhEGF únicamente, mientras que el Dasatinib es capaz de inhibir a las MSC-N por éstas y otra vía independiente, debido a que inhibió a la línea HS5 PDGFR-/EGFR-. El rhEGF no tuvo un efecto directo en la diferenciación osteogénica. Al comparar el efecto de los fármacos en la diferenciación de las MSC-N encontramos que el Imatinib es un mejor inductor de la osteogénesis y el Dasatinib de la adipogénesis.

Nosotros elegimos concentraciones del Imatinib y el Dasatinib que inhiben la proliferación de las MSC-N, mismas que se utilizaron para los estudios que incluyen a la

proliferación y la diferenciación. Las concentraciones elegidas no inducen apoptosis en las MSC-N e inhiben la proliferación de la K562, una línea celular que expresa Bcr-Abl y c-kit (91), por lo que aun cuando en este estudio no se pudo distinguir a que cinasa pudo inhibir el Imatinib o el Dasatinib, queda comprobado el efecto biológico de ambos fármacos. Adicionalmente las concentraciones están en el intervalo a las reportadas en plasma de pacientes con LMC (51, 83). A pesar de que la elección de estas concentraciones no permite distinguir entre un efecto directo en la diferenciación, o secundario a la inhibición de la proliferación. Nosotros consideramos que *in vivo*, ambos procesos pueden estar siendo afectados.

Por lo anterior, los resultados aquí obtenidos sobre las MSC-N podrían explicar algunos efectos secundarios observados en la alteración en la homeostasis de lípidos y hueso, así como en el desarrollo de pacientes pediátricos que son tratados con los fármacos (39, 66, 67, 86, 87).

Los resultados presentados en este estudio demuestran que en condiciones libre de suero, el Imatinib abate el efecto del rhPDGF-BB en la proliferación, mientras que el Dasatinib lo inhibe parcialmente y ambos inhiben el efecto del rhEGF. Lo cual sugiere, que en el efecto de la inhibición en la proliferación se debe a que el Imatinib inhibe a la vía del receptor de PDGF y del EGF, mientras que el Dasatinib inhibe a éstos y adicional a otro(os) por lo cual que lo hace un fármaco más “potente”, a pesar de que su efecto es parcial sobre la vía del receptor de PDGF.

En los estudios donde se evalúa el efecto del Imatinib en la inhibición de los receptores de cinasa de tirosina que regulan la proliferación de las MSC, sólo se ha descrito el receptor de PDGF en este proceso. En dos estudios, realizados por O’Sullivan y Fierro (2007) evaluaron el efecto inhibitorio del Imatinib sobre el PDGF-BB en la proliferación de líneas celulares estromales humanas y murinas, así como en las MSC derivadas de médula ósea (72, 73). Por lo que nosotros presentamos nueva evidencia que demuestra que el Imatinib y el Dasatinib es capaz de inhibir el efecto del rhEGF en la proliferación. También identificamos que el Dasatinib inhibe una vía adicional relacionada con la proliferación, ya que una línea estromal mesenquimal, que expresa marcadores de las

MSC pero que no tiene el receptor de PDGF o EGF, el Dasatinib es capaz de inhibir su proliferación.

En los estudios con relación a la diferenciación osteogénica, se encontró que el Imatinib y el Dasatinib incrementan la osteogénesis de *MSC-N*. Lo cual está en acuerdo con diversos estudios reportado (39, 71, 73–76). Adicionalmente encontramos diferencias en el efecto de los fármacos en la osteogénesis cuando se utilizan concentraciones que inhiben la proliferación de las *MSC-N*. El Imatinib, pero no el Dasatinib acelera la diferenciación osteogénica de las *MSC-N*. Id Boufker (2010) reportó que el Dasatinib acelera la diferenciación osteogénica de las *MSC-N* con una concentración que inhibió el 30 % de la proliferación (82), mientras que nosotros establecimos una IC50. Por lo que la diferencia de veces que incrementa el Dasatinib a la osteogénesis está relacionada con la proliferación de las *MSC* requerida en la osteogénesis (94).

En los estudios con relación a la diferenciación adipogénica, se encontró que el Imatinib y el Dasatinib incrementan genes relacionados con la adipogénesis de *MSC-N*. Lo cual está en acuerdo con los estudios reportado (65, 77).

Nuestro estudio es el primero en observar el efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica de las *MSC-N*. Se encontró que el Imatinib y el Dasatinib incrementan genes relacionados con la condrogénesis. En pacientes pediátricos tratados con el Imatinib se observó que disminuye su valor percentil. Estos datos se pueden relacionar con los datos publicados por Vandyke y cols., (2011) quienes sugieren que el Dasatinib inhibe el desarrollo de crecimiento de la tibia en ratas de 9 meses de edad, tratadas con dosis terapéuticas del fármaco (95). Nuestros resultados y el de Vandyke se relacionan en el estadio de maduración de cartílago y síntesis de matriz celular, publicado por Yamashita y cols., en el 2010, antes de que el cartílago se hipertrofie y osifique (23). Por lo anterior, podemos sugerir que el Imatinib y el Dasatinib al acelerar el proceso de síntesis de matriz extracelular es posible que acelere el proceso de osificación y de esta

manera provoque el cierre de la placa de crecimiento en los huesos, tanto en los pediátricos como en estudios en las ratas.

En cuanto al mecanismo por el cual el Imatinib y el Dasatinib incrementan la diferenciación de las MSC-N. Para ello nos enfocamos en dos vías principales que regulan la proliferación la vía del PDGF y del EGF (9). Esto se evaluó en medio osteogénico y adipogénico suplementados con sustituto de suero; y cultivos con medio de inducción condrogénica suplementado con SFB. Esta diferencia se debió a que las MSC-N en el medio condrogénico con sustituto de suero no se observaba una agregación celular, una vez que terminaba el cultivo (dato no mostrado).

El rhPDGF-BB inhibe la expresión de OCN en la diferenciación osteogénica y el Imatinib y el Dasatinib abaten este efecto. Nosotros observamos que la expresión de OCN no se incrementó en comparación al cultivo osteogénico sin los fármacos. Por lo que estos resultados sugieren que la inhibición de la vía del receptor de PDGF no es exclusiva para incrementar la diferenciación osteogénica (87). Y por lo tanto se requiere de la participación de más componentes. Algunos componentes reportados que participan en este proceso son BMP's, y factores de crecimiento como FGF, EGF, etc., (34, 90) presentes en el SFB, los cuales pudieron jugar un papel importante en la regulación de la osteogénesis cuando el efecto del rhPDGF-BB es inhibida por el Imatinib y el Dasatinib. Por otro lado, ya que se observó regulación de OCN, pero no RUNX inducida por el rhPDGF-BB, queda claro que existe regulación de genes osteogénicos a diferentes niveles en la formación de hueso observado en modelos *in vitro* como *in vivo* (82,97).

Con el fin de evaluar vías que son blancos del Imatinib y el Dasatinib, estudiamos el efecto de inhibir al rhEGF en la diferenciación osteogénica. En nuestro estudio no se encontró diferencia en la expresión de OCN cuando está presente rhEGF sólo y en combinación con los fármacos. Por lo que podemos sugerir que aun cuando el Imatinib y el Dasatinib inhiben el efecto del rhEGF en la proliferación, este no participa en el incremento de la diferenciación osteogénica.

En cuanto al efecto del Imatinib y el Dasatinib de incrementar la adipogénesis, evaluamos si el receptor del PDGF y del EGF participan en la diferenciación. El Imatinib y el

Dasatinib incrementan las células positivas al rojo oleoso, en presencia del rhPDGF-BB. Fitter y cols., estudiaron que el Imatinib incrementa la adipogénesis (a concentraciones que inhiben proliferación) cuando se inhibe la vía de PI3K-Akt inducida por PDGF (76). Sin embargo en nuestro estudio, este incremento no es mayor que al medio de inducción sin los fármacos. A diferencia del estudio de Fitter, nosotros utilizamos un medio adipogénico suplementado con sustituto de suero para observar si el Imatinib y el Dasatinib inhiben exclusivamente la vía de PDGF y/o es capaz de inhibir a otra cinasa como la del receptor de EGF para incrementar la diferenciación. El rhEGF en presencia del Imatinib o el Dasatinib no tienen efecto en la diferenciación adipogénica. Por lo que podemos sugerir que aun cuando el Imatinib y el Dasatinib son capaces de inhibir el efecto de rhEGF y del rhPDGF-BB en la proliferación, y que se ha observado que ambos regulan la adipogénesis (35), estos no participan en el incremento de la diferenciación adipogénica.

El Imatinib y el Dasatinib incrementan la diferenciación adipogénica, pero no en medio adipogénico libre de suero en presencia del rhPDGF-BB. Entonces podemos sugerir que la diferencia entre ambos estudios se relaciona con los componentes de suero y por lo tanto, en el número de veces en incrementar los adipocitos. Por lo que es necesaria la activación de otras vías en la adipogénesis el efecto del rhPDGF-BB o rhEGF es inhibida por el Imatinib o el Dasatinib.

En cuanto al mecanismo por cual el Imatinib y el Dasatinib incrementan la condrogénesis evaluamos si el receptor del PDGF y el EGF participan en la diferenciación. Encontramos que el rhPDGF-BB incrementa SOX9, y que no tienen efecto en genes de diferenciación tardía: ACAN. Ataliotis y cols., (2000) observaron en un modelo *in vivo* que el PDGF regula la formación de cartílago en etapas tempranas del desarrollo embrionario (E24-27) y no en la tardía (E30) (25). El SOX9 regula la formación de cartílago en extremidades de embriones de pollo en estadios tempranos (E24-27) del desarrollo embrionario (98). Por otro lado, células de embrión de pollo (E21) inducidas a la diferenciación condrogénica incrementaron la cantidad de proteoglicano cuando fueron tratadas con PDGF (25).

Con nuestros resultados se sugiere que el rhEGF no participa en regular SOX9 y ACAN en la diferenciación condrogénica de MSC-N. Debido a que el Imatinib y el Dasatinib no

abatieron el efecto de rhPDGF-BB y que el rhEGF no regula la diferenciación, este resultado sugiere que el Imatinib y el Dasatinib incrementan la diferenciación de las *MSC* hacia condrocitos por un mecanismo diferente al PDGF o EGF.

Para descartar que la inhibición del rhPDGF-BB o el rhEGF por el Imatinib y el Dasatinib regulen la diferenciación adipogénica de las *MSC*, por ejemplo, se puede evaluar sólo el efecto del Imatinib y el Dasatinib en las *MSC* en medio de inducción libre de suero, con el fin de valorar si los fármacos son capaces de incrementar la diferenciación, bajo estas condiciones de cultivo. Adicionalmente es posible observar el efecto directo del Imatinib y el Dasatinib sobre la adipogénesis en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF, cuando se impide la proliferación celular en el tratamiento de PDGF el cual se consideró como referencia para observar un efecto, para ello es posible utilizar antagonistas de la proliferación como mitomicina.

