



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

### **PARTICIPACIÓN DEL COMPONENTE MESENQUIMAL EN LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS PRIMITIVAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Maestra en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Biol. Mireya Ramírez Florencio**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. María Antonieta Chávez González**  
**Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Susana Castro Obregón**  
**Instituto de Fisiología Celular, UNAM.**

**Dr. Juan José Montesinos Montesinos**  
**Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS.**

**Ciudad de México, enero, 2022.**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACyT y al área de salud del IMSS por el apoyo proporcionado para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. María Antonieta Chávez González por el tiempo y confianza brindada.

A la asesoría proporcionada por parte de mi comité tutor. Dra. Susana Castro, agradezco su tiempo y dedicación. Dr. Juan José Montesinos, agradezco sus amables recomendaciones.

A el apoyo proporcionado por mis compañeros de laboratorio de Células Troncales Leucémicas: Paty, Sandy, Mariana, Gaby, Axel, Dafne y Sergio. Gracias por sus consejos, por sus risas.

Agradezco a mis niñas, Adri, Mar y Miri, y a mis niños Kike y Juan Manuel, gracias por su apoyo siempre incondicional.

Finalmente, agradezco a mis padres y hermanos y a la pequeña Odette, quienes me inspiran siempre a dar lo mejor de mí.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en el laboratorio de Células Troncales Leucémicas.

# INDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
Microambiente de la médula ósea .....	5
Interacción de las HSPC con elementos de la BM .....	6
Las MSC en el mantenimiento de la hematopoyesis.....	8
Leucemia.....	10
Leucemia mieloide crónica.....	11
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>17</b>
<b>MÉTODO</b> .....	<b>18</b>
<b>Obtención de células primitivas hematopoyéticas y MSC a partir de BM</b> .....	<b>18</b>
Obtención de células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas) .....	19
Obtención de células estromales mesenquimales (normales y leucémicas).....	20
<b>Análisis inmunofenotípico de células primitivas hematopoyéticas normales y leucémicas. ...</b>	<b>21</b>
<b>Co-Cultivos sin contacto de MSC y células primitivas hematopoyéticas</b> .....	<b>21</b>
Conteo celular.....	22
Análisis inmunofenotípico de células primitivas hematopoyéticas en co-cultivo .....	22
Ensayo de unidades formadoras de colonias .....	23
<b>Identificación de la translocación BCR-ABL</b> .....	<b>23</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
<b>Caracterización de células estromales mesenquimales</b> .....	<b>24</b>
<b>Co-cultivos de HN y HL con MN y ML</b> .....	<b>26</b>
Número celular.....	26
Diferenciación .....	27
Expansión.....	32
Identificación de la translocación BCR-ABL .....	35
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>45</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>47</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BM	Médula Ósea
CML	Leucemia Mieloide Crónica
BMPRIA	Receptor de Proteínas Morfogénicas de Hueso Tipo IA
CFU	Unidades Formadoras de Colonias
CXCL12	Ligando C-X-C12
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
FBS	Suero Fetal Bovino
G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
HSC	Células Troncales Hematopoyéticas
HSPC	Células Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
Lin+	Linaje positivas
LSC	Células Troncales Leucémicas
LT-HSC	Células Troncales Hematopoyéticas de Largo Plazo
MSC	Células Estromales Mesenquimales
NFkB	Factor Nuclear kappa B
PTHrP	Receptor de la Hormona Paratiroidea
SCF	Factor de Células Troncales
TKI	Inhibidores de Tirosina Cinasa
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
PBS	Solución Salina de Fosfatos
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MN	Mesenquimales Normales
ML	Mesenquimales Leucémicas
HN	Hematopoyéticas Normales
HL	Hematopoyéticas Leucémicas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region-Abelson
PIGF	Factor de Crecimiento Placentario

## RESUMEN

La hematopoyesis se encuentra regulada por una serie de procesos en los que resultan fundamentales las interacciones que se mantienen entre células hematopoyéticas primitivas con los componentes del microambiente de la médula ósea. En este, las células estromales mesenquimales juegan un papel fundamental al regular el destino de estas poblaciones. Sin embargo, muy poco se sabe acerca del tipo de comunicación que se mantiene con células hematopoyéticas de enfermedades hematológicas como la leucemia.

En este sentido, el presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar mediante co-cultivos sin contacto, el efecto que tienen las células estromales mesenquimales en la regulación de células de leucemia mieloide crónica CD34+ Lin- y compararlo con la normalidad. Para ello se realizaron cuatro tipos de co-cultivos: hematopoyéticas normales (HN) con mesenquimales normales (MN) y mesenquimales leucémicas (ML), así como hematopoyéticas leucémicas (HL) con MN y ML. Como control se utilizaron células hematopoyéticas sembradas en ausencia de estroma.

Los resultados mostraron que, aunque no hubo contacto directo entre los co-cultivos, las células mesenquimales leucémicas tuvieron una mejor capacidad de soporte hematopoyético sobre las poblaciones de células HN, mientras que notablemente favorecieron la proliferación de las células HL. Interesantemente, una fracción de estas células conservó un inmunofenotipo primitivo, cuya funcionalidad fue evaluada mediante ensayos de unidades formadoras de colonias, observando que en co-cultivo, las células hematopoyéticas formaron un mayor número de colonias. Finalmente, mediante PCR se corroboró que las células hematopoyéticas leucémicas que se mantuvieron al término de los ensayos fueron positivas para la translocación BCR-ABL. Con estos hallazgos se concluye que la comunicación parácrina de células mesenquimales provenientes de un microambiente leucémico favorecen el mantenimiento y proliferación de células de leucemia mieloide crónica.

## INTRODUCCIÓN

La médula ósea (BM *del inglés, Bone Marrow*) es el sitio en donde se forman y desarrollan las células sanguíneas de los seres humanos después del nacimiento, a través de un proceso conocido como hematopoyesis (Crane et al., 2017).

El sistema hematopoyético se conforma principalmente de dos linajes, el linfoide y el mieloide. A partir del primero se forman los linfocitos B y T, las células asesinas naturales y las células dendríticas. Por otro lado, el linaje mieloide da lugar a granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, macrófagos, eritrocitos, megacariocitos, células cebadas y células dendríticas.

Todos estos tipos celulares son originados a partir de una población numéricamente reducida que es responsable de formar a los distintos linajes maduros. A esta población se le ha denominado células troncales hematopoyéticas (HSC *del inglés, Hematopoietic Stem Cells*) (Mukaida et al., 2017). Entre las características que definen a esta población podemos mencionar su capacidad de autorrenovación y su multipotencialidad (Doulatov et al., 2012).

El término autorrenovación se refiere a la capacidad de las HSC de autopropagarse, es decir, una vez divididas, al menos una de las células hijas conserva un estado indiferenciado, lo que favorece el mantenimiento del linaje troncal, a pesar de su bajo porcentaje celular (0.01% - 0.005% del total de las células presentes en la BM) (Mayani, 2009).

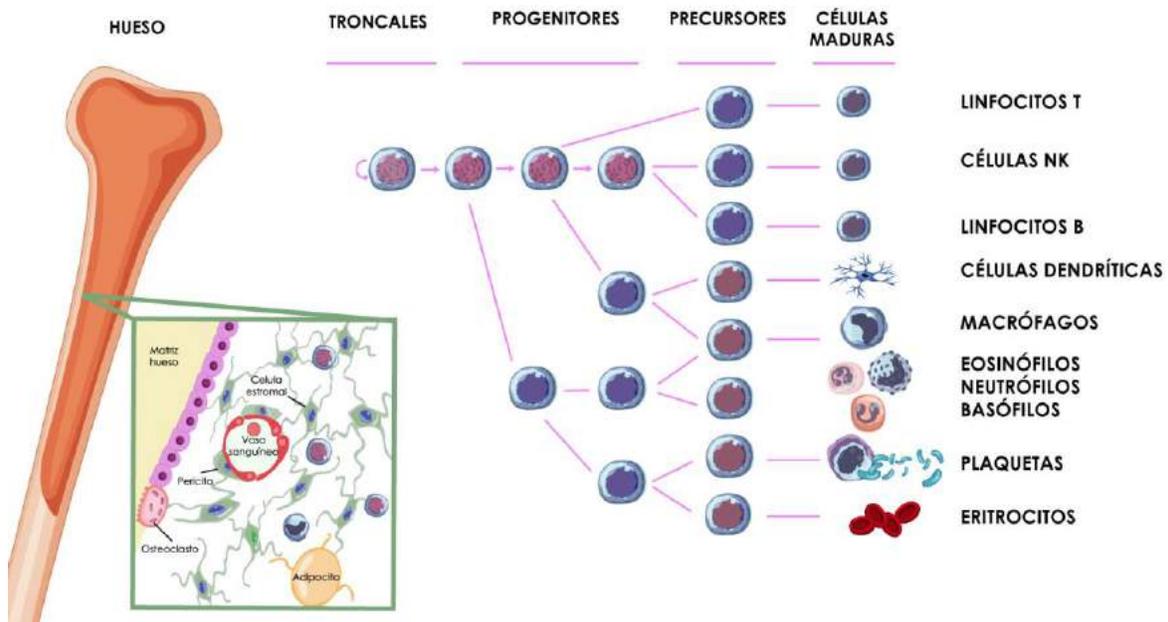
Por otro lado, la multipotencialidad es la capacidad que presentan las HSC para diferenciarse en varios tipos celulares. Así, las HSC llevan a cabo procesos de diferenciación que involucran la adquisición de características morfológicas y funcionales específicas. De este modo, el sistema hematopoyético se ha dividido para su estudio en cuatro compartimentos (Figura 1).

Inicialmente las HSC identificadas por el inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- se diferencian en progenitores hematopoyéticos CD34+CD38+Lin-, los cuales han perdido la capacidad de autorrenovación. Estas células pueden mantener un estado multipotencial, o bien, estar restringidas a dos o un solo linaje. Dentro de esta población, existen progenitores que tienen la capacidad de formar colonias hematopoyéticas, conocidos como unidades formadoras de colonias (CFU *del inglés, Colony Forming Units*) los cuales tienen un alto potencial proliferativo. De esta manera, aunque los progenitores corresponden a menos del 5% del total de las células de la BM, son capaces de incrementar considerablemente el número celular hematopoyético (Mayani, 2009). En conjunto, las poblaciones troncales y progenitoras constituyen a las células hematopoyéticas más primitivas.

Progresivamente, los progenitores darán lugar al compartimento precursor. En este, las células adquieren características morfológicas de un linaje particular, sin embargo, mantienen un estado inmaduro. Este grupo constituye más del 90% de las células residentes en la BM.

Finalmente, los precursores se convertirán en células maduras completamente diferenciadas, es decir, linaje positivas (Lin+) (Saldívar-Santoyo & Flores-Guzmán, 2013) las cuales saldrán de la BM para entrar a la sangre y cumplir funciones específicas.

Dado que las células primitivas hematopoyéticas (HSPC *del inglés, Hematopoietic Stem Progenitor Cells*) se encuentran en el eslabón más alto de la jerarquía hematopoyética, todos los procesos que llevan a cabo deben de estar estrictamente regulados ya que pueden impactar en el resto de las poblaciones. Sin embargo, se ha demostrado que su destino no solo depende de las características intrínsecas de los compartimentos hematopoyéticos que las conforman, sino que además participan otros componentes, que en conjunto constituyen el microambiente de la BM (Calvi et al., 2003; Chávez-González et al., 2009; Mukaida et al., 2017).



**Figura 1.** Jerarquía hematopoyética. El proceso de hematopoyesis se origina a partir de células troncales hematopoyéticas que de forma gradual se van diferenciando en progenitores hematopoyéticos. Estos darán lugar a precursores que finalmente se convertirán en células maduras completamente diferenciadas con funciones específicas (Modificado de Pelayo, 2011).

### Microambiente de la médula ósea

La BM es un tejido esponjoso localizado en el interior del hueso que presenta una arquitectura perfectamente definida y organizada, la cual se encuentra constituida por elementos celulares y no celulares. Dentro de los primeros, podemos mencionar a los osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales, células estromales mesenquimales (*MSC del inglés, Mesenchymal Stromal Cells*), adipocitos, células de Schwann, etc. Con relación a los componentes no celulares se incluyen: los elementos de la matriz extracelular, factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas etc.

Todos estos componentes mantienen estrecha comunicación con las HSPC, las cuales a través de interacciones por contacto directo o mediante factores solubles, proveen de señales regulatorias para su autorrenovación, mantenimiento, proliferación y diferenciación.

Con base en lo anterior, se ha sugerido que las HSPC no se encuentran de forma azarosa en BM, sino que se localizan en regiones específicas, las cuales proveen de señales regulatorias que pueden modificar el comportamiento celular.

### **Interacción de las HSPC con elementos de la BM**

Los primeros estudios enfocados en localizar a las HSPC en modelos murinos, sugerían que esta población se encontraba cercana a los osteoblastos (unidades formadoras de hueso localizadas a lo largo de la superficie endosteal, particularmente en la región trabecular). Estos hallazgos incitaban a suponer que los osteoblastos podrían estar asociados a la regulación de las HSPC, dado que podrían mantener comunicación a través del contacto directo o mediante la secreción de factores solubles útiles para su mantenimiento (Brown & Gatter, 1993). Esto dio lugar a que a inicios del siglo XXI se llevaran a cabo estudios para conocer el papel de los osteoblastos en el mantenimiento de las HSPC.

