



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Efecto del contacto celular entre la línea de Leucemia Mieloide Crónica K562 y el Microambiente Mesenquimal Normal”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ANA ELENKA ORTIZ REYES

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. MARÍA ANTONIETA CHÁVEZ GONZÁLEZ
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas.
Hospital de Oncología. CMN. Siglo XXI. IMSS.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. LETICIA ROCHA ZAVALA, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. JAIME IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Enero, 2023



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 la Coordinación de Investigación de Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) quien mediante el financiamiento FIS/IMSS/PROT/PRIO/18/076 y el Proyecto de Reactivación de Protocolos beneficiados en Convocatorias Institucionales con cierre anticipado por extinción del Fondo de Investigación en Salud, apoyo la realización de este proyecto (Registro 2012-785-084).
- ✚ Un agradecimiento muy especial a mi Tutora (y ahora amiga), la Dra. María Antonieta Chávez González; Dra. No sabe mi infinito agradecimiento, aprecio, confianza y cariño que a lo largo de este tiempo fue naciendo. Por demostrarme su apoyo no solo durante mi estancia en su laboratorio, si no en mi vida personal, por permitirme expresarme con libertad, por recordarme lo valiosa que soy como persona y creer en mí y en mis capacidades, por no dejarme sola en los momentos difíciles de mi vida y siempre extenderme sus opiniones y consejos de vida. Aprendí y crecí como persona, le deseo que la vida siempre le devuelva el doble de lo que usted siempre da a los demás.
- ✚ A mi comité tutor y evaluador por sus valiosas aportaciones y recomendaciones que enriquecieron este trabajo.
- ✚ A la M. en C. Jessica Lakshmi Prieto Chávez por su amable asesoría y enseñanzas sobre citometría de flujo, así como al Laboratorio de Citometría del Centro de Instrumentos – Coordinación de Investigación en Salud, IMSS.
- ✚ A mi querida amiga (y antigua tutora de licenciatura) Dra. Marissa Calderón (UBIMED, FES Iztacala) quien me apoyo y motivo a realizar un posgrado, y que me ha brindado su compañía y amistad hasta el día de hoy, demostrándome su amistad incondicional incluso en los momentos más difíciles.
- ✚ A mis compañeros de laboratorio, principalmente a Patricia Torres y Sandra Centeno, quienes fueron mis mentoras principales en las metodologías empleadas para la realización de este trabajo de tesis, y a Sergio Sánchez y Axel García a quienes conocí durante mi estancia en el laboratorio de células troncales y con quienes he compartido muy buenos momentos y amistad.
- ✚ A mi amigo Alejandro Chávez y al maestro José del Carmen Benítez (UMF, FES Iztacala) quienes me apoyaron en la realización de los cortes histológicos, así como a mi amigo Adrián Cortés y al Dr. José Montesinos (UIMEO, IMSS), que compartieron y enriquecieron mi conocimiento sobre el mundo de las células mesenquimales y me instruyeron en las técnicas de tinción empleadas en este trabajo.
- ✚ A Zaira Cruz, una compañera maravillosa que conocí en esta aventura de posgrado y que junto con las demás (Silvia, Andrea, Carol, Sofía y Perla) seguimos teniéndote presente cada vez que nos reunimos, las quiero chicas, deseo que todas seamos mujeres exitosas en nuestras vidas.
- ✚ Por último, agradezco al Hospital Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS, así como a todo su personal que lo conforma. En primera por ser el lugar donde me forme durante mi maestría y segundo por ser el sitio que nos brindo una esperanza y oportunidad de luchar contra el cáncer de mi mamá, con ello se fortaleció mi convicción de mejorar y seguir aprendiendo para aportar mi granito de arena en la investigación y lucha contra el cáncer.