Nuestro estudio permitió conocer los blancos del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación y comparar sus efectos en la diferenciación de las *MSC*, lo cual no sólo tiene implicaciones en la biología de estas células, sino además hace evidente el considerar estos efectos para la elección entre ambos fármacos.

Este es el primer estudio en explorar la participación de las vías del receptor de PDGF y del EGF y en comparar el efecto de ambos fármacos. El Imatinib y el Dasatinib inhiben Bcr-Abl *in vitro* (63, 64) y en este estudio se observa que ambos fármacos inhiben la proliferación de la línea K562, sin embargo no se pudo distinguir a que cinasa está inhibiendo ya que ésta expresa Bcr-Abl y c-Kit (91) y ambas son blancos del Imatinib y el Dasatinib. De acuerdo a esto, queda demostrado que las concentraciones empleadas del Imatinib y el Dasatinib inhiben la proliferación de K562 eficientemente y que éstos tienen efectos diferentes en las *MSC-N*, por lo que será necesario realizar estudios clínicos que permitan conocer si el Imatinib tiene ventajas en pacientes con osteoporosis senil y el Dasatinib en pacientes con diabetes concomitante (99). Nuestro estudio abre la posibilidad de explorar el uso de estos fármacos en terapia celular para favorecer la diferenciación condrogénica.

11. CONCLUSIONES.

El Imatinib y el Dasatinib inhiben la proliferación de las *MSC-N* e incrementan su diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica. El Imatinib es un inductor más potente de la diferenciación osteogénica. Las vías del PDGF y EGF se encuentran involucradas en la proliferación de las *MSC-N* pero no tienen un efecto directo en su diferenciación. Nuestros resultados sugieren que el Imatinib y el Dasatinib inhiben adicionalmente otras vías involucradas en la diferenciación de las *MSC-N*.

Nuestros resultados aportan información importante sobre la biología de las *MSC-N* y sienta las bases para considerar las diferencias en el efecto del Imatinib y el Dasatinib en las *MSC-N*.

12. PERSPECTIVAS.

En relación con los estudios de proliferación, falta identificar la vía adicional al PDGF y al EGF que el Dasatinib es capaz de inhibir. Adicionalmente a nuestros resultados, es conveniente corroborar en un estudio de fosforilación de proteínas la inhibición de la actividad de cada una de las cinasas que este estudio propone.

Nosotros elegimos explorar el efecto que tienen el Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación de las *MSC*, cuando el efecto del rhPDGF-BB y del rhEGF están inhibidas por una IC50 de los fármacos. Nuestros datos coinciden con la mayoría de los estudios publicados hasta el momento. En aquellos estudios donde no hay coincidencia, se debe considerar a la composición del medio de diferenciación y el efecto de la proliferación relacionada con la concentración empleada. Por lo que es necesario establecer metodologías uniformes para evaluar diferenciación.

Por otro lado, en este estudio se evaluaron dos de las principales vías en la proliferación y en la diferenciación. Se identificaron los blancos del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación y diferenciación osteogénica. Sin embargo, queda por explorar cuál es el mecanismo por el cual el Imatinib y el Dasatinib incrementan la condrogénesis. Y esclarecer si la inhibición del PDGF está involucrada en incrementar la adipogénesis. Y

por otro lado, explorar nuevos efectos sobre la funcionalidad de las *MSC*, como en capacidad de soporte hematopoyético y en actividad inmunoreguladora.

13. FIGURAS DE RESULTADOS.

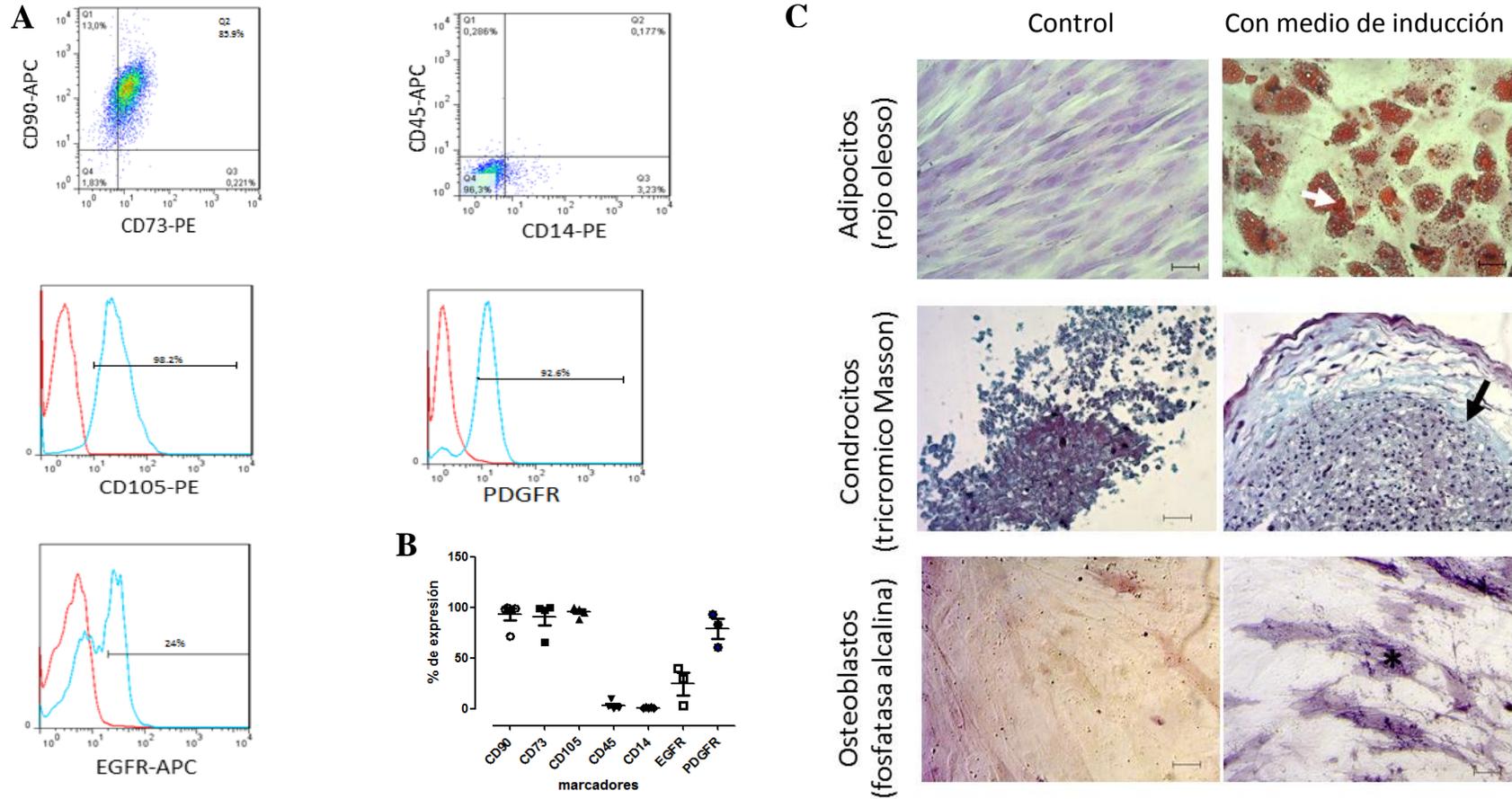


Figura 6. Caracterización de MSC derivadas de médula ósea de donadores hematológicamente normales. **A.** En los *plots* de citometría (de una muestra representativa) se muestra la expresión del CD90 coexpresado con el CD73 y el CD45 co-evaluado con el CD14; el CD105, el CD140b y el EGFR en histogramas, donde el color rojo indica el isotipo y en el color azul las células marcadas con el anticuerpo. **B.** Expresión de antígenos en las MSC-N como el CD90, el CD73, el CD105, el CD45, el CD14 (n=4), el PDGFR y el EGFR (n=3). **C.** Capacidad de diferenciación de las MSC-N (de una muestra representativa). Cultivos control y con medio de inducción hacia adipocitos positivos al rojo oleoso (flecha blanca); condrocitos positivos a tricrómico de Masson (flecha negra); y osteoblastos positivos a fosfatasa alcalina (*). Escala de la barra, 50 μ m.

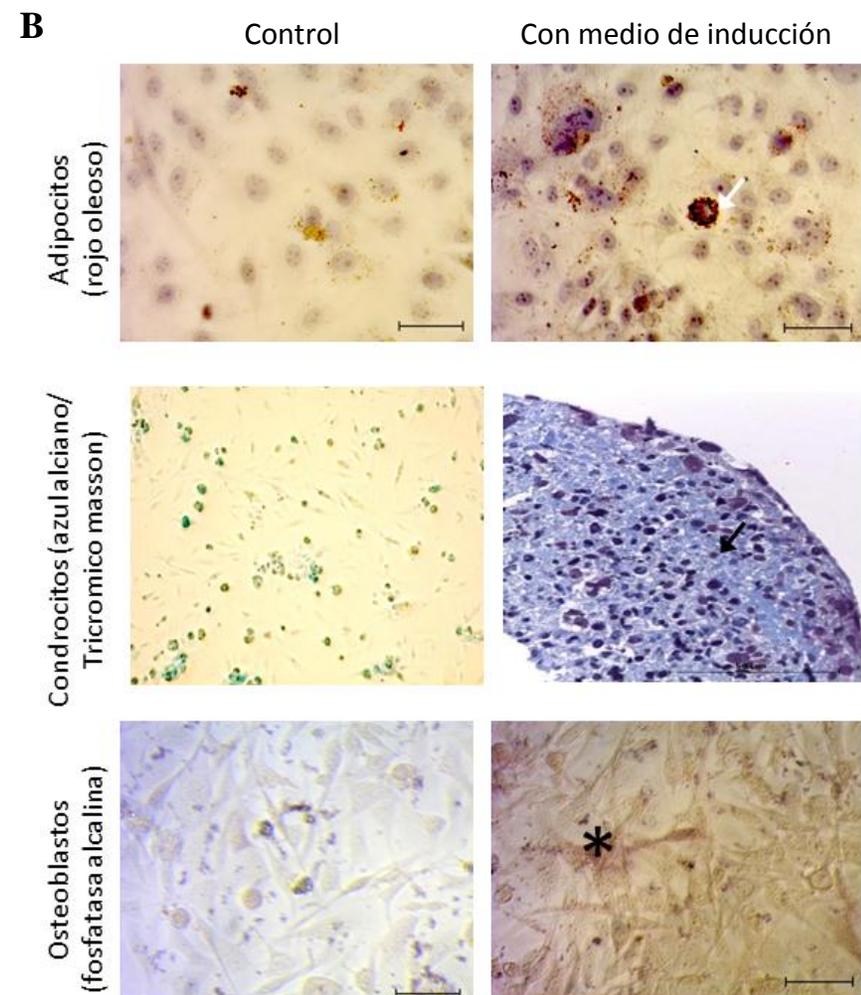
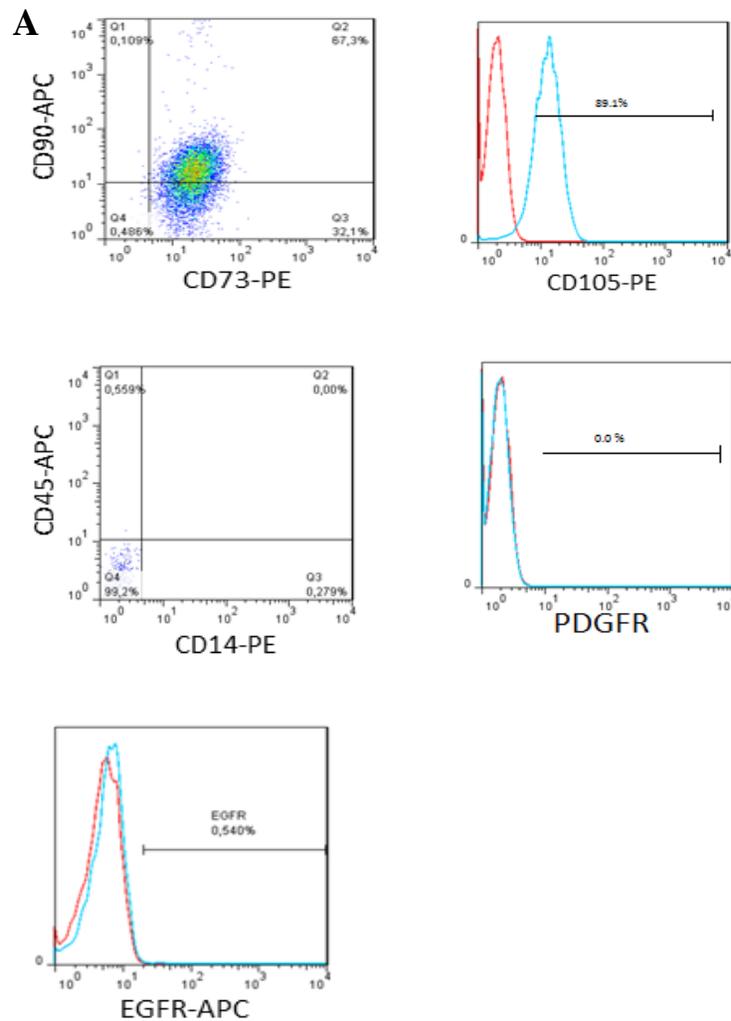