En 2003 en un estudio realizado por Calvi y colaboradores, se utilizó un modelo murino en el que se activó el receptor de la hormona paratioridea (PTHrP *del inglés, Parathyroid Hormone Receptor*) en células formadoras de hueso. A partir de estos ensayos, detectaron un incremento en el número celular de osteoblastos que a su vez se correlacionó con un aumento en la población de HSC (Calvi et al., 2003).

En un estudio similar realizado por Zhang en el mismo año, se encontró que al inactivar en osteoblastos el receptor de Proteínas morfogénicas de hueso tipo IA (BMPRIA), el cual conduce a la muerte de osteoblastos por apoptosis, había un aumento en el número celular de esta población, lo que nuevamente se asoció a un incremento en la población de HSC. Es de resaltar que estas alteraciones no modificaron el número de progenitores hematopoyéticos (Zhang et al., 2003). En conclusión, ambos trabajos demostraron que los osteoblastos son un componente regulador de las HSC *in vivo*.

De manera controversial, en 2005 un grupo de investigadores probó que la Osteopontina liberada por osteoblastos, disminuía considerablemente el número de HSC en modelos murinos (Stier et al., 2005). Este grupo propuso que la Osteopontina podría unirse a receptores presentes en las células hematopoyéticas, constituyendo un estímulo pro-apoptótico. En conjunto, estas evidencias sugieren que los factores producidos por una misma población celular pueden regular de manera opuesta el número de HSC.

En años más recientes, al evaluar las moléculas CXCL12 (*del inglés, C-X-C Motif Chemokine Ligand 12*) y SCF (*del inglés, Stem Cell Factor*) en distintas poblaciones celulares, se observó que los osteoblastos no expresaban SCF y que CXCL12 era secretado en muy bajas concentraciones. Sin embargo, las células endoteliales y mesenquimales expresaban estas moléculas en mayor medida, sugiriendo que ambos tipos celulares podrían tener un papel relevante en la regulación de las HSC (Ding et al., 2012). Con relación a lo anterior, en un estudio utilizando microscopía confocal en un modelo murino, se observó que más del 80% de HSC se encontraban cercanas a la región perivascular de la BM y en menor medida a la región cortical del hueso (Crane et al., 2017; Morrison & Scadden, 2014). Con estos datos se concluyó que ambas poblaciones celulares podrían tener un papel relevante en el mantenimiento de las HSC.

Con relación a las células endoteliales, las cuales dan lugar a la vasculatura de la BM (conformada principalmente por arteriolas, capilares y sinusoides), se ha descrito que son capaces de secretar diferentes factores que estimulan la autorrenovación de las HSC (Brown & Gatter, 1993). Ejemplo de ello fue el trabajo realizado por Butler y colaboradores en donde observaron que factores de crecimiento derivados de células endoteliales favorecían la autorrenovación *in vitro* de las HSC (Butler et al., 2010) . Además, la Pleiotropina secretada por células endoteliales fue capaz de regular la autorrenovación y la retención de HSC *in vivo* (Himburg et al., 2012), lo que llevó a la conclusión de que las células endoteliales son un componente regulador de la hematopoyesis.

De manera relevante en el 2012, con la finalidad de detectar qué tipos celulares proveían de factores para el mantenimiento de las HSPC, se observó en un modelo *in vivo* que las moléculas CXCL12 y SCF eran secretadas por las células endoteliales y por MSC. Sin embargo, estas últimas producían 100 veces más CXCL12 en comparación con las células endoteliales, lo que sugería que las MSC podrían ser un componente celular importante en la regulación de las HSPC (Ding et al., 2012).

### **Las MSC en el mantenimiento de la hematopoyesis**

Las MSC son un tipo celular multipotencial que *in vitro* tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Dada la gran heterogeneidad celular que presentan estas células, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT del inglés, *International Society for Cellular Therapy*) las ha definido como células que se adhieren al plástico en cultivo, que expresan los marcadores CD73, CD90, y CD105, pero carecen de los marcadores CD14, CD34, CD45, CD79 $\alpha$ , y HLA-DR (Dominici et al., 2006).

En los últimos años se ha demostrado que las MSC cumplen un papel importante en la regulación de las HSPC, dado que expresan y secretan moléculas que favorecen la autorrenovación y el mantenimiento de las HSC (Ding et al., 2012), así como la proliferación y expansión de las células progenitoras (Fajardo-Orduña et al., 2016). Entre los factores que son secretados por las MSC podemos mencionar CXCL12, SCF, LIF, M-CSF, GM-CSF, Ang-1, HGF, VEGF, TGF-B, PIGF, IL-6, TPO, MMP-9, CCL2, etc (Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006).

Uno de los primeros estudios en los que se evaluó el papel de las MSC en el mantenimiento de las HSC fue el realizado por Omatsu y colaboradores. Utilizando un modelo murino, encontraron que al deletar de forma condicional las moléculas CXCL12 y SCF en MSC, la población de HSC se reducía y entraba a un estado de

quiescencia. Además detectaron la expresión temprana de genes del linaje mieloide (Omatsu et al., 2010).

Estos resultados fueron similares a los de otro estudio, en el que al depletar SCF en células de estroma positivas al receptor de leptina, se eliminó la población de HSC, concluyendo que estas células expresaban factores que promueven el mantenimiento de dicha población hematopoyética (Ding et al., 2012).

Años más tarde, se confirmó mediante análisis de imágenes de BM murina que más del 90% de HSC Hoxb5+ con la capacidad de recapitular la hematopoyesis en ratones secundarios irradiados (LT-HSC *del inglés, Long Term Hematopoietic Stem Cells*) estaban en contacto directo con células estromales perivasculares (Chen et al., 2016).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que las MSC son células indispensables en el mantenimiento de las HSC en modelos murinos. Sin embargo, aunque se asume que el microambiente en roedores podría ser similar en humanos, muy poco se ha descrito respecto a este último dada la pequeña proporción en la que se encuentran ambas poblaciones celulares.

Entre los trabajos que han demostrado el papel de las MSC de BM humana en el mantenimiento, proliferación y diferenciación de las HSPC se puede mencionar el realizado por Van Overstraeten-Schlögel en 2006, en el que se observó que los factores secretados por MSC de BM *in vitro* soportan el mantenimiento de la población CD34+ proveniente de cordón umbilical, al realizar co-cultivos con y sin contacto.

En 2012, se reportó que las HSPC CD34+ obtenidas de biopsias de BM humana mantenían contacto con MSC CD271+ (Flores-Figueroa et al., 2012) lo cual reafirmó el papel que podrían jugar las MSC en la regulación de estas poblaciones hematopoyéticas en condiciones normales en humanos.

Adicionalmente, estudios en los que se realizaron co-cultivos de MSC en presencia de HSPC provenientes de sangre periférica y cordón umbilical se observó que las MSC favorecieron el mantenimiento de las células hematopoyéticas de sangre periférica, e interesantemente, en el caso de las células de cordón umbilical, se incrementó su población celular. (Fajardo-Orduña et al., 2016; Ito et al., 2015). Cabe resaltar que, en ambos estudios las MSC se encontraban en contacto directo con las HSPC.

Estas evidencias sugieren que el microambiente hematopoyético resulta crucial en la regulación de la hematopoyesis. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos por los cuales las HSPC son reguladas, nos proporciona un mejor entendimiento de los procesos de homeostasis del tejido hematopoyético (Crane et al., 2017) tanto en condiciones normales como en distintas patologías, dentro de las que se incluyen las leucemias.

## **Leucemia**

Las leucemias son un grupo heterogéneo de malignidades hematológicas que se caracterizan por un incremento en el número de leucocitos en circulación. De acuerdo a la velocidad de progresión de la enfermedad se pueden dividir en leucemias agudas o crónicas. En la primera, se presenta un rápido desarrollo de la enfermedad en la que la mayoría de las células afectadas no alcanzan un estado de diferenciación completo. Mientras que en las leucemias crónicas, las células son capaces de alcanzar un estado de maduración y con ello llevar a cabo sus funciones normales, ocasionando que la enfermedad se desarrolle más lentamente. Sin embargo, con el paso del tiempo pueden acumularse alteraciones que favorezcan su transición a una fase aguda.

Adicionalmente, las leucemias se pueden clasificar de acuerdo al linaje hematopoyético que se vea afectado, pudiendo distinguir así entre leucemia

linfoblástica, si las células afectadas son de linaje linfoide o mieloblástica si son de linaje mieloide.

Cada uno de los tipos de leucemia presenta características particulares. Sin embargo, la leucemia mieloide crónica (CML del inglés, Chronic Myeloid Leukemia) presenta una translocación que facilita considerablemente su diagnóstico, lo que la hace un buen modelo biológico para el estudio de las interacciones del microambiente y las células hematopoyéticas.

### **Leucemia mieloide crónica**

La leucemia mieloide crónica es un padecimiento hematológico en el que las células hematopoyéticas cancerosas de linaje mieloide se expanden, ocasionando un aumento en el número celular hematopoyético que poco a poco irá desplazando a las células sanguíneas normales (Fialkow et al., 1977; Petzer et al., 1996).

En Estados Unidos, esta enfermedad representa el 15% del total de las leucemias en adultos, con una media de edad al diagnóstico de 64 años. La Sociedad Americana contra el Cáncer estima que para el 2021 serán diagnosticados 21,250 nuevos casos y que alrededor de 4,320 personas podrían fallecer por esta enfermedad. (Granatowicz et al., 2015; American Cancer Society's, 2021). Específicamente en México, no se cuenta con datos precisos de incidencia, dado que no existe un registro nacional de este padecimiento.

La CML se encuentra específicamente asociada a una alteración genética comúnmente conocida como cromosoma Philadelphia, la cual se produce por una translocación entre regiones de los genes Bcr y Abl localizados en los cromosomas 22 y 9 respectivamente. Esta translocación da lugar a una proteína quimérica con actividad cinasa sobre tirosinas que activa una serie de vías de transducción de señales de manera permanente (Druker et al., 2008; Quintás-Cardama et al., 2009),

promoviendo la supervivencia y proliferación de las células leucémicas (Sawyers, 1999; Van Etten, 2004).

Desde el punto de vista clínico, la CML es una enfermedad trifásica, en donde las células leucémicas irán adquiriendo anomalías genéticas adicionales con el tiempo, dando lugar a la progresión de la enfermedad desde una fase crónica inicial a una fase acelerada avanzada, pudiendo culminar en una crisis blástica (Perrotti et al., 2010).

La fase crónica puede durar de tres a cinco años (Granatowicz et al., 2015) y en esta se diagnostican el 85% de los pacientes (Faderl et al., 1999). El 40% de estos son asintomáticos, basando el diagnóstico solamente en un conteo anormal de células sanguíneas (Sawyers, 1999). Dentro de los síntomas que los pacientes pueden llegar a presentar se incluyen: anemia, fatiga, pérdida de peso, anorexia y saciedad temprana. La esplenomegalia es un hallazgo común en el examen físico y está presente en más de la mitad de los pacientes (Granatowicz et al., 2015). En esta fase, las células sanguíneas pueden mantener su capacidad de diferenciarse normalmente hasta progresar a la fase acelerada (Bhatia, 2013) en la que se comienzan a detectar células inmaduras en circulación. Los criterios diagnósticos de esta fase son variables y su duración puede ser de semanas a años. Finalmente, la crisis blástica se caracteriza por tener más del 30% de células inmaduras en circulación sanguínea e incluso por infiltrados extramedulares asociados con esplenomegalia. En esta fase, la supervivencia de los pacientes se reduce a meses e incluso semanas.

El descubrimiento de la proteína BCR-ABL ha permitido desarrollar fármacos inhibidores de cinasas de tirosina (TKI, *del inglés, Tyrosine Kinase Inhibitor*) con lo cual se ha revolucionado el tratamiento de la CML, pasando de una enfermedad fatal a una enfermedad crónica en la mayoría de los pacientes (Druker et al., 2008; Granatowicz et al., 2015). Antes de 1983, la supervivencia a 8 años de los individuos diagnosticados con CML era de menos del 15%. Sin embargo, con la

implementación del tratamiento basado en interferón-alfa y el trasplante alogénico de células troncales hematopoyéticas, de 1983 al 2000 la sobrevida mejoró de 42 a 65%. Posteriormente, cuando se introdujo a la clínica la terapia con TKI en 2001, la sobrevida a ocho años paso a 87%, la cual sigue mejorando con el uso de inhibidores de BCR-ABL de segunda y tercera generación (Kantarjian et al., 2012).

Sin embargo, aún existe un grupo de pacientes que presentan poca tolerancia, pérdida de respuesta o resistencia al tratamiento (Quintás-Cardama et al., 2009). Este último es asociado generalmente al desarrollo de mutaciones en el dominio cinasa de la proteína BCR-ABL (Schmidt et al., 2011). Adicionalmente, aunque estos inhibidores logran la remisión de la CML en la mayoría de los pacientes, el tratamiento falla en erradicar a las células troncales leucémicas (LSC *del inglés, Leukemic Stem Cells*) (Schmidt et al., 2011) debido a que se encuentran en un estado de quiescencia (Doulatov et al., 2012; Moreno-Lorenzana et al., 2016). Por ello, el estudio de la enfermedad en cuanto a su permanencia en BM y a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la población troncal adquiere relevancia.