Dedicatorias

Quiero en esta ocasión dedicar mi trabajo de tesis a algunas personitas que sin duda son parte de mi vida diaria y que llevo siempre en mi mente y corazón:

*A mi tío **Sergio Ortiz Boza**, quien a mediados de mi maestría fue diagnosticado con cáncer en estadio IV, ese fue mi primer acercamiento a esta difícil enfermedad desde un punto de vista personal y no de investigación solamente, este suceso me hizo valorar y ser más empática con quienes luchan contra esta enfermedad; tío aquí estoy cumpliendo mi promesa, este trabajo te lo dedico con mucho amor.*

*A **mi mamá**, quien fue diagnosticada con cáncer de mama etapa III, cuando yo me encontraba al termino de mi maestría, y que sin duda fue un duro golpe para mi familia acompañado de incertidumbre y miedos, pero un año después de tu diagnóstico, aquí estamos en una versión más fuerte, más unida y bendecida, superando con pequeñas batallas esta gran guerra, te admiro y te amo mamá. Por favor, no dejes de luchar y de amar la vida.*

*A **mi padre**, siempre están presentes tus enseñanzas en mi día a día, y aunque te extraño mucho, honro tu memoria con mis acciones, me esfuerzo día a día para ser una mujer valiosa y libre de miedos.*

*A mis **hermanas y sobrinas**: chicas gracias por acompañarme y por su amor, por nuestras locuras y siempre echarme porras y ánimos, y seguir siendo un equipo de mujeres solidarias y resilientes, las amo. ¡¡¡Vamos por más éxitos!!!*

*A mi mejor amigo, **Juan Tomas Torres G.**, una vez más aquí estas, presente para mí, te agradezco esos ánimos que siempre me das en las buenas y en las malas, por nunca dejarme sola, por motivarme a intentar cosas nuevas, como lo fue este posgrado. Eres un amigo increíble y te admiro porque brillas con luz propia.*

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1 Hematopoyesis normal	9
3.2 Microambiente Hematopoyético (MH)	11
3.3 Remodelación del MH en médula ósea en la enfermedad	17
3.4 Leucemias	18
3.5 Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	19
3.6 Células Estromales Mesenquimales (MSC) de LMC	25
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. HIPÓTESIS	28
6. OBJETIVO GENERAL	28
7. OBJETIVOS PARTICULARES	28
8. MATERIALES Y MÉTODOS	29
8.1 Obtención de CMN de muestras primarias	29
8.2 Obtención y formación de banco de MSC	29
8.3 Inmunofenotipo de MSC	30
8.4 Diferenciación de MSC	31
8.5 Cultivo y expansión de la línea celular leucémica K562	32
8.6 Detección del gen de fusión Bcr::Abl1	32
8.7 Ensayo de Cocultivo de células K562 con MSC	32
8.8 Viabilidad de células leucémicas K562	33
8.9 Ensayo de Proliferación celular e identificación de poblaciones primitivas.....	33
8.10 Ensayo de Apoptosis celular	35
8.11 Procesamiento de datos y análisis estadísticos	35
9. RESULTADOS	36
9.1 Detección del gen de fusión Bcr::Abl1	36
9.2 Caracterización de MSC de MO normal	36
9.3 Proliferación de las células K562 en el modelo de cocultivo	39

9.4 Muerte celular de la línea K562 en el cocultivo con MSC	41
9.5 Evaluación de la población primitiva de la línea celular K562.....	43
10. DISCUSIÓN	45
11. CONCLUSIÓN	50
12. PERSPECTIVAS	51
13. REFERENCIAS	52

1. ABREVIATURAS

AF: Autofluorescencia

ALCAM: molécula de adhesión celular leucocitaria activada

Angpt1: angiopoyetina 1

ATP: adenosín trifosfato

BMP1: proteína morfogenética ósea 1

BMPR1A: proteína morfogenética ósea tipo 1A

CE: células endoteliales

CFSE: carboxifluoresceína

CFU-F: unidad formadora de colonias de fibroblastos

CHIP: de las siglas en ingles *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential*

CINC-1: Quimioatrayente de neutrófilos inducido por citoquinas 1

CMN: células mononucleares

CPH: células progenitoras hematopoyéticas

CTH: células troncales hematopoyéticas

CTL: célula troncal leucémica

CTPH: células troncales/progenitoras hematopoyéticas

CXCL12: quimiocina 12 con motivo C-X-C

DMEM: por sus siglas en ingles *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