Figura 7. Caracterización de HS5 PDGFR-/EGFR- derivada de médula ósea. A. En los plots de citometría se muestra la expresión del CD90 coexpresado con el CD73, el CD105 en histograma, el CD45 co-evaluado con el CD14; el PDGFR y el EGFR en histogramas. En los histogramas el color rojo indica el isotipo y en el color azul las células marcadas con el anticuerpo. **B.** Capacidad de diferenciación de la HS5. Cultivos control y con medio de inducción hacia adipocitos positivos al rojo oleoso (flecha blanca); condrocitos positivos a tricrómico de Masson (flecha negra); y osteoblastos positivos a fosfatasa alcalina (*). Escala de la barra, 50 μ m. figuras de un experimento representativo (n=2).

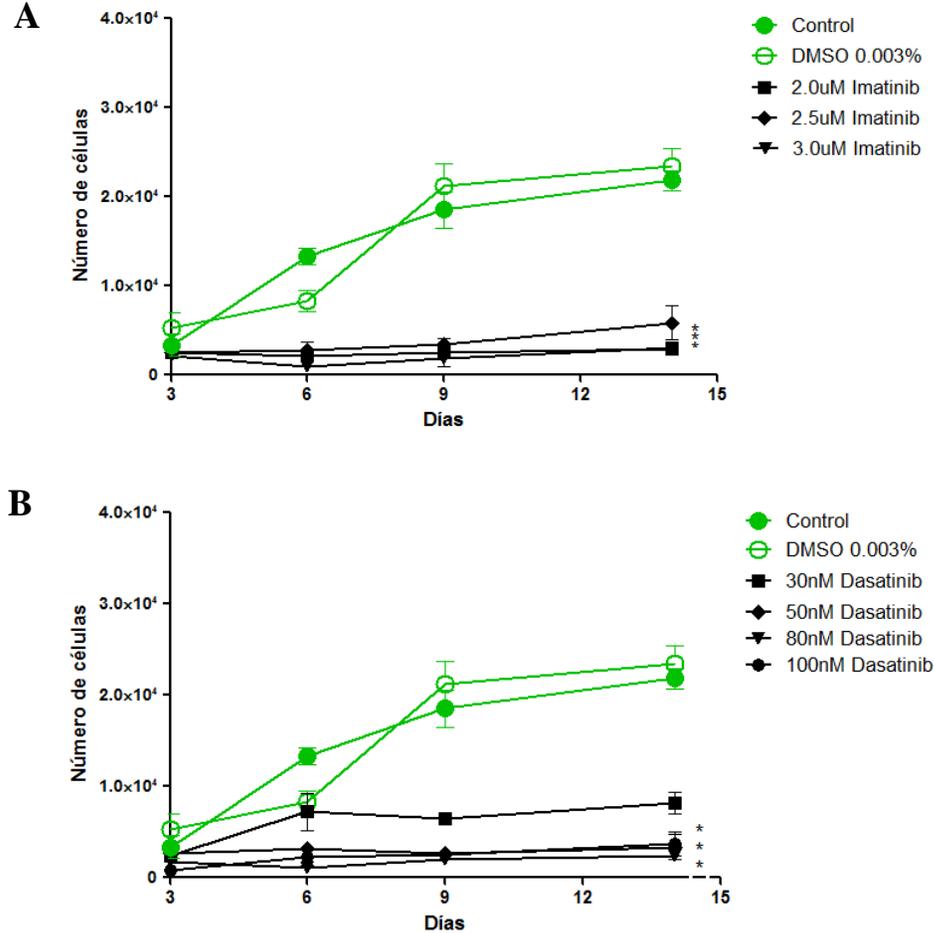


Figura 8. Elección de la concentración del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de MSC-N. 1, 300 células/cm² fueron cultivadas en DMEM suplementado con SFB, al día siguiente se les adicionaron **A.** Dosis crecientes del Imatinib (1.0, 2.0, 2.5 y 3.0 μM) y de **B.** Dasatinib (30, 50, 80 y 100 nM) o en presencia del vehículo (DMSO al 0.003 %). Los resultados se presentan como la media (±) SEM de 2 experimentos independientes por duplicado. Las medias de los tratamientos se compararon contra el control mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una comparación múltiple de Bonferroni. * p< 0.05. SEM. Error estándar de la media.

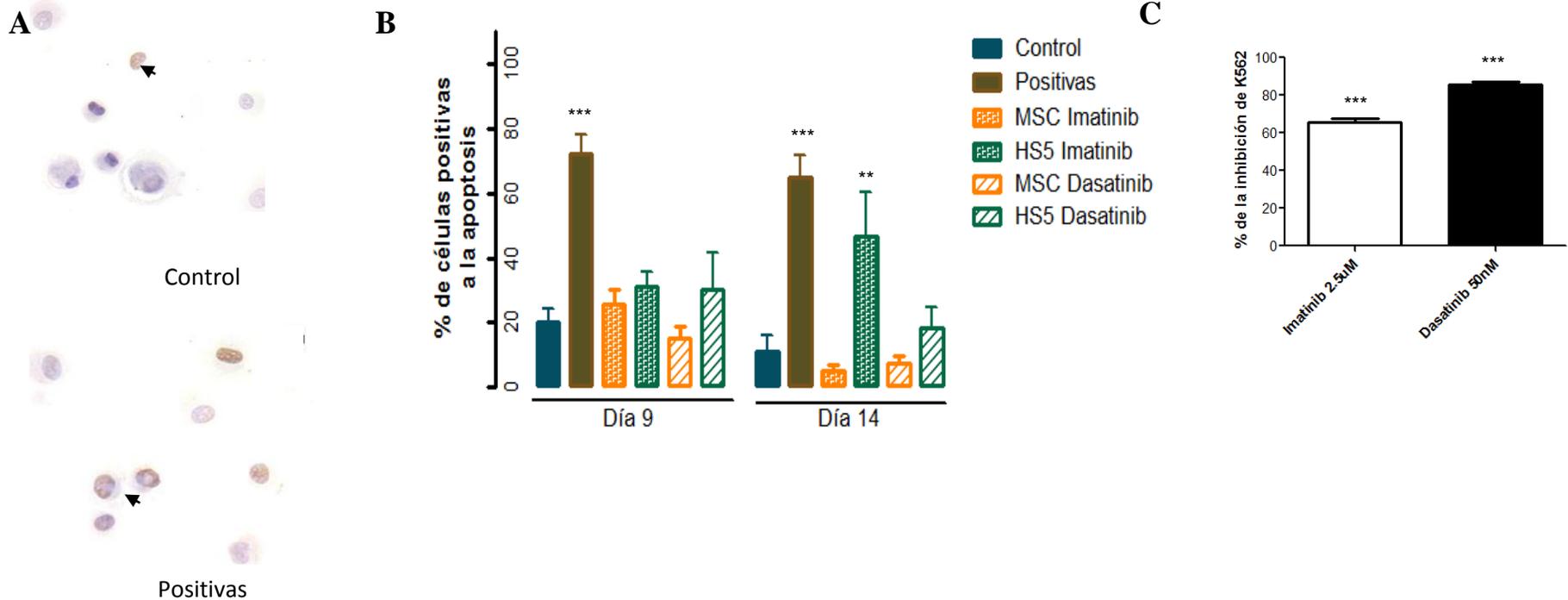


Figura 9. Evaluación de la apoptosis en las MSC-N y en HS5 PDGFR-/EGFR- en presencia del Imatinib y el Dasatinib. Actividad sobre línea K562 Bcr-Abl positiva. **A.** Microfotografías de las células positivas (cabeza de flecha) en la condición sin inducción y células positivas (MSC-N y HS5 en cultivo libre de suero por 24h) en el ensayo de TUNEL. **B.** 1, 300 células fueron cultivadas durante 14 días en presencia de 2.5 µM de Imatinib y 50 nM de Dasatinib. Al día 9 y 14 se cuantificó el número de células positivas a TUNEL. Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 2 experimentos independientes, por duplicado. Las medias se compararon mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. **C.** 10,000 células de la línea K562 fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con SFB en presencia de los fármacos durante 48 horas. Se evaluó el por ciento de células obtenidas de cada condición con respecto al control (sin los fármacos). Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 1 experimento realizado por triplicado. Las medias de los tratamientos se compararon contra el control mediante el análisis de TUKEY. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. SEM. Error estándar de la media.