Desde el punto de vista hematopoyético, en la CML al igual que en la normalidad, las células sanguíneas leucémicas se originan de un tipo celular con capacidad de autorrenovación, lo que las define como LSC. Estas células comparten parcialmente el inmunofenotipo con las células normales, es decir, son CD34+CD38-Lin-, y hasta hace apenas algunos años, se han propuesto marcadores que permiten distinguir a las LSC de su contraparte normal. Entre estos se encuentran IL-1RAP+, CD26+ y CD25+ (Herrmann et al., 2014; Jaras et al., 2010; Sadovnik et al., 2016).

Las LSC son capaces de autorrenovarse, proliferar y diferenciarse durante la fase crónica bajo la influencia de señales intrínsecas, tal como fue demostrado en 2011 cuando se encontró que las LSC de CML secretaban de forma autócrina GM-CSF, G-CSF, IL-6 y TNF- $\alpha$ , citocinas que son utilizadas por las LSC para activar la vía de señalización NF $\kappa$ B. Esto llevó a sugerir que estas citocinas juegan un papel clave

en el auto-mantenimiento de las LSC, pero que a su vez podrían estar afectando el microambiente de la BM (Gallipoli et al., 2013; Reynaud et al., 2011). Lo anterior se demostró al encontrar que las citocinas proinflamatorias y quimiocinas provenientes de células tumorales modifican el comportamiento de las células del microambiente (El-Badawy et al., 2017).

Esto ha sido objeto de estudio en los últimos años, puesto que ha surgido gran interés por entender las interacciones que mantienen las HSPC leucémicas con las diferentes células que conforman su microambiente.

Por lo tanto, dado que las MSC son uno de los principales componentes de la BM y considerando que en la normalidad secretan diversos factores que regulan el destino de las células hematopoyéticas, varios investigadores han evaluado el efecto biológico de las MSC sobre las células hematopoyéticas tumorales.

En el caso de la leucemia mieloide aguda, se ha observado que las MSC normales son capaces de mantener en co-cultivo a las HSPC leucémicas, y más aún, si se toman células en estado G0 del ciclo celular y posteriormente se trasplantan en ratones inmunosuprimidos, éstas son capaces de iniciar la enfermedad (Ito et al., 2015).

En un estudio más reciente en el que utilizaron HSPC de pacientes con leucemia linfoblástica aguda, se observó que al adicionar medio condicionado de MSC normales que fueron previamente cultivadas con células leucémicas, se incrementó la proliferación de células hematopoyéticas CD34+ de cordón umbilical. Interesantemente, una proporción de estas células entró a las fases S/G2/M del ciclo celular, mientras que el 50% de la población inicial mantuvo su inmunofenotipo primitivo (Vernot et al., 2017).

En el caso de la CML se ha reportado que cuando están en contacto, las MSC de BM normal mantienen un número reducido de células leucémicas CD34+ en

comparación con co-cultivos de células primitivas hematopoyéticas normales (Zhang et al., 2013).

Los hallazgos descritos con anterioridad sugieren que las MSC son capaces de regular a las células primitivas hematopoyéticas tanto normales como leucémicas a través del contacto directo o mediante factores presentes en medios condicionados. Sin embargo, dado que las células leucémicas pueden afectar su microambiente celular circulante, resulta relevante realizar estudios en los que se evalúe el comportamiento de las HSPC de CML en presencia de MSC provenientes de pacientes con la misma enfermedad. Esto permitirá contrastar si las células mesenquimales leucémicas tienen el mismo efecto sobre las células hematopoyéticas leucémicas o si existen diferencias con relación a su contraparte normal de modo que podamos tener un mejor entendimiento del papel biológico del microambiente leucémico.

El presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar el papel de las MSC sobre el mantenimiento, diferenciación y expansión de células primitivas de CML en ausencia de contacto directo.

## JUSTIFICACIÓN

La BM es el sitio en donde se lleva a cabo la hematopoyesis. Las células responsables de dar lugar a las primeras etapas de este proceso son las HSPC, las cuales no se encuentran de forma azarosa en BM, si no que se localizan en sitios específicos. Se ha reportado que las MSC son capaces de regular el mantenimiento de las HSPC en condiciones normales. Sin embargo, muy poco se sabe acerca del papel de las MSC en la regulación de las HSPC en enfermedades hematológicas como lo es la CML. En este sentido, el presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar el papel que cumplen las MSC en la regulación de las HSPC leucémicas en cultivos *in vitro* en ausencia de contacto y compararlo con su contraparte normal.

## **HIPÓTESIS**

Las MSC leucémicas favorecerán la proliferación, diferenciación y expansión de las células primitivas leucémicas en co-cultivos sin contacto.

## **OBJETIVO**

Evaluar el efecto de co-cultivos sin contacto entre MSC de CML y células primitivas hematopoyéticas leucémicas

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener MSC y células primitivas hematopoyéticas a partir de muestras de individuos hematológicamente sanos y de pacientes con CML.
- Caracterizar las MSC provenientes de individuos hematológicamente sanos y pacientes con CML.
- Evaluar mediante co-cultivos sin contacto entre células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas) y MSC (normales y leucémicas), los procesos de proliferación, diferenciación y expansión.
- Evaluar la permanencia de la translocación Bcr-Abl en células leucémicas durante el co-cultivo.

## MÉTODO

### Obtención de células primitivas hematopoyéticas y MSC a partir de BM

Las muestras de BM de individuos hematológicamente sanos se obtuvieron en el Hospital General Regional No.2 Villa Coapa, IMSS a partir de cirugías de cadera en donde se realizaron raspados de la cresta ilíaca con fines de ajuste de prótesis, mientras que las muestras de pacientes con CML fueron obtenidas a partir de una fracción del aspirado de BM utilizado para el diagnóstico clínico de pacientes atendidos en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. En ambos casos, previo a la toma de muestra, los individuos firmaron una carta de consentimiento informado. Los criterios de selección de muestras se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de inclusión y eliminación de muestras de individuos hematológicamente sanos y de pacientes con CML.

Muestras	Inclusión	Eliminación
Pacientes con CML	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Diagnóstico clínico de CML en fase crónica.</li><li>○ Sin tratamiento con TKI.</li><li>○ Carta de consentimiento informado firmado.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Muestras que no cumplan con el número celular requerido para el estudio.</li><li>○ Muestras con baja viabilidad.</li></ul>
Individuos hematológicamente sanos	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Individuos sin antecedentes de enfermedades neoplásicas o hematológicas sometidos a cirugía de prótesis de cadera.</li><li>○ Carta de consentimiento informado firmado.</li></ul>	

Las muestras de sujetos hematológicamente sanos se colectaron en tubos de 50ml con 15ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 3% de suero fetal bovino (FBS *del inglés, Fetal Bovine Serum*), 1% de penicilina-estreptomicina

y 0.2% heparina. En el caso de las muestras de CML, se tomaron con jeringas de 10ml impregnadas con heparina.

### Procesamiento de muestras

Para la obtención de células mononucleares (normales y leucémicas) se adicionaron 3ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) por cada 4ml de muestra para posteriormente realizar un gradiente de densidad por centrifugación siguiendo el protocolo Ficoll-Paque Plus.

Con la finalidad de evaluar la viabilidad celular, las células se tiñeron con azul de tripano y se contaron utilizando una cámara de Neubauer.

### Obtención de células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas)

A partir de células mononucleares de muestras normales y leucémicas, se obtuvo una fracción celular enriquecida en células CD34+lin- mediante selección negativa (StemCell Technologies). Los antígenos de linaje utilizados para el enriquecimiento se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Antígenos de linaje hematopoyético presentes en el coctel de enriquecimiento de selección negativa.

Antígenos	Células que presentan el antígeno
Anti-CD2	Linfocitos y células NKs
Anti-CD3	Linfocitos T
Anti-CD11b	Granulocitos, monocitos, macrófagos células dendríticas
Anti-CD11c	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas
Anti-CD14	Monocitos y macrófagos
Anti-CD16	Monocitos
Anti-CD19	Linfocitos B
Anti-CD24	Linfocitos B y granulocitos inmaduros
Anti-CD56	Células NK
Anti-CD66b	Neutrófilos
Anti-Glicoforina A	Eritrocitos

Para efectuar esta selección, las muestras se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente con el coctel de anticuerpos primarios, y posteriormente se adicionaron perlas magnéticas. Las muestras se trasladaron a una columna inmunomagnética StemSep con la finalidad de recuperar a las células CD34+ Lin-, las cuales fueron centrifugadas para eliminar el sobrenadante. La fracción celular enriquecida de manera independiente tanto de células primitivas hematopoyéticas normales, como para leucémicas (las cuales en adelante serán referidas como HN y HL respectivamente), fueron resuspendidas en medio basal StemSpan a 4°C hasta su uso.

#### Obtención de células estromales mesenquimales (normales y leucémicas)

Una fracción de células mononucleares tanto de muestras normales como leucémicas se resuspendió en medio DMEM, suplementado con SFB al 3% y penicilina-estreptomicina al 1%, para posteriormente sembrarse en cajas Petri de 10cm, en donde se mantuvieron por cuatro días a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, las células en suspensión se removieron mediante cambio de medio y una vez que las células adherentes alcanzaron el 80% de confluencia, las células se despegaron con tripsina al 0.05% en EDTA (*del inglés, Ethylene diamine tetra acetic*) 0.53 mM. Estas se resembraron a una densidad de 2X10<sup>3</sup> células en placas de 6 pozos.

La identidad de esta población celular se verificó mediante citometría de flujo evaluando la presencia de los marcadores CD73, CD90 y CD105 y la ausencia de CD45 y CD31. Además, se determinó su capacidad de diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, mediante el uso de medios de diferenciación específicos en donde se verificó la positividad para Fosfatasa alcalina, tinción de lípidos con rojo oleoso y presencia de mucopolisacaridos mediante tinción con azul alcían, respectivamente (StemCell Technologies). En adelante, las MSC provenientes de muestras primarias normales o leucémicas serán denominadas como MN y ML respectivamente.

## **Análisis inmunofenotípico de células primitivas hematopoyéticas normales y leucémicas.**

Para verificar el enriquecimiento celular, las células hematopoyéticas tanto normales como leucémicas fueron evaluadas por citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD34 y CD38, así como los marcadores de linaje CD14 y CD10.

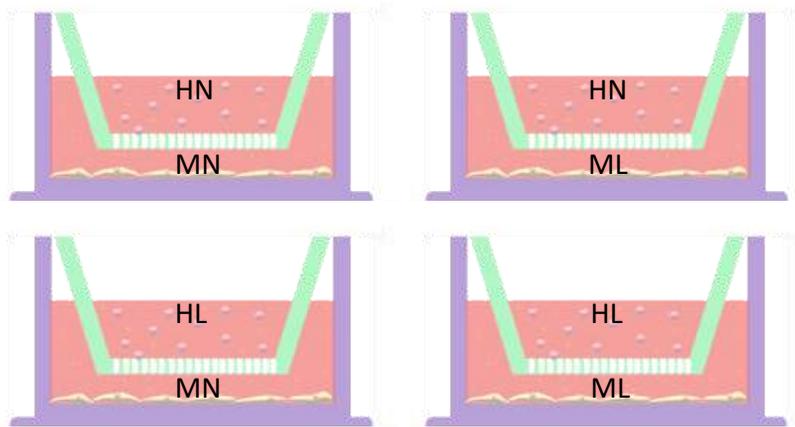
Para ello, se tomaron  $5 \times 10^4$  células que previamente fueron fijadas con paraformaldehído al 3%. Posteriormente, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS al 3% de FBS y se incubaron por 30 minutos a 4°C protegidas de luz con los anticuerpos correspondientes. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron con 500  $\mu$ l de PBS con 3% de FBS. Las células marcadas se evaluaron en un citómetro FACS Verse, analizando un mínimo de 10,000 eventos.

## **Co-Cultivos sin contacto de MSC y células primitivas hematopoyéticas**

Para determinar el efecto de las MN y ML sobre las HN y HL, ambos grupos celulares fueron co-cultivados utilizando insertos transwell con la finalidad de impedir las interacciones por contacto celular. Para ello 35,000 células MN o ML se sembraron previamente en placas de 12 pozos hasta permitir su adherencia y confluencia. Posteriormente se colocó un inserto transwell sobre el que se adicionaron  $1 \times 10^5$  células HN o HL. De esta manera se formaron 4 tipos de co-cultivos distintos (Figura 2).

Para todos los experimentos se utilizaron como control HN y HL cultivadas en ausencia de estroma.

Todos los experimentos se mantuvieron por 5 y 10 días con medio StemSpan carente de FBS y citocinas. El medio condicionado de cada co-cultivo se colectó, filtró y almacenó a -70°C para su evaluación en futuros estudios.



**Figura 2. Tipos de co-cultivos sin contacto formados con células hematopoyéticas CD34+ normales (HN) o leucémicas (HL) y MSC de BM tanto normales (MN) como leucémicas (ML).** Se sembraron en placas de 12 pozos  $3.5 \times 10^4$  MSC normales o leucémicas en medio StemSpan hasta permitir su adherencia. Posteriormente sobre insertos transwell se colocaron  $1 \times 10^5$  células hematopoyéticas enriquecidas en CD34, tanto normales como leucémicas. Todos los co-cultivos se realizaron en ausencia de suero y citocinas.