FGF1: factor de crecimiento de fibroblastos 1

Flt3-L: ligando de tirosina quinasa 3 tipo FMS

FOXO: por sus siglas en ingles *forkhead box transcription factors*

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos

GDP: guanosín difosfato

GM-CSF: factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos

GTP: guanosín trifosfato

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IFN- γ : interferón γ

IL-x: Interleucina

IP: índice de proliferación

LEF1: factor de unión al potenciador linfoide 1

LFA-3: antígeno 3 asociado a la función de los linfocitos

LLC: leucemia linfocítica crónica

LMA: leucemia mieloide aguda

LMC: leucemia mieloide crónica

M-CSF: factor de crecimiento de macrófagos

MEC: matriz extracelular

MH: microambiente hematopoyético

MIF: media de intensidad de fluorescencia

MITF: factor de transcripción asociado con microftalmia

MO: Médula ósea

MON: médula ósea normal

MSC: de las siglas en ingles *Mesenchymal Stromal Cell*

MSC-L: células estromales mesenquimales leucémicas

NMP: neoplasias mieloproliferativas

OCT-1: transportador de cationes orgánicos 1

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPN: osteopontina

PBS: de las siglas en ingles *phosphate-buffered saline*

PCR: de las siglas en ingles *Polymerase chain reaction*

PDPN: podoplanina

Ph: cromosoma Philadelphia

PTN: pleiotropina

RPMI: por sus siglas en ingles *Roswell Park Memorial Institute*

SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia

SCF: de las siglas en ingles *Stem Cell Factor*

SCU: sangre de cordón umbilical

SD: desviación estándar

SEM: error estándar de la media

SFB: suero fetal bovino

SLAM: de las siglas en ingles *Signaling lymphocytic activation molecule*

SMD: síndrome mielodisplásico

SP: sangre periférica

TGF β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1

TIMP-1: inhibidor 1 de la metalopeptidasa

TKI: por sus siglas en ingles *tyrosine kinase inhibitors*

TPO: trombopoyetina

VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1

2. RESUMEN

La hematopoyesis es un proceso jerárquico y altamente regulado que da a lugar la formación de todos los linajes que componen la sangre. Todos estos tipos celulares se generan a partir de células troncales hematopoyéticas que residen en nichos específicos presentes en médula ósea. Alteraciones intrínsecas en esta población celular o extrínsecas en el microambiente circundante medular, dan origen al desarrollo de diferentes patologías hematológicas como las leucemias.

La Leucemia Mieloide Crónica se caracteriza por presentar la fusión del oncogén *Bcr::Abl1* que se traduce a una proteína quimérica de 210 kDA Bcr-Abl1 (p210^{Bcr-Abl}) responsable de la desregulación de diferentes vías de señalización y por tanto, de los procesos celulares que éstas rigen en las células leucémicas. El desarrollo de los Inhibidores de Proteínas Tirosina Cinasas (TKI) han mejorado notablemente la supervivencia y calidad de vida de los pacientes, sin embargo, una fracción de ellos desarrolla resistencia a la terapia generando recaídas de la enfermedad.

Hoy en día se han caracterizado algunos de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la resistencia a los TKI, pero poco se sabe del papel del microambiente patológico en el cual reside la célula troncal leucémica. Además, existen pocos reportes del papel biológico que ejerce el componente mesenquimal sobre el desarrollo de la LMC. Por esta razón, en el presente trabajo se realizó un modelo de cocultivo con contacto directo de MSC de médula ósea normal con la línea celular de LMC K562.

Nuestros resultados mostraron que la interacción de ambas poblaciones celulares generó una disminución moderada en la proliferación de las células leucémicas con un índice de proliferación semejante entre los grupos, sin embargo, en el cocultivo hubo una disminución de la viabilidad de las células K562 relacionada con un mayor porcentaje de células en apoptosis temprana y muerte celular. Por último, se evaluó la frecuencia de poblaciones primitivas CD34+ CD38 +/-; detectando un cambio significativo en el porcentaje de células con inmunofenotipo troncal (CD34+ CD38-), mientras que, en los compartimentos de progenitores y precursores solo se detectó una tendencia al aumento.