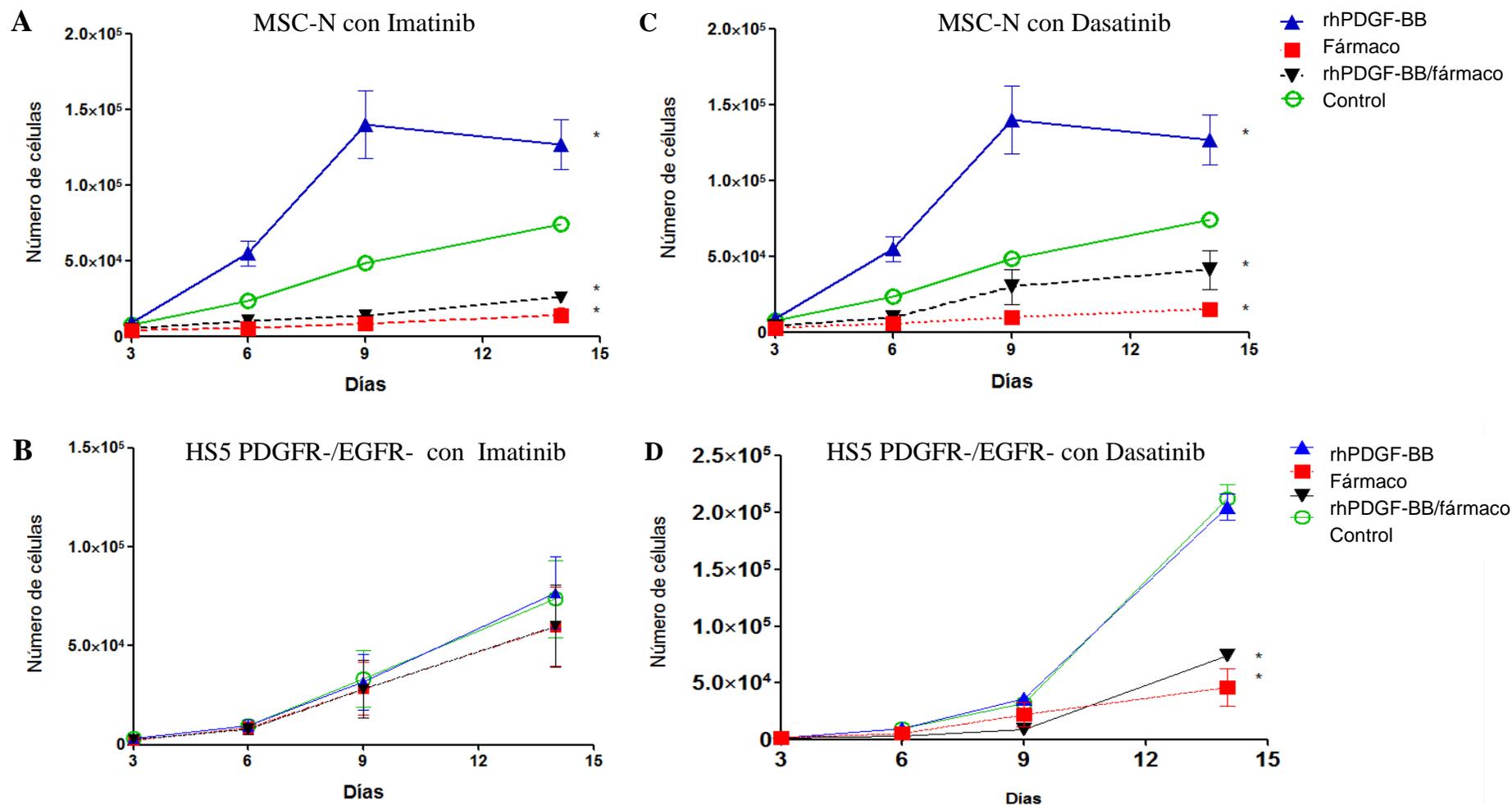


Figura 10. Cinética de proliferación de MSC-N y HS5 en medio con suero en presencia del Imatinib o el Dasatinib en conjunto con el rhPDGF-BB. 1, 300 células/cm² fueron cultivadas en medio DMEM o RPMI suplementado con suero durante 14 días en presencia de 2.5 μ M de Imatinib o 50 nM del Dasatinib solos y conjunto con 10 ng/mL de rhPDGF-BB en las A y C. MSC-N en 4 experimentos por duplicado y en B y D. HS5 PDGFR-/EGFR- en 2 experimentos por duplicado. Se evaluó el número de células excluyentes al azul de tripano. Los resultados se presentan como la media (\pm) SEM de experimentos independientes por duplicado. Las medias de los tratamientos se compararon contra el control mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$. SEM. Error estándar de la media.

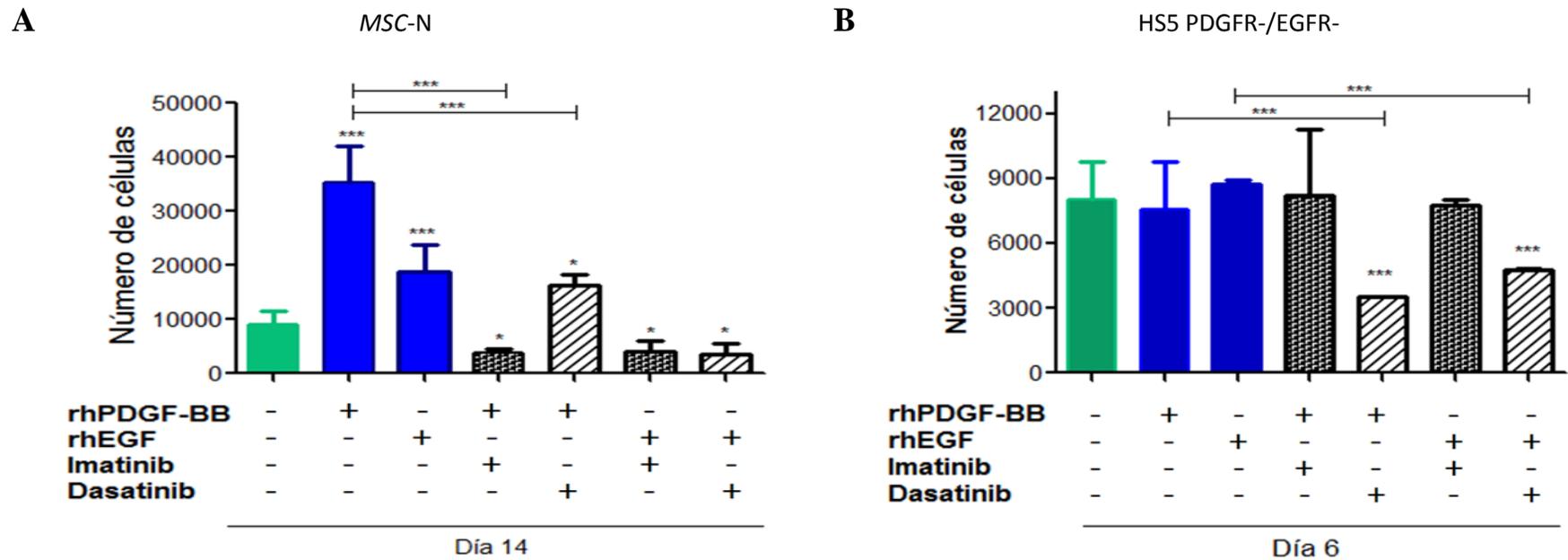


Figura 11. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la proliferación de *MSC-N* y en la línea *HS5 PDGFR-/EGR-* en presencia de *rhPDGF-BB* o *rhEGF* en cultivo libre de suero. 1, 300 células/cm² fueron cultivadas en medio DMEM o RPMI suplementado con 20 % sustituto de suero en presencia de 2.5 μ M de Imatinib o 50 nM de Dasatinib en conjunto con 10 ng/mL de *rhPDGF-BB* o *rhEGF*. **A.** *MSC-N*. **B.** *HS5 PDGFR-/EGFR-*. Se evaluó el número de células excluyentes al azul de tripano. Los resultados se presentan como la media (+) SEM de experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las medias de los tratamientos se compararon contra el control mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *** $p < 0.001$. * $p < 0.05$. SEM. Error estándar de la media.

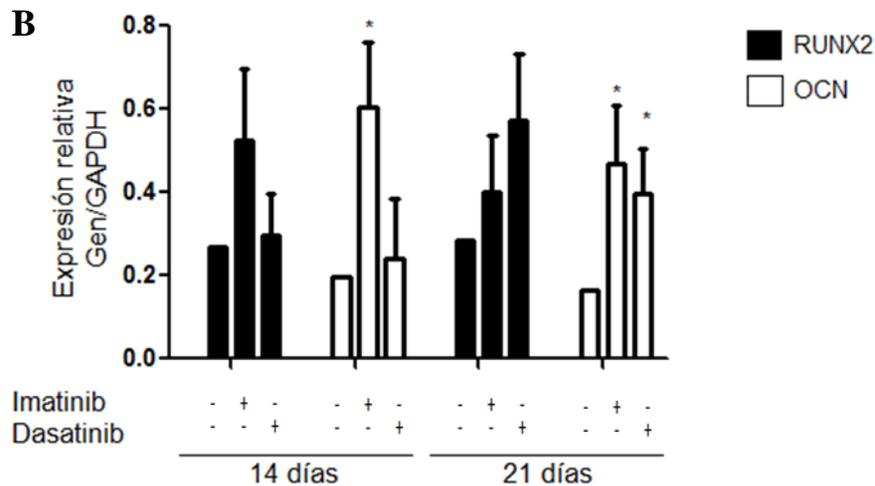
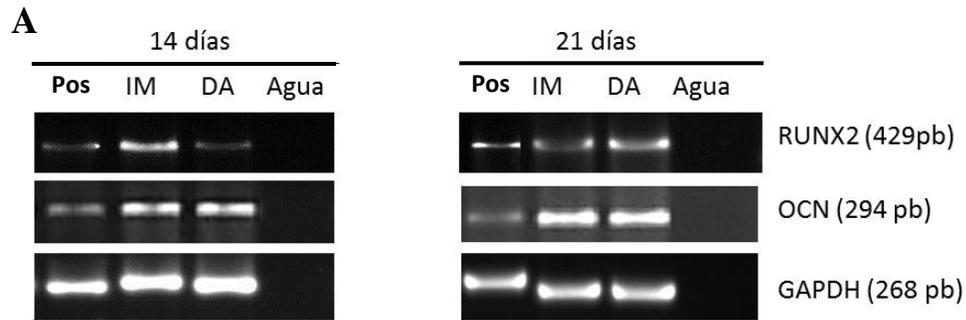
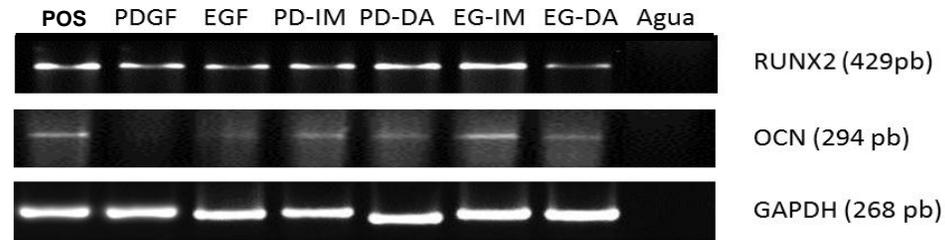


Figura 12. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación osteogénica de las MSC-N. 5, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción osteogénica suplementado con SFB durante 14 y 21 días en presencia de 2.5 μ M del Imatinib y 50 nM del Dasatinib. A partir de las células en cultivo se realizó una RT-PCR. **A.** El producto de la RT-PCR se visualizó en gel de agarosa teñido con *Syber gold* y posteriormente se cuantificó por densitometría. *Software Image J.* Pos Medio de la inducción osteogénica. IM Medio osteogénico en presencia del Imatinib. DA Medio osteogénico en presencia del Dasatinib. **B.** Expresión relativa de RUNX2 y OCN versus GAPDH.

Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos (IM o DA) se compararon contra la media de la condición en ausencia de los fármacos mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *p<0.05. SEM. Error estándar de la media.

A



B

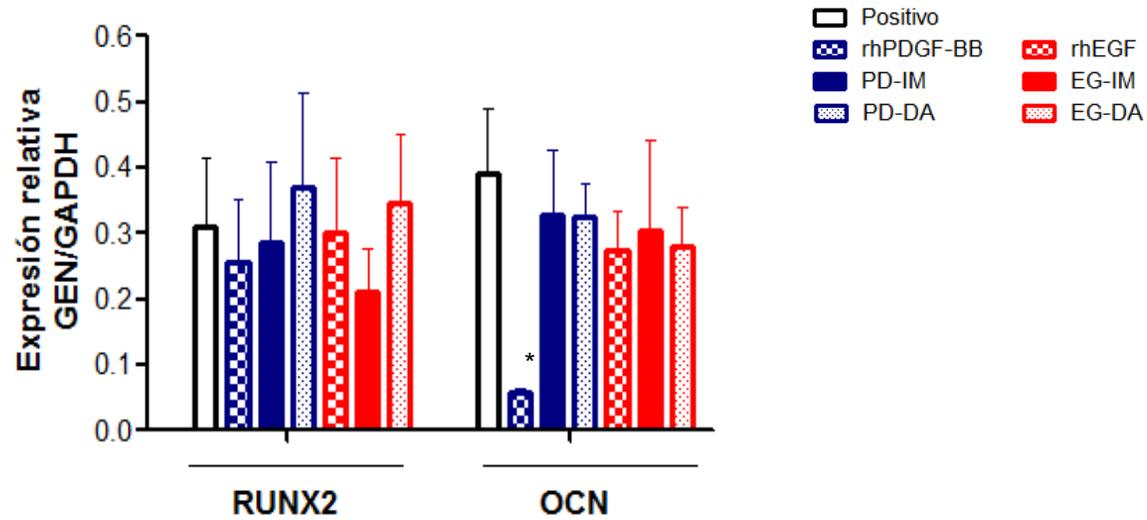


Figura 13. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en los genes de diferenciación osteogénica de MSC-N en presencia de rhPDGF o rhEGF. 5, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción osteogénica suplementado con 20 % del sustituto de suero durante 21 días en presencia de rhPDGF y rhEGF solos y en conjunto con 2.5 μM del Imatinib o 50 nM del Dasatinib. A partir de las células en cultivo se realizó una RT-PCR. **A.** El producto de la RT-PCR se visualizó en gel de agarosa teñido con Syber gold y posteriormente se cuantificó por densitometría. *Software* Image J. POS Medio de la inducción osteogénica. PD-IM o EG-IM Medio osteogénico en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en conjunto con el Imatinib. PD-DA o EG-DA Medio osteogénico en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en conjunto con el Dasatinib. **B.** Expresión relativa de RUNX2 y OCN versus GAPDH.

Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos se compararon contra la media del control positivo mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *p<0.05. SEM. Error estándar de la media.

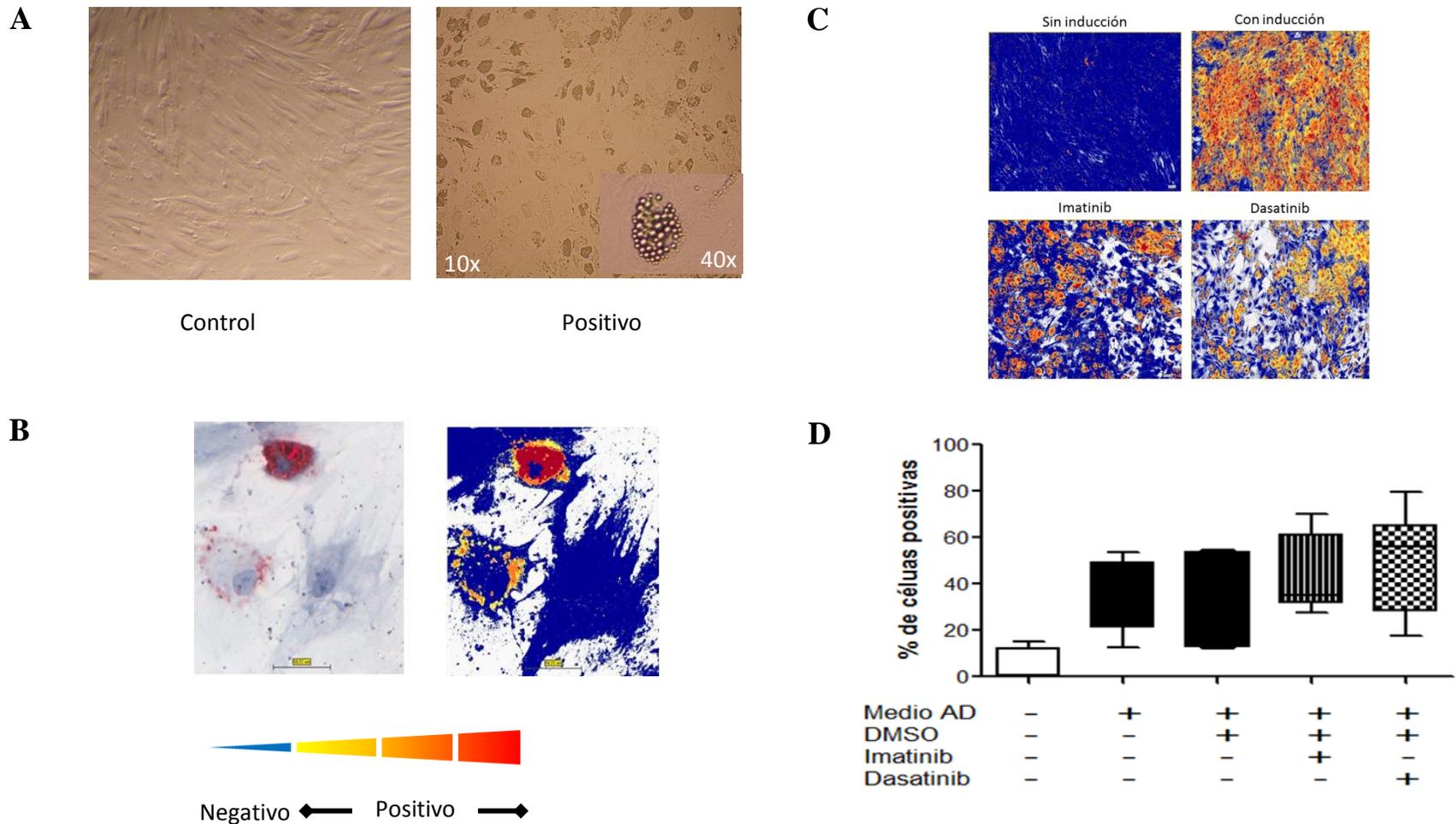
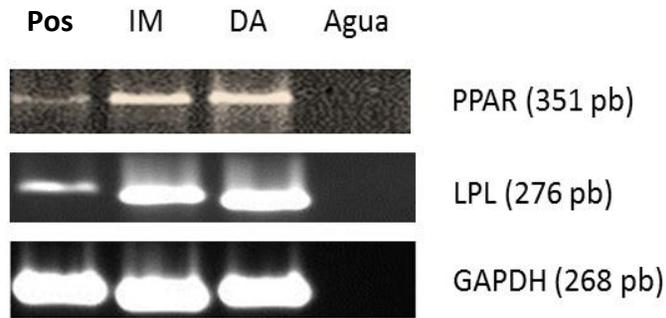


Figura 14. Evaluación morfológica del efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las MSC-N. 10, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción adipogénica suplementado con SFB durante 14 días en presencia de 2.5 μ M del Imatinib o de 50 nM del Dasatinib. **A.** La intensidad de tinción está relacionada con la presencia de vacuolas lipídicas. En la escala por color, se representan células negativas (color azul) y positivas (de amarillo a rojo). **B.** Las microfotografías muestran un campo de 5 analizados por escáner en el cultivo. Ampliación 40x. **C.** Por ciento de células positivas con respecto a las células totales. Los resultados expresan la media (\pm) SEM de 4 experimentos independientes. SEM. Error estándar de la media. **D.** Microfotografías de cultivos control y con inducción a la adipogénesis (Positivo).

A



B

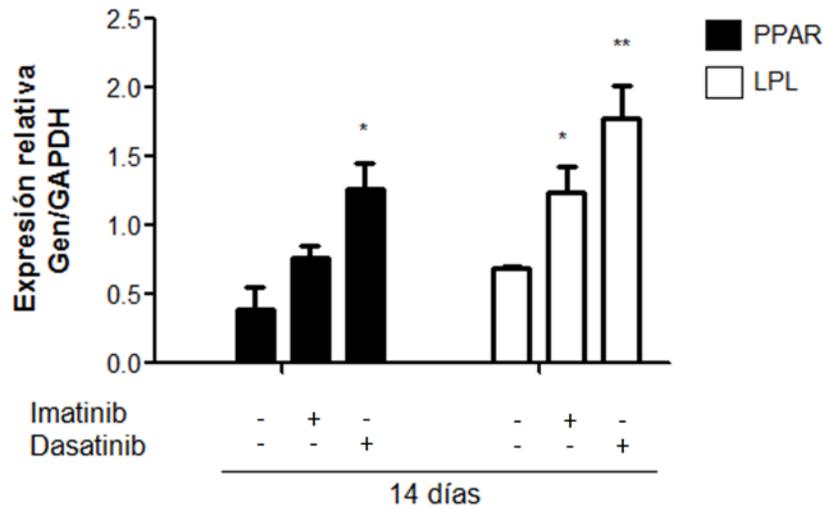


Figura 15. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la expresión de genes de diferenciación adipogénicos en las MSC-N. 10, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción adipogénico suplementado con SFB durante 14 días en presencia de 2.5 μM del Imatinib y 50 nM del Dasatinib. A partir de las células en cultivo se realizó una RT-PCR. **A.** El producto de la RT-PCR se visualizó en gel de agarosa teñido con *Syber gold* y posteriormente se cuantificó por densitometría. *Software* Image J. Pos Medio de la inducción adipogénica. IM Medio adipogénico en presencia del Imatinib. DA Medio adipogénico en presencia del Dasatinib **B.** Expresión relativa de PPAR y LPL versus GAPDH.

Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos (IM o DA) se compararon contra la media de la condición en ausencia de los fármacos mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *p<0.05, **p<0.01. SEM. Error estándar de la media.

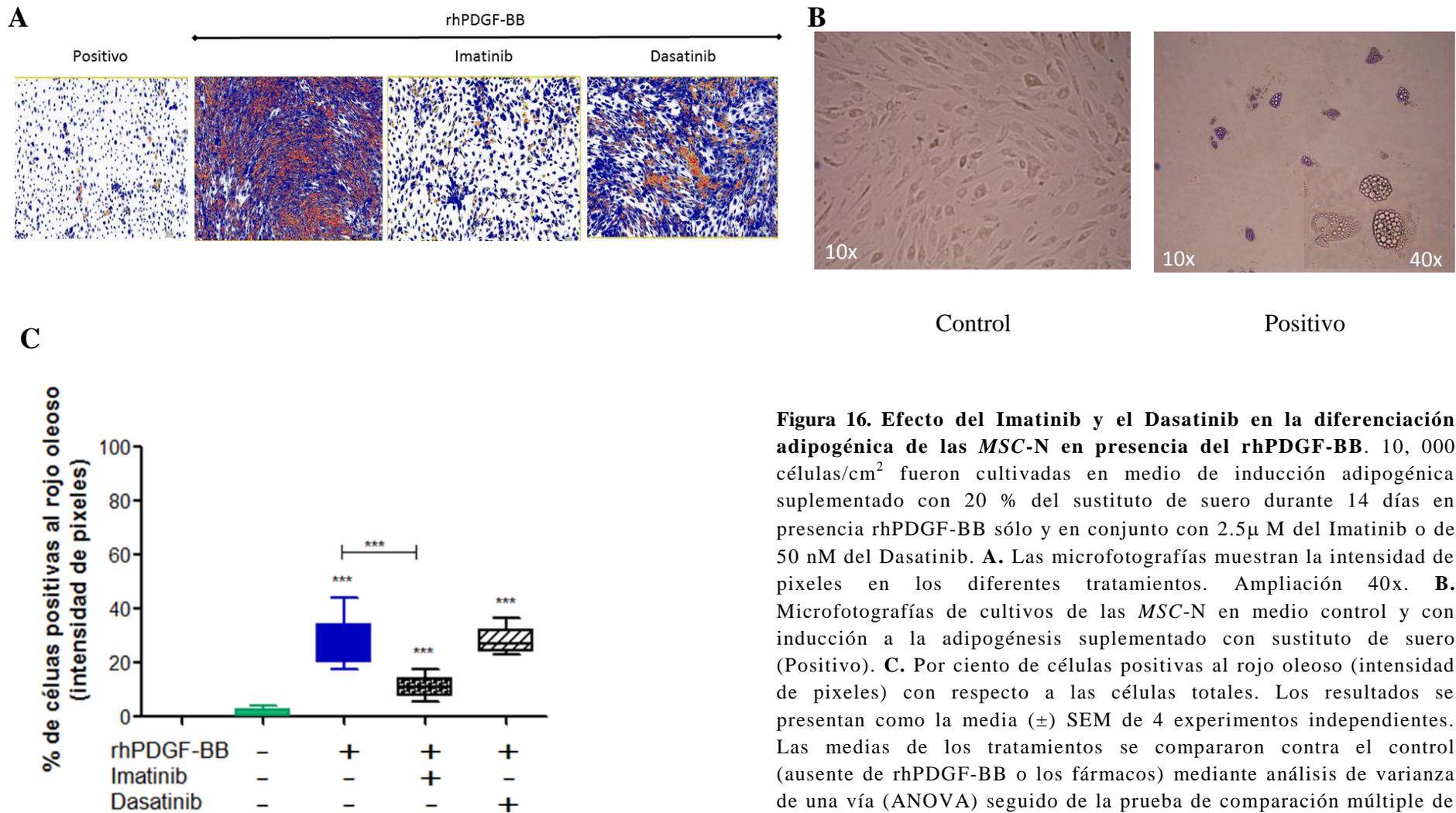


Figura 16. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las MSC-N en presencia del rhPDGF-BB. 10, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción adipogénica suplementado con 20 % del sustituto de suero durante 14 días en presencia rhPDGF-BB sólo y en conjunto con 2.5µ M del Imatinib o de 50 nM del Dasatinib. **A.** Las microfotografías muestran la intensidad de píxeles en los diferentes tratamientos. Ampliación 40x. **B.** Microfotografías de cultivos de las MSC-N en medio control y con inducción a la adipogénesis suplementado con sustituto de suero (Positivo). **C.** Por ciento de células positivas al rojo oleoso (intensidad de píxeles) con respecto a las células totales. Los resultados se presentan como la media (±) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos se compararon contra el control (ausente de rhPDGF-BB o los fármacos) mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. ***p<0.001. SEM. Error estándar de la media.

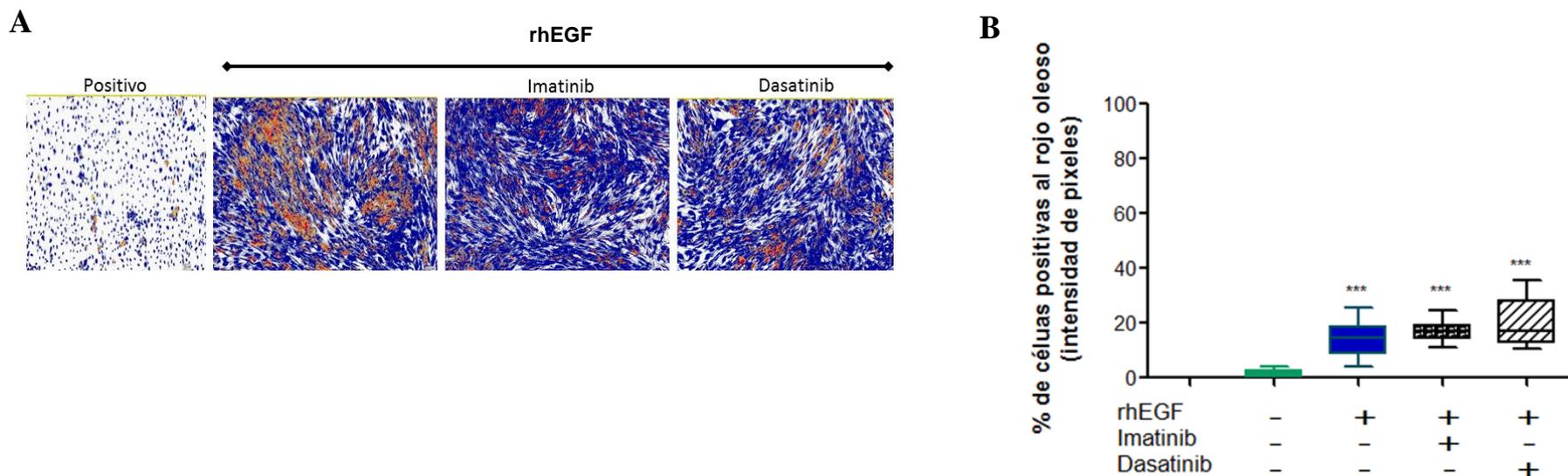
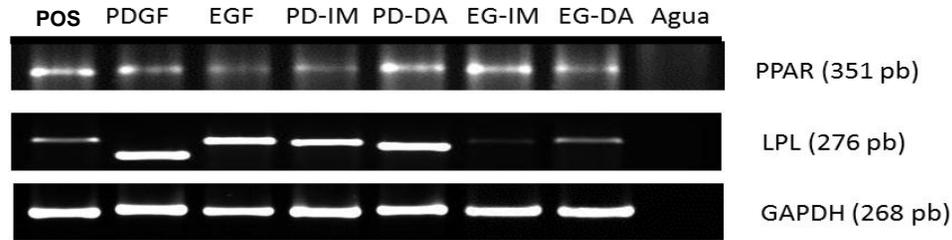


Figura 17. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación adipogénica de las MSC-N en presencia del rhEGF. 10, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción adipogénica suplementado con 20 % del sustituto de suero durante 14 días en presencia del rhEGF sólo y en conjunto con 2.5 μ M del Imatinib o con 50 nM del Dasatinib. **A.** Las microfotografías muestran la intensidad de píxeles en los diferentes tratamientos. Ampliación 8x. **B.** Por ciento de células positivas al rojo oleoso con respecto a las células totales. Los resultados se presentan como la media (\pm) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos se compararon contra el control (ausente de rhEGF o los fármacos) mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. ***p<0.001. SEM. Error estándar de la media.

A



B

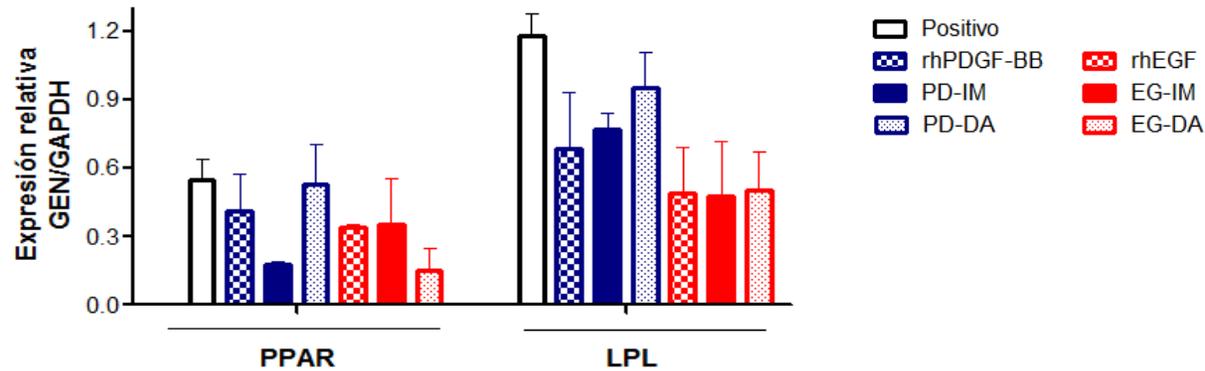


Figura 18. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en los genes de diferenciación adipogénica de las MSC-N en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF. 10, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción adipogénica suplementado con 20 % del sustituto de suero durante 14 días en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF solos y en conjunto con 2.5 μM del Imatinib o 50 nM del Dasatinib. A partir de las células en cultivo se realizó una RT-PCR. **A.** El producto de la RT-PCR se visualizó en gel de agarosa teñido con *Syber gold* y posteriormente se cuantificó por densitometría. *Software* Image J. POS Medio de la inducción adipogénica. PD-IM o EG-IM Medio adipogénico en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en conjunto con el Imatinib. PD-DA o EG-DA Medio adipogénico en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en conjunto con el Dasatinib. **B.** Expresión relativa de PPAR y LPL contra GAPDH.

Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos se compararon contra la media del control positivo mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. SEM. Error estándar de la media.

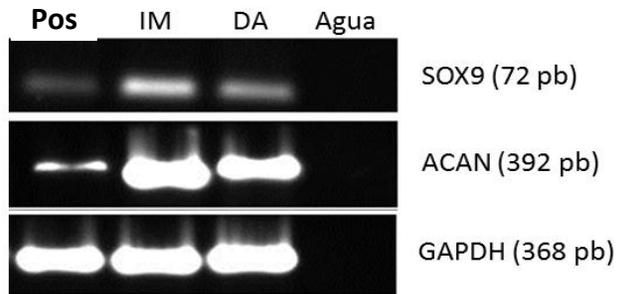
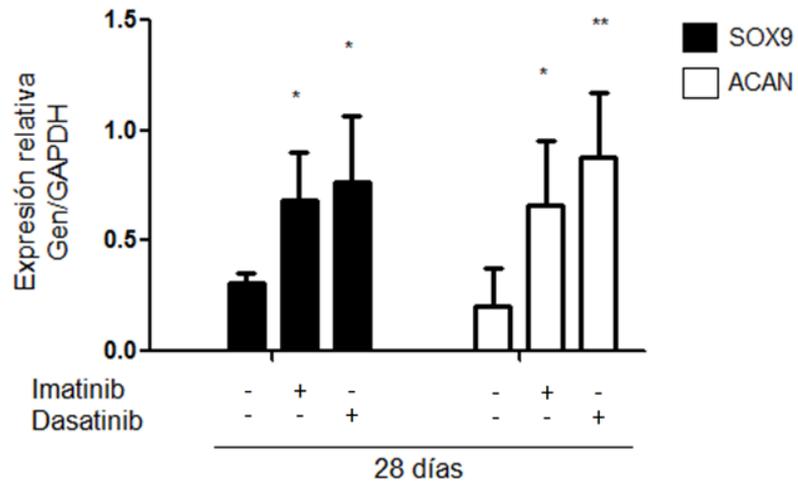
A**B**

Figura 19. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en la diferenciación condrogénica de las MSC-N. 250, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción condrogénico suplementado con SFB durante 28 días en presencia de 2.5 μM del Imatinib y de 50 nM del Dasatinib. A partir de las células en cultivo se realizó una RT-PCR. **A.** El producto de la RT-PCR se visualizó en gel de agarosa teñido con *Syber gold* y posteriormente se cuantificó por densitometría. *Software* Image J. Pos Medio de la inducción condrogénica. IM Medio condrogénico en presencia del Imatinib. DA Medio condrogénico en presencia del Dasatinib. **B.** Expresión relativa de SOX9 y ACAN versus GAPDH.

Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos (IM o DA) se compararon contra la media de la condición en ausencia de los fármacos mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *p<0.05, **p<0.01. SEM. Error estándar de la media.

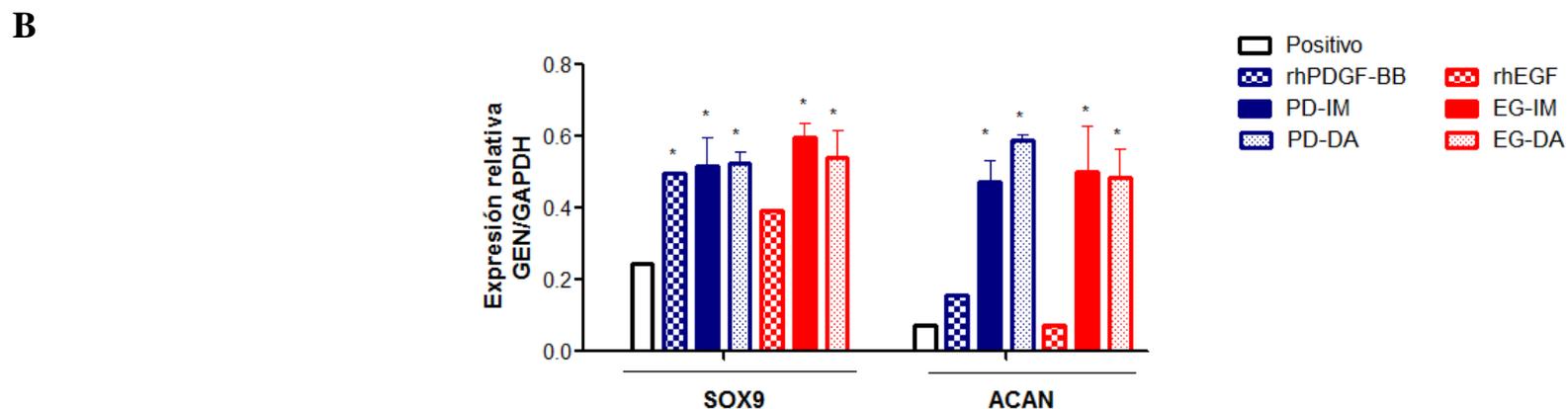
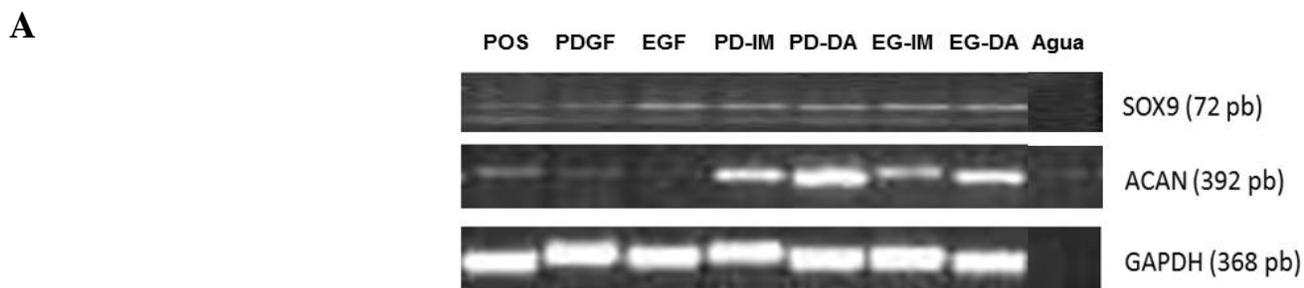


Figura 20. Efecto del Imatinib y el Dasatinib en los genes de diferenciación condrogénica de las MSC-N en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF. 250, 000 células/cm² fueron cultivadas en medio de inducción condrogénica suplementado con 10 % de suero fetal bovino durante 28 días en presencia del rhPDGF-BB o el rhEGF solos y en conjunto con 2.5 μM del Imatinib o con 50 nM del Dasatinib. A partir de las células en cultivo se realizó una RT-PCR. **A.** El producto de la RT-PCR se visualizó en gel de agarosa teñido con Syber gold y posteriormente se cuantificó por densitometría. *Software* Image J. POS Medio de la inducción condrogénica. PD-IM o EG-IM Medio condrogénico en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en conjunto con el Imatinib. PD-DA o EG-DA Medio condrogénico en presencia de rhPDGF-BB o rhEGF en conjunto con el Dasatinib. **B.** Expresión relativa de SOX9 y ACAN contra GAPDH.

Los resultados se presentan como la media (+) SEM de 4 experimentos independientes. Las medias de los tratamientos se compararon contra la media del control positivo mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *p<0.05. SEM. Error estándar de la media.

14. BIBLIOGRAFÍA.

1. Deppe U, Schierenberg E, Cole T, Krieg C, Schmitt D, Yoder B, et al. Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978 Jan;75(1):376–80.
2. Elliott DS, Ulberg LC. Early embryo development in the mammal. I. Effects of experimental alterations during first cell division in the mouse zygote. *J. Anim. Sci.* 1971 Jul;33(1):86–95.
3. Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I, Castro ME, Chavéz-González MA, Chimal-Monroy J, et al. *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. 1st ed. Mexico: UNAM; 2011.
4. Mayani H. A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch. Med. Res.* 2003 Feb;34(1):3–15.
5. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987 May;20(3):263–72.
6. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 1988;136:42–60.
7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991 Sep;9(5):641–50.
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
9. 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 Feb 15;85(4):929–40.
10. Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood.* 2008 Mar 1;111(5):2631–5.
11. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997 Apr;6(2):125–34.
12. Choi YH, Gu Y-M, Oh J-W, Lee K-Y. Osterix is regulated by Erk1/2 during osteoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011 Nov 25;415(3):472–8.
13. Jun JH, Yoon W-J, Seo S-B, Woo K-M, Kim G-S, Ryoo H-M, et al. BMP2-activated Erk/MAP kinase stabilizes Runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 2010 Nov 19;285(47):36410–9.
14. Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury GG. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J. Biol. Chem.* 2002 Sep 6;277(36):33361–8.
15. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal.* 2004 Mar;16(3):291–9.

16. Pfeilschifter J, Krempien R, Naumann A, Gronwald RG, Hoppe J, Ziegler R. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinology*. 1992 Apr;130(4):2059–66.
17. Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*. 2004 Mar;34(3):402–11.
18. Fitter S, Dewar AL, Kostakis P, To LB, Hughes TP, Roberts MM, et al. Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2538–47.
19. H. Jannet Saldivar-Santoyo, Patricia Flores-Guzmán, Héctor Mayani, Eugenia Flores Figueroa. El nicho de las células troncales: los secretos de su “código postal”. 2013 Jun;56(3):47–59.
20. Mersmann HJ, Goodman JR, Brown LJ. Development of swine adipose tissue: morphology and chemical composition. *J. Lipid Res*. 1975 Jul;16(4):269–79.
21. Fitter S, Vandyke K, Gronthos S, Zannettino ACW. Suppression of PDGF-induced PI3 kinase activity by imatinib promotes adipogenesis and adiponectin secretion. *J. Mol. Endocrinol*. 2012;48(3):229–40.
22. Artemenko Y, Gagnon A, Aubin D, Sorisky A. Anti-adipogenic effect of PDGF is reversed by PKC inhibition. *J. Cell. Physiol*. 2005 Aug;204(2):646–53.
23. Yamashita A, Nishikawa S, Rancourt DE. Identification of Five Developmental Processes during Chondrogenic Differentiation of Embryonic Stem Cells. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jun 7 [cited 2013 Apr 29];5(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881868/>
24. Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, et al. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev. Biol*. 1997 Mar 1;183(1):108–21.
25. Ataliotis P. Platelet-derived growth factor A modulates limb chondrogenesis both in vivo and in vitro. *Mech. Dev*. 2000 Jun;94(1-2):13–24.
26. Montaseri A, Busch F, Mobasheri A, Buhrmann C, Aldinger C, Rad JS, et al. IGF-1 and PDGF-bb Suppress IL-1 β -Induced Cartilage Degradation through Down-Regulation of NF- κ B Signaling: Involvement of Src/PI-3K/AKT Pathway. *PLoS One* [Internet]. 2011 Dec 14 [cited 2012 Dec 3];6(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237481/>
27. Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone*. 2006 Jul;39(1):5–16.
28. Morote J, Planas J. [Loss of bone mass in patients with prostate cancer subjected to androgenic deprivation]. *Actas Urol Esp*. 2011 Apr;35(4):232–9.
29. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol. Dis*. 2001 Jun;27(3):677–90.