### Conteo celular

Las células hematopoyéticas normales y leucémicas de cada uno de los co-cultivos se contaron en los días 5 y 10 mediante el método de exclusión por azul de tripano utilizando una cámara de Neubauer.

### Análisis inmunofenotípico de células primitivas hematopoyéticas en co-cultivo

Para conocer el efecto de los co-cultivos en la diferenciación de las células hematopoyéticas, se evaluaron los marcadores de superficie presentes al inicio y durante los días del co-cultivo. Para ello, una proporción de células de los diferentes co-cultivos se lavaron con PBS con 3% de FBS, para luego ser incubadas en completa oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos con los anticuerpos CD45, CD34, CD38, CD14, y CD10. Pasado este tiempo se realizó un lavado con PBS con 3% de FBS. Finalmente, las células se evaluaron mediante citometría de flujo multiparamétrica. Los datos se analizaron utilizando el Software FlowJo X10.0.7.

### Ensayo de unidades formadoras de colonias

Con la finalidad de evaluar la funcionalidad de las células primitivas hematopoyéticas después del co-cultivo con MSC, se realizaron ensayos de Células Formadoras de Colonias (CFU). Para esto, se utilizaron  $3 \times 10^3$  células HN y HL provenientes de los días 5 y 10 de co-cultivo. Estas fueron sembradas en medio MethoCult en el que se mantuvieron por 14 días a  $36^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ . Al término del ensayo se determinó el número y el tipo de colonias obtenidas.

Como control se utilizaron células CD34+Lin- de BM normal o leucémica que fueron mantenidas en ausencia de estroma y citocinas, que también fueron cultivadas en MethoCult en las condiciones antes descritas.

### Identificación de la translocación BCR-ABL

Para evaluar la permanencia de la población leucémica en el transcurso de los co-cultivos, se evaluó la presencia del transcrito BCR-ABL en las células HL mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) anidada a los días 0, 5 y 10. Para ello, primeramente, se realizaron extracciones de RNA mediante la técnica Trizol-Cloroformo, con el que se generó el cDNA mediante transcripción inversa. Posteriormente se realizaron PCR punto final utilizando los primers: 5'-GGAGTGTTTCTCCAGACTGTTG-3', 5'-ACAAGAGGGAGGTGATACGTGCGAG-3', bajo las siguientes condiciones:  $96^\circ\text{C}$ , -5 min, ( $94^\circ\text{C}$ , -30 seg,  $60^\circ\text{C}$ , -1 min,  $72^\circ\text{C}$ , -1 min) por 35 ciclos y  $72^\circ\text{C}$ , -10 min. Las muestras se sometieron a una segunda amplificación, con la finalidad de determinar de manera más robusta la presencia de la translocación. En la segunda ronda se utilizaron los primers: 5'-TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT-3', 5'-GGTTCGTTATGTAGTGCGGTCAGTTG-3', utilizando las siguientes condiciones:  $96^\circ\text{C}$ , 5 min, ( $94^\circ\text{C}$ , -30 seg,  $61^\circ\text{C}$ , -1 min,  $72^\circ\text{C}$ , -1 min) por 30 ciclos y  $72^\circ\text{C}$ , -10 min. Como control positivo, se utilizó el RNA de la línea celular de CML K562.

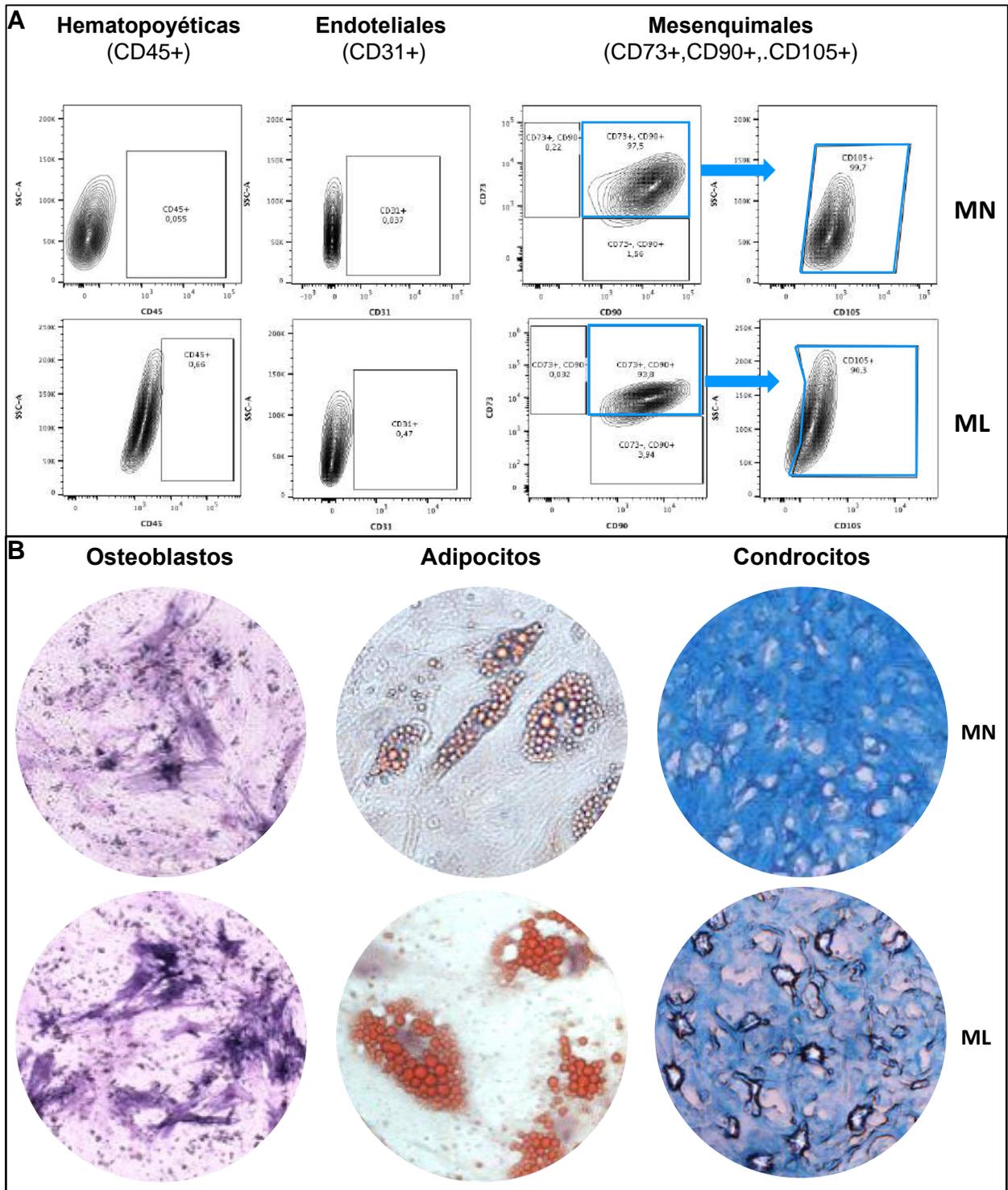
## RESULTADOS

Considerando que las MSC son uno de los principales componentes no hematológicos de la BM y dado que se ha sugerido que están involucradas en la regulación de la hematopoyesis normal, el interés inicial de este proyecto fue determinar si las MSC participan en el mantenimiento de las células de CML.

Para ello, se propuso el uso de un modelo *in vitro* mediante co-cultivos sin contacto entre MSC y células primitivas hematopoyéticas provenientes de muestras primarias de BM humana, tanto de individuos hematológicamente sanos, como de pacientes con CML.

### **Caracterización de células estromales mesenquimales**

Dado que los criterios de obtención de las MSC se basan en que son células adherentes al plástico, con morfología fibroblastoide, positivas para los marcadores CD73, CD90 y CD105, así como negativas para CD45 y CD31, se realizó un análisis inmunofenotípico por citometría de flujo de las células que se obtuvieron a partir de los cultivos primarios y que provenían tanto de BM normal como leucémica. Para ello fueron utilizadas células MN y ML de BM en pasajes 3 y 4. De esta manera se determinó que más del 95% de las células presentes en los cultivos eran MSC (Figura 3A). El segundo criterio utilizado para caracterizar a esta población consistió en diferenciar a las células en adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Figura 3B), observando que acorde con lo descrito en la literatura, las células se diferenciaron a los linajes esperados. La capacidad de diferenciación osteogénica se determinó por la detección de fosfatasa alcalina teñida en azul oscuro. La presencia de adipocitos fue detectada por la tinción de vacuolas lipídicas con rojo oleoso. Finalmente, la diferenciación condrogénica se evaluó por la tinción de glucosaminoglicanos presentes en células de condrocitos.



**Figura 3. Caracterización de células estromales mesenquimales.** Células Estromales Mesenquimales provenientes de Médula Ósea Normal (MN) y Médula Ósea de sujetos con CML (ML) caracterizadas por inmunofenotipo (A) y por su capacidad de diferenciación (B). Más del 95% de las células corresponden a células CD45-, CD31- que co-expresan los antígenos CD73, CD90 y CD105. Las células fueron capaces de diferenciarse a los linajes osteoblástico, adipogénico y condrogénico. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

## **Co-cultivos de HN y HL con MN y ML**

Para evaluar si las MSC (provenientes de sujetos sanos, así como de pacientes con CML) ejercen algún efecto sobre las células primitivas hematopoyéticas (normales o leucémicas), las diferentes poblaciones se mantuvieron en co-cultivos libres de contacto y en ausencia de factores adicionales como FBS y citocinas.

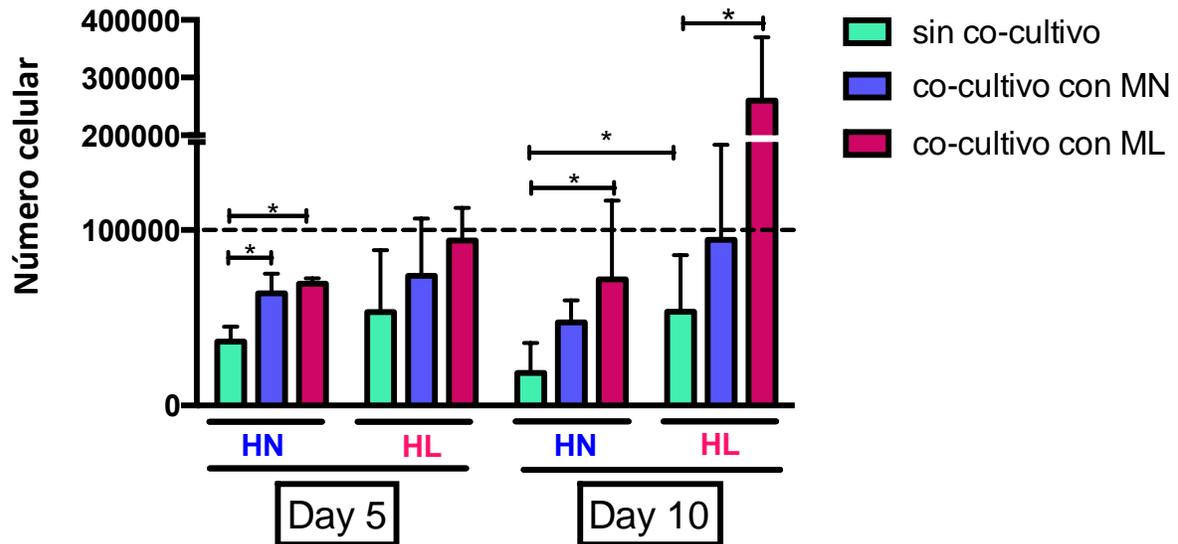
Para esto, se sembraron células hematopoyéticas CD34+Lin- sobre capas confluentes de células estromales mesenquimales separadas por insertos transwell. Los cultivos permanecieron por 10 días en ausencia de FBS y citocinas. A los días 5 y 10 de cultivo, se evaluó el número celular, así como los procesos de diferenciación y la expansión.

### **Número celular**

Los resultados obtenidos después de evaluar el número celular a los días 5 y 10 de cultivo, mostraron que todas las poblaciones hematopoyéticas se redujeron con relación a las 100 000 células sembradas inicialmente (Figura 4). No obstante, esta reducción fue mucho mayor cuando las células permanecieron en ausencia del co-cultivo con MN o ML. Aunado a lo anterior, los resultados indican que mientras las HN se redujeron a lo largo del tiempo en presencia de MN, al estar en co-cultivo con ML, su número se mantuvo e incluso después de 10 días el total de células era muy semejante al inicialmente sembrado.

Interesantemente, las células HL lograron mantener un mayor número celular en cualquier condición de co-cultivo, incluso permanecieron cercanas al número inicialmente sembrado después de 5 días en presencia de ML o 10 días con MN. Este efecto se hizo aún más evidente cuando las células HL permanecieron en un ambiente totalmente leucémico (es decir con ML), en donde después de 10 días, se detectó un incremento en el número celular de más del doble de lo inicialmente sembrado.

En conjunto, estos resultados sugieren que las MSC evitan la reducción total en el número de las células hematopoyéticas, pero en un ambiente totalmente leucémico se favorece el incremento de las poblaciones hematopoyéticas leucémicas, todo ello sin necesidad de establecer comunicación a través del contacto celular.