Estos datos sugieren que, las MSC normales tienen un efecto regulador negativo sobre las células leucémicas al controlar su proliferación e inducir una fracción de éstas a muerte celular, además de que parecieran no favorecer la permanencia de poblaciones leucémicas con inmunofenotipo semejante al troncal.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Hematopoyesis normal

A lo largo de la vida, los seres humanos requieren de una renovación constante de los tipos celulares que conforman a los diferentes órganos y tejidos, de tal forma, que las células encargadas de esta renovación son denominadas como “células troncales” (Pantoja *et al.*, 2015). Un claro ejemplo de esto es la sangre, la cual constituye uno de los tejidos con mayor capacidad de recambio, ya que diariamente se producen alrededor de un billón de células sanguíneas dentro de la médula ósea (MO) humana adulta (Doulatov *et al.*, 2012).

La formación de la sangre es generada a partir de un proceso denominado hematopoyesis, el cual es estrictamente orquestado e implica la producción de todas las células sanguíneas maduras a partir de células troncales hematopoyéticas (CTH), manteniendo un delicado equilibrio entre la gran producción y la necesidad de suministrar y regular la cantidad de las diferentes poblaciones hematopoyéticas maduras a lo largo de la vida de un organismo. Estas CTH han sido identificadas y aisladas de diferentes tejidos embrionarios y adultos, tales como el saco vitelino, la región aorta-gónada-mesonefros, hígado fetal, médula ósea, sangre periférica (PB) y sangre de cordón umbilical (SCU). A partir de su descubrimiento se han desarrollado nuevas estrategias para aislar y purificar las CTH, basados en la presencia de marcadores de superficie celular, propiedades funcionales y/o metabólicas (Bujko *et al.*, 2019).

La hematopoyesis es un proceso jerárquico (Figura 1), en donde a partir de las CTH se derivan los siguientes compartimentos celulares que presentan diferentes propiedades morfo-fisiológicas y que culmina con la formación de las células terminalmente diferenciadas que conforman la sangre. El primer compartimento hematopoyético son las CTH, que además de estar numéricamente reducidas, presentan dos características fundamentales, por un lado, su capacidad de autorenovación, es decir, que al dividirse una de las células hijas conserva las propiedades de célula troncal, y por otro lado, tienen un alto potencial de diferenciación, ya que da origen a todos los tipos celulares tanto de linaje mieloide (macrófagos, monocitos, granulocitos, eritrocitos y plaquetas) como linfoide (linfocitos T, B y citolítico natural). Aunado a estas propiedades las CTH presentan una alta actividad de telomerasa, lo que restituye el acortamiento de los telómeros en cada ciclo replicativo, evitando así su senescencia y permitiendo su proliferación cuando es requerida. Dado que esta población no puede ser identificada solo por su morfología, se ha utilizado la presencia o ausencia de diferentes antígenos de membrana, para su caracterización, de manera que las CTH humanas expresan los antígenos CD34, CD49f, CD117, CD90 y CD133 y carecen del antígeno CD38, así como de marcadores de linaje presentes en células maduras como CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, CD36, CD64, MPO, entre otros (Doulatov *et al.*, 2012; Saldívar-Santoyo *et al.*, 2013; Roa-Higuera *et al.*, 2010).

El siguiente compartimento de esta jerarquía está compuesto por las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) que se derivan de las CTH. Esta población aún expresa el antígeno CD34, y comienza a presentar el antígeno CD38. Así mismo, poseen propiedades de proliferación y diferenciación inferiores a las CTH y una nula capacidad de autorenovación. Las

CPH dan a su vez origen a los precursores hematopoyéticos, que son células aún inmaduras pero que pueden ser reconocibles por su morfología y que por lo general pierden la capacidad de proliferación. Esta población carece del antígeno CD34, pero conserva la expresión del antígeno CD38. Por último, estos precursores concluyen su maduración y dan origen a todos los tipos de células sanguíneas funcionales presentes en circulación, que, aunque son las más abundantes, presentan una nula capacidad de proliferación y diferenciación, además de que presentan marcadores de linaje y carecen de los antígenos CD34 y CD38 (Mayani, 2003; Doulatov *et al.*, 2012; Saldívar-Santoyo *et al.*, 2013).