30. O'Sullivan S, Naot D, Callon K, Porteous F, Horne A, Wattie D, 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 Nov;22(11):1679–89.
31. Fierro F, Illmer T, Jing D, Schleyer E, Ehninger G, Boxberger S, 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 Jun;40(3):355–66.
32. Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, et al. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets.* 2004 Feb;15(1):29–35.
33. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, et al. PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J. Bone Miner. Res.* 2008 Sep;23(9):1519–28.
34. Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J. Bone Miner. Res.* 2006 Apr;21(4):626–36.
35. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmiathy U, et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood.* 2008 Jul 15;112(2):295–307.
36. Umeda K, Zhao J, Simmons P, Stanley E, Elefanty A, Nakayama N. Human chondrogenic paraxial mesoderm, directed specification and prospective isolation from pluripotent stem cells. *Sci Rep [Internet].* 2012 Jun 13 [cited 2013 May 8];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374161/>
37. Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor. Isolation by a large-scale procedure and analysis of subunit composition. *Biochem. J.* 1981 Mar 1;193(3):907–13.
38. Li X, Pontén A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat. Cell Biol.* 2000 May;2(5):302–9.
39. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Aug;15(4):237–54.
40. Shim AH-R, Liu H, Focia PJ, Chen X, Lin PC, He X. Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 Jun 22;107(25):11307–12.
41. Fretto LJ, Snape AJ, Tomlinson JE, Seroogy JJ, Wolf DL, LaRochelle WJ, et al. Mechanism of platelet-derived growth factor (PDGF) AA, AB, and BB binding to alpha and beta PDGF receptor. *J. Biol. Chem.* 1993 Feb 15;268(5):3625–31.
42. LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat. Cell Biol.* 2001 May;3(5):517–21.

43. Mori S, Rönstrand L, Yokote K, Engström A, Courtneidge SA, Claesson-Welsh L, et al. Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases. *EMBO J.* 1993 Jun;12(6):2257–64.
44. Sachsenmaier C, Sadowski HB, Cooper JA. STAT activation by the PDGF receptor requires juxtamembrane phosphorylation sites but not Src tyrosine kinase activation. *Oncogene.* 1999 Jun 17;18(24):3583–92.
45. Panayotou G, Bax B, Gout I, Federwisch M, Wroblowski B, Dhand R, et al. Interaction of the p85 subunit of PI 3-kinase and its N-terminal SH2 domain with a PDGF receptor phosphorylation site: structural features and analysis of conformational changes. *EMBO J.* 1992 Dec;11(12):4261–72.
46. Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Apr;72(4):1317–21.
47. Hortsch M, Schlessinger J, Gootwine E, Webb CG. Appearance of functional EGF receptor kinase during rodent embryogenesis. *EMBO J.* 1983;2(11):1937–41.
48. Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):669–72.
49. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 2006 Dec;16(12):649–56.
50. McLaughlin S, Smith SO, Hayman MJ, Murray D. An electrostatic engine model for autoinhibition and activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB) family. *J. Gen. Physiol.* 2005 Jul;126(1):41–53.
51. Gotoh N, Tojo A, Hino M, Yazaki Y, Shibuya M. A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992 Jul 31;186(2):768–74.
52. Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell.* 2006 Jun 16;125(6):1137–49.
53. Ferguson KM. A structure-based view of Epidermal Growth Factor Receptor regulation. *Annu Rev Biophys.* 2008;37:353–73.
54. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000 Nov 20;19(49):5548–57.
55. Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 Apr 27;107(17):7692–7.
56. Kolibaba KS, Druker BJ. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997 Dec 9;1333(3):F217–248.

57. Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Aug;15(4):275–86.
58. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010 Jun 25;141(7):1117–34.
59. Yuzawa S, Opatowsky Y, Zhang Z, Mandiyan V, Lax I, Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell.* 2007 Jul 27;130(2):323–34.
60. Ingram JL, Bonner JC. EGF and PDGF receptor tyrosine kinases as therapeutic targets for chronic lung diseases. *Curr. Mol. Med.* 2006 Jun;6(4):409–21.
61. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 1996 Jan 1;56(1):100–4.
62. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2001 Apr 5;344(14):1031–7.
63. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature.* 1985 Jun 13;315(6020):550–4.
64. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2002 Feb 28;346(9):645–52.
65. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 2002 Aug 1;62(15):4236–43.
66. Litzow MR. Imatinib resistance: obstacles and opportunities. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006 May;130(5):669–79.
67. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia.* 2002 Nov;16(11):2190–6.
68. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 2006 Jun 15;354(24):2531–41.
69. Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.* 2004 Jul 16;305(5682):399–401.
70. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, 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 Oct;295(1):139–45.

71. Lu KV, Zhu S, Cvrljevic A, Huang TT, Sarkaria S, Ahkavan D, et al. Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69(17):6889–98.
72. Johnson FM, Bekele BN, Feng L, Wistuba I, Tang XM, Tran HT, et al. Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010 Oct 20;28(30):4609–15.
73. Chang Q, Jorgensen C, Pawson T, Hedley DW. Effects of dasatinib on EphA2 receptor tyrosine kinase activity and downstream signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* 2008 Oct 7;99(7):1074–82.
74. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2640–53.
75. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J. Med. Chem.* 2004 Dec 30;47(27):6658–61.
76. Fitter S, Vandyke K, Gronthos S, Zannettino ACW. Suppression of PDGF-induced PI3 kinase activity by imatinib promotes adipogenesis and adiponectin secretion. *J Mol Endocrinol.* 2012 Jun 1;48(3):229–40.
77. Jönsson S, Olsson B, Ohlsson C, Lorentzon M, Mellström D, Wadenvik H. Increased cortical bone mineralization in imatinib treated patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica.* 2008 Jul 1;93(7):1101–3.
78. Grey A, O’Sullivan S, Reid IR, Browett P. Imatinib mesylate, increased bone formation, and secondary hyperparathyroidism. *N. Engl. J. Med.* 2006 Dec 7;355(23):2494–5.
79. Jaeger BAS, Tauer JT, Ulmer A, Kuhlisch E, Roth HJ, Suttorp M. Changes in bone metabolic parameters in children with chronic myeloid leukemia on imatinib treatment. *Med. Sci. Monit.* 2012 Dec 1;18(12):CR721–728.
80. Carrara RCV, Orellana MD, Fontes AM, Palma PVB, Kashima S, Mendes MR, 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 Jan;40(1):57–67.
81. Jönsson S, Hjorth-Hansen H, Olsson B, Wadenvik H, Sundan A, Standal T. Imatinib inhibits proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes early but not late osteoblast differentiation in vitro. *J. Bone Miner. Metab.* 2012 Jan;30(1):119–23.
82. Id Boufker H, Lagneaux L, Najjar M, Piccart M, Ghanem G, Body J-J, et al. The Src inhibitor dasatinib accelerates the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteoblasts. *BMC Cancer.* 2010;10:298.
83. Tibullo D, Barbagallo I, Giallongo C, La Cava P, Branca A, Conticello C, et al. Effects of second-generation tyrosine kinase inhibitors towards osteogenic differentiation of human mesenchymal cells of healthy donors. *Hematol Oncol.* 2012 Mar;30(1):27–33.

84. Lee Y-C, Huang C-F, Murshed M, Chu K, Araujo JC, Ye X, et al. The Src Family Kinase/Abl Inhibitor Dasatinib Suppresses Proliferation and Enhances Differentiation of Osteoblasts. *Oncogene*. 2010 Jun 3;29(22):3196–207.
85. Tibullo D, Giallongo C, La Cava P, Berretta S, Stagno F, Chiarenza A, et al. Effects of imatinib mesylate in osteoblastogenesis. *Exp. Hematol*. 2009 Apr;37(4):461–8.
86. Borriello A, Caldarelli I, Basile MA, Bencivenga D, Tramontano A, Perrotta S, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib induces a marked adipogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE*. 2011;6(12):e28555.
87. Kumar A, Salimath BP, Stark GB, Finkenzeller G. Platelet-derived growth factor receptor signaling is not involved in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2010 Mar;16(3):983–93.
88. Takahashi N, Miura M, Scott SA, Niioka T, Sawada K. Pharmacokinetics of dasatinib for Philadelphia-positive acute lymphocytic leukemia with acquired T315I mutation. *J Hematol Oncol*. 2012 May 15;5:23.
89. Gambacorti-Passerini C, Le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, et al. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol. Dis*. 1997 Dec;23(3):380–94.
90. Soares PB, Jeremias TS, Alvarez-Silva M, Licinio MA, Santos-Silva MC, Vituri CL. In vitro inhibitory effects of imatinib mesylate on stromal cells and hematopoietic progenitors from bone marrow. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2013 Jan;46(1):39–51.
91. Ogawa K, Tashima M, Toi T, Sawai H, Sawada H, Fujita J, et al. Inhibition of erythroid differentiation by stem cell factor in K562 cells expressing the c-kit gene. *Exp. Hematol*. 1994 Jan;22(1):45–51.
92. 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 May;82(5):394–5.
93. Berman E, Nicolaidis M, Maki RG, Fleisher M, Chanel S, Scheu K, et al. Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N. Engl. J. Med*. 2006 May 11;354(19):2006–13.
94. Cárcamo-Orive I, Gaztelumendi A, Delgado J, Tejados N, Dorronsoro A, Fernández-Rueda J, et al. Regulation of human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation capacity by glucocorticoid receptor and AP-1 crosstalk. *J. Bone Miner. Res*. 2010 Oct;25(10):2115–25.
95. Vandyke K, Fitter S, Zannettino ACW. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib (SPRYCEL) inhibits chondrocyte activity and proliferation. *Blood Cancer J*. 2011 Feb;1(2):e2.
96. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T. Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *J. Cell. Biochem*. 2007 Aug 1;101(5):1266–77.

97. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11;108(1):17–29.
98. Díaz-Hernández ME, Bustamante M, Galván-Hernández CI, Chimal-Monroy J. *Irx1* and *Irx2* are coordinately expressed and regulated by retinoic acid, TGF β and FGF signaling during chick hindlimb development. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e58549.
99. Ono K, Suzushima H, Watanabe Y, Kikukawa Y, Shimomura T, Furukawa N, et al. Rapid amelioration of hyperglycemia facilitated by dasatinib in a chronic myeloid leukemia patient with type 2 diabetes mellitus. *Intern. Med*. 2012;51(19):2763–6.