**Figura 4. La hematopoyesis (normal y leucémica) es mantenida en presencia de MSC.** Se mantuvieron células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas) en co-cultivo con MSC (normales y leucémicas) durante 10 días. A los 5 y 10 días de cultivo, el número celular fue evaluado mediante el método de exclusión con azul de tripano. Células primitivas hematopoyéticas cultivadas en ausencia de MSC (sin co-cultivo) se utilizaron como control al tiempo cero (línea punteada) y se compararon con: Hematopoyéticas Normales (HN) o leucémicas (HL) en presencia de células mesenquimales normales (MN) o leucémicas (ML). Los ensayos se realizaron libres de contacto y en ausencia de FBS y citocinas. Los resultados muestran la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Valores de significancia:  $*p \leq 0.5$ .

## Diferenciación

Con la finalidad de evaluar si las MSC tuvieron algún efecto en la diferenciación de las células primitivas hematopoyéticas, se analizó el inmunofenotipo de estas últimas en los diferentes co-cultivos a los días 5 y 10. Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos de las células hematopoyéticas al tiempo 0.

Para esta evaluación se tomó una alícuota de las células obtenidas en el enriquecimiento (tiempo cero), así como de las células que habían permanecido en co-cultivo por 5 o 10 días. Posteriormente, se realizaron análisis de citometría de

flujo multiparamétrica en los que con base en los marcadores CD34 y CD38 se establecieron las siguientes subpoblaciones.

- CD34+CD38-. Células troncales hematopoyéticas.
- CD34+CD38+. Células progenitoras hematopoyéticas.
- CD34- CD38+. Células precursoras hematopoyéticas.

Los resultados de estos ensayos se observan en la Figura 5, en la que se muestran plots de experimentos representativos, así como las gráficas con los promedios de las distintas evaluaciones a los diferentes tiempos de co-cultivo.

Los resultados del tiempo 0 (después del protocolo de selección negativa) mostraron que, tal y como se esperaba, la fracción de células con inmunofenotipo troncal fue reducida en las células HN y prácticamente nula en el caso de las HL. No obstante, las poblaciones progenitoras representaron la mayor proporción de células presentes mientras que en la mayoría de los ensayos se detectaron menos del 20% de células con inmunofenotipo precursor.

Una vez que las células hematopoyéticas fueron cultivadas en presencia de células mesenquimales, los resultados indican un cambio en las fracciones celulares presentes, ya que se detectó un incremento en las poblaciones con inmunofenotipo troncal a lo largo del co-cultivo, tanto en las células HN como de las HL. Sin embargo, únicamente se encontró diferencia significativa en las células HN que estuvieron en presencia de MN o ML.

Esta tendencia en el incremento de células con inmunofenotipo troncal correlaciona con un decremento en el porcentaje de células progenitoras a lo largo del tiempo de los co-cultivos. Aunque este dato únicamente fue significativo en los co-cultivos de HN con MN, es importante hacer notar que para el día 10 prácticamente todos los co-cultivos permanecieron con más del 50% de las células con inmunofenotipo progenitor, salvo en las células HL en un microambiente leucémico, en donde se



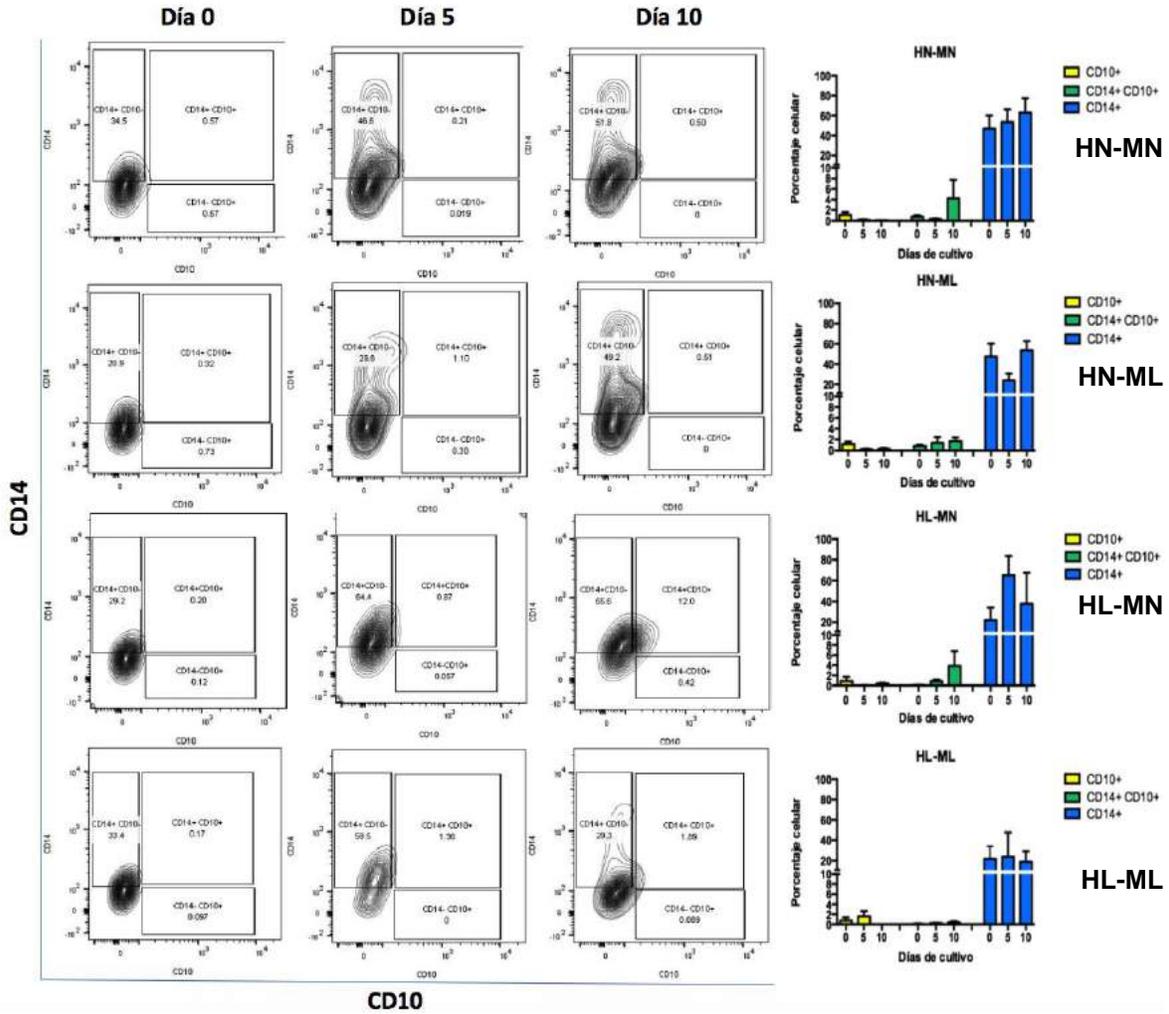
ausencia de suero y citocinas. HN/MN (n=3), HN/ML (n=4), HL/MN (n=3), HL/ML (n=3). Valores de significancia: \* $p \leq 0.05$ .

Con la intención de conocer si las células hematopoyéticas en co-cultivo se diferenciaron hacia un linaje en particular, se procedió a analizar por citometría de flujo la expresión del antígeno CD14 como marcador de diferenciación mieloide y de CD10 como marcador de linaje linfoide.

Los plots representativos y las gráficas que se muestran en la Figura 6 indican que después del enriquecimiento (tiempo cero), una proporción de células hematopoyéticas (tanto normales como leucémicas) presentes en la población total expresaban el antígeno CD14. Esto podría estar asociado a la proporción de células precursoras que permanecieron después del enriquecimiento y que se mencionaron en la Figura 5.

Una vez que las células hematopoyéticas permanecieron en co-cultivo, se pudo observar que dichas poblaciones mieloides CD14+ se mantuvieron a lo largo de los co-cultivos, tanto con MN como con ML.

Respecto a la presencia de células positivas al marcador de linaje linfoide CD10, los resultados mostraron que únicamente al inicio de los ensayos se detectó un porcentaje mínimo (1-2%), mismo que se perdió en el transcurso de los co-cultivos. (Figura 6), por lo que podemos suponer que el microambiente mesenquimal aporta elementos necesarios para la diferenciación al linaje mieloide tanto en la hematopoyesis normal como en la leucémica



**Figura 6. El microambiente de MSC permite la presencia de poblaciones del linaje mielode.** Células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas) se mantuvieron en co-cultivo con MSC (normales y leucémicas) durante 10 días. A los 5 y 10 días de cultivo contenido de células CD10+ y CD14+ fue analizado mediante citometría de flujo multiparamétrica. La figura muestra plots representativos de células hematopoyéticas normales (HN) y leucémicas (HL) antes y después del co-cultivo con MSC normales (MN) y leucémicas (ML) que expresaron cada marcador de linaje. Las gráficas representan el porcentaje media  $\pm$  SEM a partir de 3 experimentos independientes.

## Expansión

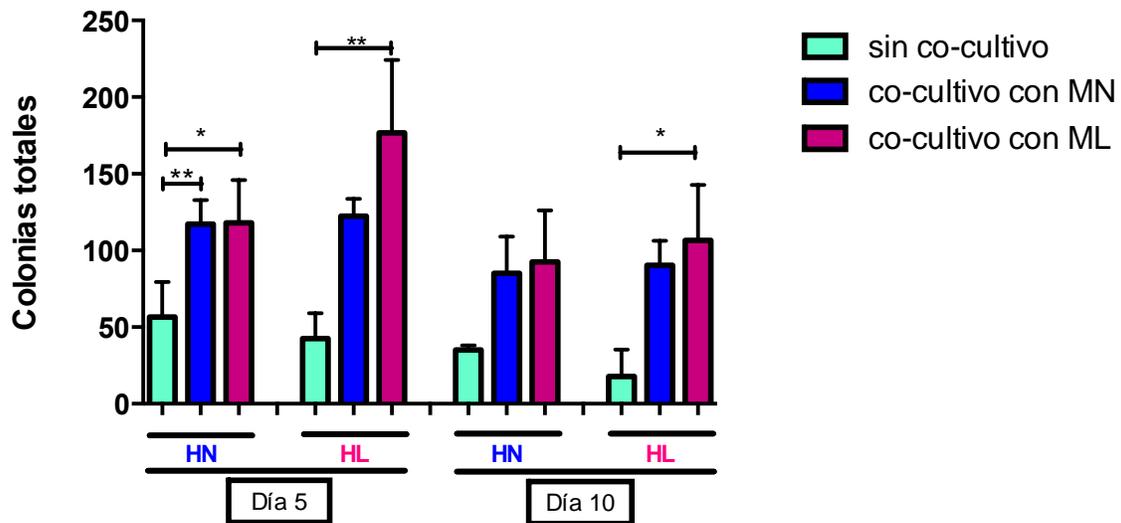
Considerando que los datos obtenidos por citometría de flujo sugirieron la permanencia de poblaciones con inmunofenotipo progenitor después de los diferentes co-cultivos, se realizaron ensayos de CFU. Esto debido a que una de las capacidades funcionales de los progenitores hematopoyéticos es formar colonias en cultivos semisolidos, fenómeno conocido como expansión.

Para ello, se tomaron 3 000 células de cada co-cultivo y posteriormente se cultivaron en metilcelulosa por 14 días (tiempo establecido para la formación de colonias hematopoyéticas). El número de colonias obtenido se comparó con las células hematopoyéticas que se mantuvieron durante 5 y 10 días de cultivo en ausencia de células mesenquimales.

Los resultados de la Figura 7 muestran un reducido número de colonias en los ensayos con células hematopoyéticas (normales o leucémicas) cultivadas en ausencia de MSC al día 5 y este número fue aún menor al día 10. No obstante, cuando las células hematopoyéticas (HN o HL) permanecieron en co-cultivo con MSC, el número de colonias fue notablemente mayor.

Específicamente se pudo observar que cuando las células HN permanecieron con MN o ML a los diferentes tiempos, el número total de colonias fue dos veces mayor en comparación con las células hematopoyéticas libres de MSC. Resultados similares se observaron en los co-cultivos de HL en presencia de MN.

Interesantemente cuando las células HL permanecieron con ML, al día 5 se detectaron tres veces más colonias con respecto al control y hasta 4 veces más al día 10. Estos datos resultan relevantes si se considera que el número de células en estos co-cultivos se duplicó (Figura 4), sugiriendo que este incremento pudiera también estar asociado con la expansión de células leucémicas que se mantienen en un estado progenitor funcional.



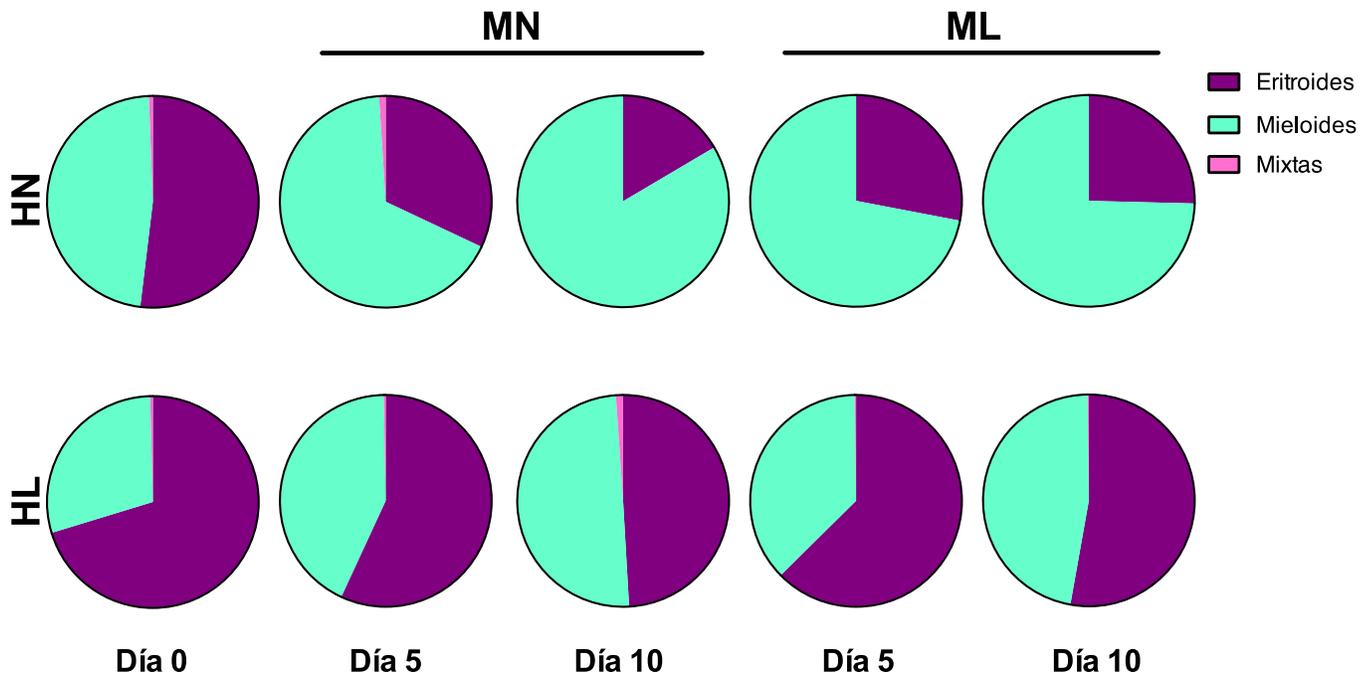
**Figura 7. Las células estromales mesenquimales favorecen el mantenimiento de las células hematopoyéticas con capacidad de formar colonias.** Se mantuvieron células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas) en co-cultivo con MSC (normales y leucémicas) durante 10 días y posteriormente se cultivaron en metil celulosa durante 14 días. La figura muestra el número de colonias formadas por las células Hematopoyéticas Normales (HN) y leucémicas (HL) a los días 5 y 10 en ausencia de estroma (sin co-cultivo) ó en co-cultivo con mesenquimales normales (MN) o leucémicas (ML). Los resultados muestran la media +/- SEM de 3 experimentos independientes. Valores de significancia: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ .

Con la intención de evaluar si existían diferencias en el tipo de colonias formadas en los diferentes co-cultivos, las colonias totales fueron analizadas con base en sus características fenotípicas, pudiendo identificarse colonias mieloides, eritroides y mixtas.

Como se observa en la Figura 8, las células HN obtenidas después del enriquecimiento (tiempo 0), formaron colonias mieloides y eritroides en una proporción similar, mientras que la fracción de colonias mixtas fue considerablemente reducida. En contraste, las HL claramente mostraron una mayor tendencia a formar colonias eritroides, no obstante, la proporción de colonias de linaje mixto se mantuvo semejante a lo normal.

Interesantemente, después del co-cultivo con MSC, tanto en HN como HL la fracción de colonias de linaje mieloides incrementó, mientras que la contraparte eritroide se redujo, siendo este comportamiento más notable en los cultivos con HN. Cabe resaltar que la proporción de células mieloides detectadas en los co-cultivos de HN correlaciona con la presencia de células CD14+ (figura 5), en donde existe un mayor porcentaje de éstas comparado con las HL, lo que probablemente se asocia con el contenido de progenitores eritroides detectados a lo largo del co-cultivo.

En conjunto, estas evidencias sugieren que las interacciones sin contacto entre las células mesenquimales y hematopoyéticas favorecen el mantenimiento de células progenitoras, aunque comprometidas de forma diferencial a los linajes mieloides y eritroide.



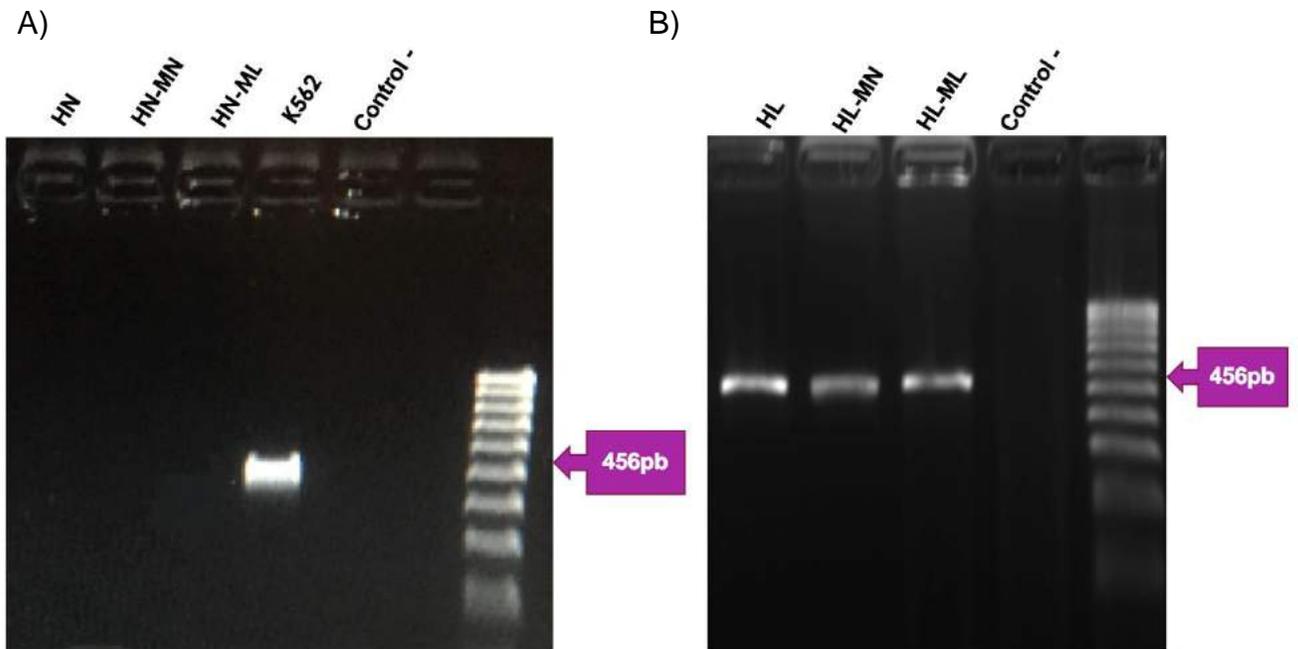
**Figura 8. Las células estromales mesenquimales favorecen el mantenimiento de los progenitores mieloides.** Porcentaje de colonias mieloides, eritroides y mixtas formadas por células Hematopoyéticas Normales (HN) y Leucémicas (HL) en ausencia de estroma y después del co-cultivo con Mesenquimales Normales (MN) y Leucémicas (ML) a los días 5 y 10. Resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

## Identificación de la translocación BCR-ABL

Con el antecedente de que en todos los sujetos con CML existe una población hematopoyética residual normal que es enmascarada por la alta proliferación de células leucémicas y teniendo presente que en ciertas condiciones *in vitro*, las células hematopoyéticas leucémicas tienden a ser eliminadas (Coulombel, 1983), se decidió evaluar si bajo estas condiciones de co-cultivo las células provenientes de individuos con CML permanecieron.

Para ello, se realizaron ensayos de PCR anidadas con el RNA de las células hematopoyéticas leucémicas utilizadas a lo largo de los experimentos y éstas se compararon con su contraparte normal. En todos los casos se utilizó la línea celular K562 como control positivo y células mononucleares provenientes de sujetos hematológicamente sanos, como control negativo.

Como se observa en la Figura 9B, las células hematopoyéticas leucémicas que permanecieron en co-cultivo con MN o ML, fueron positivas para la translocación BCR-ABL, mientras que este transcrito no fue detectado en la contraparte normal (Figura 9A). Estos resultados indican que las células hematopoyéticas que proliferan se expanden y diferencian al linaje mieloide después del co-cultivo, corresponden a la fracción de células leucémicas que permanecieron al menos 10 días de co-cultivo bajo la sola presencia de los estímulos que les pueden aportar las MSC en ausencia de contacto.



**Figura 9. Las células HL que permanecen después de 10 días en co-cultivo son positivas para la translocación BCR-ABL.** Gel de agarosa con cDNA de Células Hematopoyéticas Normales (HN) en A y Leucémicas (HL) en B provenientes de 10 días de co-cultivo con células mesenquimales normales (MN) o leucémicas (ML). Las células fueron recuperadas y posteriormente se analizó la expresión del transcrito BCR-ABL (indicado con la flecha y el peso correspondiente). La figura muestra un experimento representativo de cada co-cultivo con sus respectivos controles positivos (línea K562) y negativos (CMN provenientes de sujetos hematológicamente sanos).

## DISCUSIÓN

Las MSC son un componente importante del microambiente de la BM debido a que, en condiciones normales expresan y secretan factores que actúan como señales extrínsecas en la regulación de las células hematopoyéticas primitivas. Sin embargo, en humanos poco se sabe acerca de las interacciones que mantiene el componente estromal con células leucémicas. Dado que se ha demostrado que los factores secretados por las células tumorales modifican el comportamiento del microambiente celular circundante (El-Badawy et al., 2017), el presente trabajo tuvo la finalidad de conocer si las MSC provenientes de individuos con CML sin tratamiento tienen alguna participación en la biología de esta patología y si este comportamiento varía al interactuar mediante factores solubles con estroma normal.

Para ello, primeramente se evaluó el número de células hematopoyéticas que fueron capaces de mantenerse viables en ausencia de estroma. El análisis de estos datos mostró que la proporción de células HN fue considerablemente menor comparada con el número de HL que permanecieron al término de los ensayos. Estos resultados coinciden con un estudio similar previo en el que se observó el mismo comportamiento en cultivos que fueron realizados en ausencia de suero y citocinas (Chávez-González et al., 2006) y podrían estar asociados al hecho de que las células leucémicas son capaces de producir sus propios factores de crecimiento y regular de esta manera su proliferación y supervivencia, como previamente ha sido reportado (Holyoake et al., 2001).

Por otro lado, la información obtenida a partir de los co-cultivos indicó que la comunicación entre HN y MN permitió mantener una mayor proporción de células HN con relación a los cultivos sin estroma. Un efecto semejante fue reportado en 2016, en donde a partir de co-cultivos en contacto entre MN de BM normal y células hematopoyéticas normales con inmunofenotipo CD34+CD38-Lin- provenientes de cordón umbilical, se observó un incremento considerable en el número de las

células hematopoyéticas (Fajardo-Orduña et al., 2016). De manera semejante, en otro estudio en el que se realizaron co-cultivos de células primitivas hematopoyéticas humanas en contacto con MSC humanas inmortalizadas, se detectó un incremento en el índice de proliferación al realizar ensayos con carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) (Zhang et al., 2013). Estos resultados muestran que tanto las interacciones directas como indirectas (al usar co-cultivos sin contacto a través de insertos transwell) se favorece la permanencia de células hematopoyéticas normales. Sin embargo, debe puntualizarse que si bien los datos del presente trabajo no demuestran un incremento en el número celular, sí se observa una menor reducción del mismo. Esto podría deberse a que en nuestros ensayos no hay influencia del contacto directo, ya que las células únicamente estuvieron expuestas a posibles interacciones por moléculas solubles. Además, nuestros ensayos no se vieron influenciados por la adición de factores de crecimiento, tal y como sucedió en el trabajo de Zhang y colaboradores. Incluso, la propia capacidad proliferativa de las células hematopoyéticas usadas en los distintos estudios, podría justificar las diferencias encontradas, pues en el caso de las células provenientes de cordón umbilical, se ha reportado que tienen un potencial de proliferación mayor al de las células de BM (Mayani & Vélez-Ruelas, 2003).

Particularmente en los co-cultivos de HN en presencia de ML, se detectó una mejor capacidad de soporte hematopoyético, comparado con los co-cultivos con MN. Estos datos resultan de interés, pues hasta este momento no existen reportes en los que se hayan utilizado células mesenquimales provenientes de individuos con CML para este tipo de estudios. Sin embargo, se ha reportado que la estimulación con medios condicionados provenientes de células mononucleares de BM de pacientes con CML, limitan el soporte hematopoyético de poblaciones normales CD34+ (Zhang et al., 2012). En ese sentido debe considerarse que los factores presentes en los medios condicionados son generados por los diversos componentes celulares presentes en el microambiente de la BM (células hematopoyéticas, endoteliales, osteoblastos, etc); es decir, cada una de estas

poblaciones estaría secretando sustancias que podrían modular de diferente manera los procesos de mantenimiento y proliferación de las células hematopoyéticas. Por lo que con el presente trabajo podemos sugerir que muy probablemente los factores solubles secretados por las ML al igual que las MN favorecen el mantenimiento de poblaciones primitivas hematopoyéticas tanto normales como leucémicas.

Interesantemente, cuando se analizaron los ensayos con HL, se observó que al igual que en las HN, las MN fueron capaces de mantener a las poblaciones leucémicas. Pero en un contexto totalmente leucémico (HL-ML) se detectó un importante incremento de las poblaciones hematopoyéticas leucémicas. Acorde con esta información, Zhang y colaboradores demostraron que al estimular con plasma leucémico a LTHSC de ratones sanos o positivos para BCR-ABL, se incrementaba el número de células leucémicas BCR-ABL+; sin embargo, esto no sucedió en la población normal (Zhang et al., 2012).

Los datos obtenidos sugieren que las ML favorecen el mantenimiento y proliferación de las células HL. Por lo tanto, aunque las células mesenquimales no sean propiamente células tumorales, puesto que se ha demostrado que no presentan la translocación BCR-ABL (Estrada-González et al., 2014), durante la progresión de la enfermedad, parecen adquirir características funcionales diferentes a las de su contraparte normal. Este comportamiento ha sido también sugerido por Aggoune y colaboradores, quienes tras realizar perfiles de expresión en MN y ML provenientes CML, observaron que estas últimas exhibieron un perfil distinto al detectado en la normalidad, que incluso persistió en pacientes con respuesta molecular completa (Aggoune et al., 2017). Aunado a lo anterior, en el mismo año, El-Badawey y colaboradores encontraron que después del estímulo parácrino con factores secretados por líneas celulares leucémicas, se inducía la proliferación de MSC y con el paso del tiempo, una fracción de éstas modificaban su inmunofenotipo y funcionalidad (El-Badawy et al., 2017).

Por otro lado, como consecuencia de la interacción por contacto entre células mesenquimales y células primitivas hematopoyéticas, Fajardo-Orduña y colaboradores reportaron el incremento de poblaciones celulares con inmunofenotipos troncales. De manera similar, en este trabajo se pudo observar que el co-cultivo sin contacto con MSC favorece el mantenimiento de células con inmunofenotipo troncal (CD34+CD38-Lin-). Esta observación se sustenta tras considerar que aunque en todos los co-cultivos (exceptuando HL con ML) se detectó una reducción en el número celular, las células troncales detectadas al inicio de los ensayos permanecieron a través del tiempo, sugiriendo un proceso de selección más que de proliferación celular. Sin embargo, es necesario realizar estudios funcionales para poder sustentar esta hipótesis.

Referente a la permanencia de células progenitoras hematopoyéticas, nuestros datos muestran que salvo en los co-cultivos de HL con ML, en todos los ensayos se conservó más del 50% de las poblaciones con inmunofenotipo progenitor (CD34+CD38+). Esta observación contrasta con un estudio previo en donde células CD34+CD133+Lin- de sangre periférica movilizada fueron co-cultivadas en contacto con MN o ML, encontrando que únicamente el 1% de la población mantuvo su inmunofenotipo después de 21 días de co-cultivo, tiempo en el que se indujo la diferenciación hacia células precursoras (Estrada-González et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que tanto el contacto celular como la producción de moléculas solubles, están involucrados con las respuestas obtenidas y además estas dependerán del tiempo y condiciones de cultivo. Esto puede ser apoyado por los resultados aquí obtenidos, en donde se observó que la proporción de células precursoras hematopoyéticas únicamente incrementó en los co-cultivos de HL con ML, al tiempo que la proporción de los progenitores se redujo, muy probablemente asociado a la alta proliferación celular.

Cabe mencionar que tras los distintos co-cultivos, los progenitores que se generaron fueron del linaje mieloide (CD14+) y no del linaje linfóide (CD10). Este comportamiento era de esperarse, ya que si bien los progenitores hematopoyéticos tienen el potencial de diferenciarse a ambos linajes (mieloide y linfóide), es conocido

que las células linfoides tienen requerimientos particulares para permanecer *in vitro*, e incluso requieren del contacto celular (ausente en estos experimentos) así como la estimulación con citocinas específicas (Tice & Davey, 1983), situación que no sucede en la generación de células del linaje mieloide, en donde se sabe que las propias células hematopoyéticas son capaces de producir citocinas que inducen la diferenciación hacia este linaje (Petzer et al., 1996).

Por otro lado, considerando que en este trabajo todos los co-cultivos mantuvieron una alta proporción de células con inmunofenotipo progenitor y tras conocer que no todas las células con dicho fenotipo se comportan funcionalmente como progenitores capaces de formar colonias en cultivos semisólidos, se evaluó la funcionalidad de las células hematopoyéticas tras cada co-cultivo, encontrando que tal y como se ha reportado previamente (Chávez-González et al., 2006; Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006), las células hematopoyéticas normales y leucémicas que fueron sembradas en ausencia de células mesenquimales, formaron un reducido número de colonias, lo que no sucedió en células que provenían de co-cultivos con células mesenquimales.

Al respecto, en el presente trabajo se pudo observar que en los co-cultivos con mesenquimales normales o leucémicas, las células HN formaron una proporción de colonias similar a la de los co-cultivos de HL con MN, datos que correlacionan con información previamente reportada, en donde células CD34+ de cordón umbilical sembradas en ausencia de contacto directo con células mesenquimales, fueron capaces de mantener poblaciones formadoras de colonias con fenotipo CD34+ (Van Overstraeten-Schlögel et al., 2006). No obstante y de manera muy interesante, nuestros datos muestran que tras el co-cultivo totalmente leucémico, el número de colonias totales incrementó, lo que nuevamente sugiere que el componente mesenquimal de individuos con CML favorece la permanencia de poblaciones primitivas leucémicas muy probablemente como consecuencia de provenir de un microambiente alterado.

Aunado a lo anterior, al cuantificar el tipo de colonias formadas se observó que aunque en todos los co-cultivos se pudieron distinguir colonias de los linajes

mieloide y eritroide, las células HN formaron colonias preferencialmente mieloides y su proporción se incrementó conforme pasaron los días en co-cultivo tanto con ML o MN, pudiendo sugerir la existencia de una comunicación mediada por moléculas solubles con las que se podría estimular éste linaje.

Congruente con lo anterior, las células HL también mostraron un incremento de colonias mieloides en presencia de MN o ML, pero la proporción de colonias eritroides fue mayor que la detectada en su contraparte normal, lo que correlaciona con trabajos previos de nuestro grupo de trabajo (Chávez-González et al., 2006). Ambos casos podrían estar asociados a la presencia de la translocación BCR-ABL, ya que se ha reportado que la transfección de BCR-ABL a células CD34+ de sangre de cordón umbilical, induce una expansión del linaje eritroide (Järas et al., 2010). Este comportamiento también se ha detectado al utilizar progenitores de hígado fetal de ratón, en el que al transfectar con BCR-ABL, las células se diferencian al linaje eritroide incluso en ausencia de la señalización mediada por Eritropoyetina (Ghaffari et al., 1999).

No obstante lo anterior, es importante mencionar que conforme los co-cultivos avanzaron en el tiempo, la fracción de colonias eritroides fue reduciéndose mientras que el porcentaje de colonias mieloides se incrementó, lo que sugiere que a pesar de la presencia de BCR-ABL (que parece favorecer el linaje eritroide), las células hematopoyéticas pudieron recibir estímulos del microambiente que favorecieron el proceso de diferenciación hacia este linaje.

Con relación a este último punto, en 1997 Petzer y colaboradores observaron que células hematopoyéticas normales que permanecieron en presencia de células de CML en cultivos a largo plazo y con el estímulo de citocinas, eran capaces de expandirse al tiempo que las células BCR/ABL+ eran eliminadas (Petzer et al, 1997), razón por la cual la presencia de dicha translocación después de cada co-cultivo fue analizada. Contrario a lo mencionado anteriormente, las células HL permanecieron a lo largo de los co-cultivos independientemente de que fueran co-cultivadas con MN o ML, evento que apoya reportes más recientes en la literatura, en donde se menciona que el microambiente de la BM favorece la permanencia de

la hematopoyesis leucémica mediante diversos mecanismos. Por ejemplo, se ha sugerido que a través de una comunicación bidireccional, las células leucémicas BCR/ABL+ inducen la producción de PIGF (Factor de Crecimiento Placentario) en MSC, conduciendo a la activación de Stat5 en las células tumorales, favoreciendo así su proliferación (Schmidt et al., 2011). De igual manera, se ha reportado que altos niveles de Stat-3 en MSC activan a Mcl-1 en líneas celulares de CML, mejorando su supervivencia (Nair et al., 2012). En cuanto al efecto de factores solubles presentes en el microambiente se ha reportado que con el contacto celular entre MSC y líneas celulares de CML, se incrementan los niveles de IL-6 y CXCL1, ambas citocinas importantes para la progresión leucémica (Guarnerio et al., 2018). Adicionalmente, en un estudio previo se observó que las líneas celulares de CML inducen a las MSC de BM sana a producir altos niveles de citocinas proinflamatorias sin la necesidad de mantener contacto directo (Civini et al., 2013), razón por la cual actualmente se trabaja en determinar el tipo y concentración de moléculas producidas en los distintos co-cultivos.

Recientemente incluso se han reportado mecanismos de resistencia a TKIs en células de CML independientes de BCR/ABL, encontrando que las MSC de BM son capaces de producir citocinas que favorecen la proliferación de células de CML. Tal es el caso del trabajo de Zhang y colaboradores, quienes encontraron que MSC de pacientes resistentes a Imatinib producen altos niveles de IL-7, activando la vía de señalización Jak1/Stat5 en células de CML, hecho que mejora su viabilidad y reduce su muerte celular. (Zhang et al., 2019).

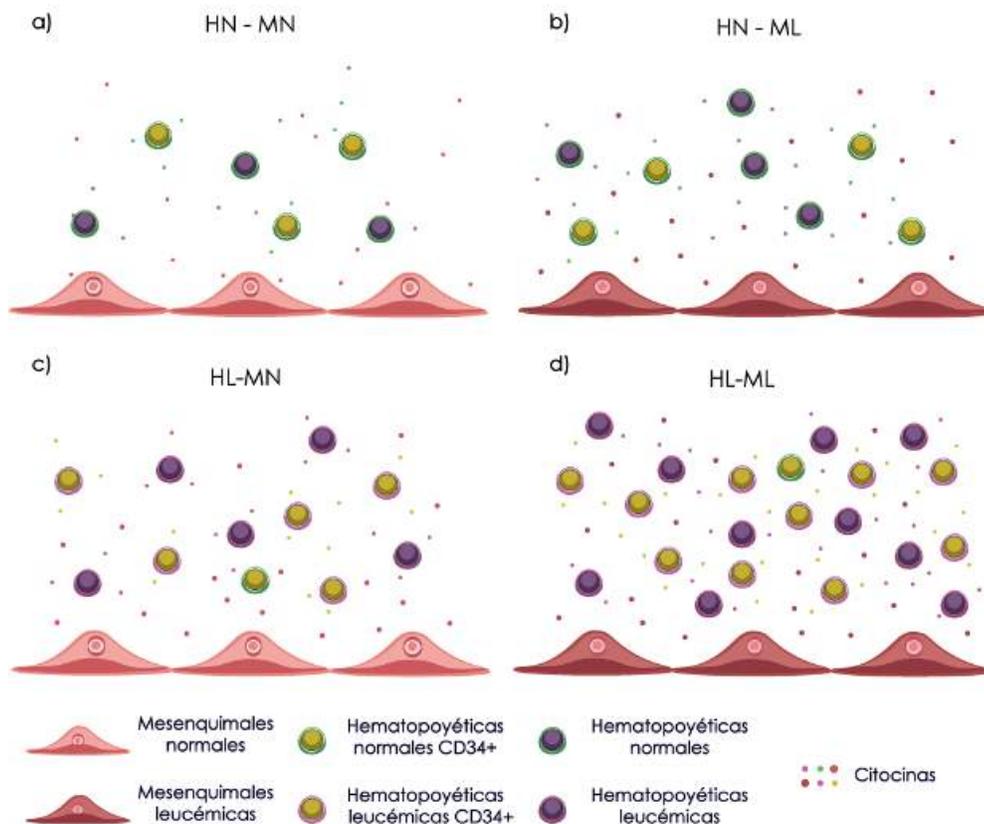
Asociado a lo anterior Jeanpierre y colaboradores reportaron en el presente año que LSC (CD34+CD38-) positivas para el receptor BMPR1B, inducen la producción de BMP4 en MSC cuando estas se encuentran en contacto, lo que disminuye los niveles de Ki67 en las células adherentes, favoreciendo su entrada a un estado de quiescencia, mientras que las no adherentes continúan proliferando (Jeanpierre et al., 2021).

Con las evidencias aquí mostradas, se puede sugerir que las MSC normales y leucémicas son capaces de mantener una estrecha comunicación con las células

primitivas hematopoyéticas cuando estas son sembradas en ausencia de contacto directo. Dicha comunicación se refleja en el mantenimiento de células progenitoras leucémicas BCR-ABL+ las cuales son funcionales, ya que forman colonias preferencialmente del linaje mieloide, situación que es detectada en los pacientes con CML. Así mismo, los resultados sugieren que las MSC provenientes de pacientes con CML podrían estar secretando factores que favorecen este comportamiento, lo cual está siendo evaluado actualmente por nuestro grupo de trabajo.

## CONCLUSIONES

- Las MSC de pacientes con CML mantienen las mismas características inmunofenotípicas y de diferenciación que las reportadas en su contraparte normal.
- Las MSC tanto de BM normal como de CML son capaces de mantener *in vitro* a células hematopoyéticas normales y leucémicas.
- Las MSC provenientes de CML favorecen la permanencia de progenitores leucémicos funcionales y contribuyen al mantenimiento de la enfermedad mediante la inducción de proliferación de las células leucémicas así como a la expansión de células del linaje mieloide.



**Figura 10. Las células estromales mesenquimales leucémicas favorecen el desarrollo de la CML al inducir la proliferación de las células leucémicas.** Las células estromales mesenquimales normales y leucémicas son capaces de mantener a las poblaciones hematopoyéticas normales y leucémicas (a, b y c); mientras que las células estromales leucémicas favorecen la proliferación de las células leucémicas (d). En todos los casos se mantienen células hematopoyéticas con inmunofenotipo primitivo (CD34+).

## **PERSPECTIVAS**

- Evaluar los niveles de citocinas presentes en los medios condicionados de cada uno de los co-cultivos.
- Evaluar el papel biológico del contacto directo de las MSC de BM con células de CML.

## REFERENCIAS

- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures (2021). Atlanta, GA.
- Bhatia, R. (2013). Hematology basic principles and practice. *Elsevier*. Sixth edition. 981-997
- Brown, D. C., & Gatter, K. C. (1993). The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. *Histopathology* 22(5),411-22.
- Butler, J. M., Nolan, D. J., Vertes, E. L., Varnum-Finney, B., Kobayashi, H., Hooper, A. T., Seandel, M., Shido, K., White, I. A., Kobayashi, M., Witte, L., May, C., Shawber, C., Kimura, Y., Kitajewski, J., Rosenwaks, Z., Bernstein, I. D., & Rafii, S. (2010). Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 6(3), 251–264.
- Calvi, L., Adams, G., Weibrecht, K., Weber, J., Olson, D., Knight, M., Martin, R., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F., & Others. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960), 841–846.
- Chávez-González, M. A., Ayala-sánchez, M., & Mayani, H. (2009). La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de Investigación Clínica*, 61(3), 221–232.
- Civini, S, Jin, P, Ren, J, Sabatino, M, Castiello, L, Jin, J, Wang, H, Zhao, Y, Marincola, F, Stroncek, D. (2013). Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. *J Transl Med.*4(11), 298.
- Chen, J. Y., Miyanishi, M., Wang, S. K., Yamazaki, S., Kao, K. S., Nakauchi, H., & Weissman, I. L. (2016). *HHS*. 530(7589), 223–227.
- Coulombel, L., Kalousek, D.K., Eaves, C.J., Gupta, C. M., & Eaves, A.C. (1983). Long-Term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *The new England Journal of Medicine*. 308(25), 1493-8.
- Crane, G. M., Jeffery, E., & Morrison, S. J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 573–590.
- Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481(7382), 457–462.

- Dominici, M., le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317.
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell*, *10*(2), 120–136.
- Druker, B. J. (2008). Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*, *112*(13), 4808–4817.
- Druker, Brian J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. N., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., & Agis, H. (2006). Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *355*(23), 2408–2417.
- El-Badawy, A., Ghoneim, M. A., Gabr, M. M., Salah, R. A., Mohamed, I. K., Amer, M., & El-Badri, N. (2017). Cancer cell-soluble factors reprogram mesenchymal stromal cells to slow cycling, chemoresistant cells with a more stem-like state. *Stem Cell Research and Therapy*, *8*(1), 1–20.
- Estrada-González, P.K., Gómez-Ceja, L., Montesinos, J.J., Mayani, H., Chávez-González, A., Meillón, L. Delgado, N., Sánchez-Nava, E., & Flores-Figueroa, E. (2014). Decreased frequency, but normal functional integrity of mesenchymal stromal cells derived from untreated and Imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia Reserch*. *38*(2014) 594–600.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. M. (1999). The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *341*(3), 164–172.
- Fajardo-Orduña, G. R., Mayani, H., Castro-Manreza, M. E., Flores-Figueroa, E., Flores-Guzmán, P., Arriaga-Pizano, L., Piña-Sánchez, P., Hernández-Estévez, E., Castell-Rodríguez, A. E., Chávez-Rueda, A. K., Legorreta-Haquet, M. V., Santiago-Osorio, E., & Montesinos, J. J. (2016). Bone marrow mesenchymal stromal cells from clinical scale culture: in vitro evaluation of their differentiation, hematopoietic support, and immunosuppressive capacities. *Stem Cells and Development*, *25*(17), 1299–1310.
- Ferrando, A. A., & López-Otín, C. (2017). Clonal evolution in leukemia. *Nature Medicine*, *23*(10), 1135–1145.
- Fialkow, P. J., Jacobson, R. J., & Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte,

- platelet and monocyte/macrophage. *The American Journal of Medicine*, 63(1), 125–130.
- Flores-Figueroa, E., Varma, S., Montgomery, K., Greenberg, P. L., & Gratzinger, D. (2012). Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Laboratory Investigation*, 92(9), 1330–1341.
- Gallipoli, P., Pellicano, F., Morrison, H., Laidlaw, K., Allan, E. K., Bhatia, R., Copland, M., Jørgensen, H. G., & Holyoake, T. L. (2013). Autocrine TNF- $\alpha$  production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation. *Blood*, 122(19), 3335–3339.
- Granatowicz, A., Piatek, C. I., Moschiano, E., El-Hemaidi, I., Armitage, J. D., & Akhtari, M. (2015). An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. *Korean Journal of Family Medicine*, 36(5), 197–202.
- Guarnerio, J., Mendez, LM, Asada, N, Menon, AV, Fung, J, Berry, K, Frenette, PS, Ito, K, Pandolfi, PP. (2018) A non-cell-autonomous role for Pml in the maintenance of leukemia from the niche. *Nat Commun*. Jan 4;9(1):66.
- Herrmann, H., Sadovnik, I., Cerny-Reiterer, S., Rulicke, T., Stefanzi, G., Willmann, M., Hoermann, G., Bilban, M., Blatt, K., Herndlhofer, S., Mayerhofer, M., Streubel, B., Sperr, W. R., Holyoake, T. L., Mannhalter, C., & Valent, P. (2014). Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 123(25), 3951–3962.
- Himburg, H. A., Harris, J. R., Ito, T., Daher, P., Russell, J. L., Quarmyne, M., Doan, P. L., Helms, K., Nakamura, M., Fixsen, E., Herradon, G., Reya, T., Chao, N. J., Harroch, S., & Chute, J. P. (2012). Pleiotrophin Regulates the Retention and Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Vascular Niche. *Cell Reports*, 2(4), 964–975.
- Ito, S., Barrett, A. J., Dutra, A., Pak, E., Miner, S., Keyvanfar, K., Hensel, N. F., Rezvani, K., Muranski, P., Liu, P., Melenhorst, J. J., & Larochelle, A. (2015). Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research*, 14(1), 95–104.
- Jaras, M., Johnels, P., Hansen, N., Agerstam, H., Tsapogas, P., Rissler, M., Lassen, C., Olofsson, T., Bjerrum, O. W., Richter, J., & Fioretos, T. (2010). Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(37), 16280–16285.
- Jeanpierre, S, Arizkane, K, Thongjuea, S, Grockowiak, E, Geistlich, K, Barral, L, Voeltzel, T, Guillemain, A, Gonin-Giraud, S, Gandrillon, O, Nicolini, FE, Mead, AJ, Maguer-Satta, V, Lefort, S. (2021). The quiescent fraction of chronic myeloid

leukemic stem cells depends on BMPR1B, Stat3 and BMP4-niche signals to persist in patients in remission. *Haematologica*. Jan 1;106(1):111-122.

Kantarjian, H., O'Brien, S., Jabbour, E., Garcia-Manero, G., Quintas-Cardama, A., Shan, J., Rios, M. B., Ravandi, F., Faderl, S., Kadia, T., Borthakur, G., Huang, X., Champlin, R., Talpaz, M., & Cortes, J. (2012). Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood*, 119(9), 1981–1987.

Mayani, H. (2009). Células Troncales Y Hematopoyesis. *Mensaje Bioquímico*. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. XXXIII, 155–170.

Morrison, S. J., & Scadden, D. T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 505(7483), 327–334.

Mukaida, N., Tanabe, Y., & Baba, T. (2017). Chemokines as a Conductor of Bone Marrow Microenvironment in Chronic Myeloid Leukemia. *International Journal of Molecular Science*. 18(8), 1824.

Nair, RR, Tolentino, JH, Argilagos, RF, Zhang, L, Pinilla-Ibarz, J, Hazlehurst, LA. (2012). Potentiation of Nilotinib-mediated cell death in the context of the bone marrow microenvironment requires a promiscuous JAK inhibitor in CML. *Leuk Res*. Jun;36(6):756-63.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., & Nagasawa, T. (2010). The Essential Functions of Adipo-osteogenic Progenitors as the Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Niche. *Immunity*. 33(3), 387–399.

Pelayo, R. & Vadillo E. (2011) *El sistema hematopoyético a partir de células troncales*. *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. R. Pelayo, J. Santa-Olalla, & I. Velasco. Programa Universitario de Investigación en Salud, PUIS: Ciudad Universitaria, México.

Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J., & Skorski, T. (2010). Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2254–2264.

Petzer, A. L., Eaves, C. J., Lansdorp, P. M., Ponchio, L., Barnett, M. J., & Eaves, A. C. (1996). Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemia. *Blood*. 88(6), 2162–2171.

- Petzer AL, Zandstra PW, Piret JM, Eaves CJ. (1996). Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin. *J Exp Med.* Jun 1;183(6):2551-8.
- Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H., & Cortes, J. (2009). Imatinib and beyond exploring the full potential of targeted therapy for CML. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 6(9), 535–543.
- Reynaud, D., Pietras, E., Barry-Holson, K., Mir, A., Binnewies, M., Jeanne, M., Salatorra, O., Radich, J. P., & Passegué, E. (2011). IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer Cell.* 20(5): 661-673.
- Sadovnik, I., Hoelbl-Kovacic, A., Herrmann, H., Eisenwort, G., Cerny-Reiterer, S., Warsch, W., Hoermann, G., Greiner, G., Blatt, K., Peter, B., Stefanzi, G., Berger, D., Bilban, M., Herndlhofer, S., Sill, H., Sperr, W. R., Streubel, B., Mannhalter, C., Holyoake, T. L., & Valent, P. (2016). Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph+ CML. *Clinical Cancer Research.* 22(8), 2051–2061.
- Saldívar-Santoyo, H. J., & Flores-guzmán, P. (2013). El nicho de las células troncales: los secretos de su “código postal”. *Facultad de Medicina de La UNAM.* 56, 47–59.
- Sawyers, C. L. (1999). Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 340(17), 1330–1340.
- Schmidt, T., Masouleh, B. K., Loges, S., Cauwenberghs, S., Fraisl, P., Maes, C., Jonckx, B., de Keersmaecker, K., Kleppe, M., Tjwa, M., Schenk, T., Vinckier, S., Fragoso, R., de Mol, M., Beel, K., Dias, S., Verfaillie, C., Clark, R. E., Brümmendorf, T. H., & Carmeliet, P. (2011). Loss or inhibition of stromal-derived PIGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1+ leukemia. *Cancer Cell.* 19(6), 740–753.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grünewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L. M., Rittling, S. R., & Scadden, D. T. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *The Journal of Experimental Medicine.* 201(11), 1781–1791.
- Tice, D.G, Davey, F.R. T lymphocyte colonies stimulated by different mitogens require diverse culture conditions. *Exp Hematol.* 1983 May;11(5):394-401.
- Van Etten, R. A. (2004). Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leukemia Research,* 28 S1, S21-S28.

- Van Overstraeten-Schlögel, N., Beguin, Y., & Gothot, A. (2006). Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *European Journal of Haematology*, 76(6), 488–493.
- Vernot, J. P., Bonilla, X., Rodriguez-Pardo, V., & Vanegas, N. D. P. (2017). Phenotypic and functional alterations of hematopoietic stem and progenitor cells in an in vitro leukemia-induced microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2): 199.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J. Q., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., & Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960), 836–841.
- Zhang B, Ho J.W., Huang Q., Maeda T., Lin A., Lee S., Hair A., Holyoake T.L.,3 Huettner C., & Bhatia R. (2012) Altered Microenvironmental Regulation of Leukemic and Normal Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Cell*. 21, 577–592.
- Zhang, B., Li M., McDonald, T., Holyoake, T.L., Moon, R.T., Campana, D., Shultz L., & Bhatia R. (2013). Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt – $\beta$ -catenin signaling. *Blood*. 121(10):1824-1838.
- Zhang, X, Tu, H, Yang, Y, Jiang, X, Hu, X, Luo, Q, Li, J. (2019) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia via the IL-7/JAK1/STAT5 pathway. *J Biol Chem*. Aug 9;294(32):12167-12179.