Típicamente al compartimento de CTH y CPH en conjunto, se les ha denominado población primitiva hematopoyética (CTPH). Éstas presentan un alto potencial proliferativo, se consideran inmunofenotípicamente como CD34+ CD38 +/- Lin- y se estima que representan alrededor del 2.4% de la fracción mononuclear total obtenida de medula ósea normal, mientras que la fracción más primitiva correspondiente a células CD34+ CD38- Lin- es tan solo el 0.1% (Chávez-González *et al.*, 2004). Así mismo, se ha estimado que las CTH representan solo el 0.01–0.005 % del total de células presentes en médula ósea y que aproximadamente hay cerca de 50×10^6 de CTH en un humano adulto sano (Mayani, 2003). Esta población primitiva, en conjunto con las células precursoras hematopoyéticas, residen dentro de la MO, y están inmersas en el microambiente hematopoyético, donde aparentemente la ubicación exacta de CTH no es aleatoria, ya que éstas residen en sitios específicos que se han asociado íntimamente con la regulación de su funcionamiento (Mayani, 2003; Szade *et al.*, 2018).

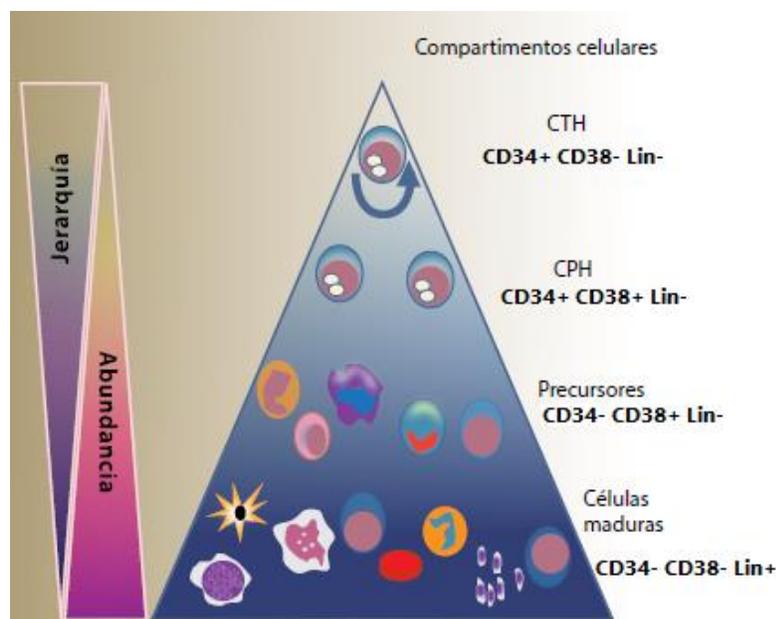


Figura 1. Hematopoyesis humana. Proceso jerárquico compuesto por cuatro principales compartimentos: Las CTH como la población celular iniciadora de la jerarquía y de donde derivan los CPH con una nula capacidad de autorenovación y que dan lugar a la formación de las células precursoras que han perdido la expresión del antígeno CD34, hasta que finalmente maduran generando células terminalmente diferenciadas o linaje positivas (Lin +) como eritrocitos, plaquetas y leucocitos. Imagen tomada y modificada de Saldívar-Santoyo *et al.*, 2011.

3.2 Microambiente hematopoyético (MH)

Las CTH se localizan en un microambiente especializado dentro de la MO, sitio que tiene la capacidad de mantener sus propiedades, incluida la autorrenovación a largo plazo, la quiescencia y la multipotencia. Además, aunque las células hematopoyéticas (en distintos estados de maduración) constituyen una fracción importante de la MO, coexisten con otros tipos de poblaciones celulares y que conforman el MH, tales como: las células estromales mesenquimales, osteoblastos, adipocitos, macrófagos, células endoteliales y células neuronales, las cuales son capaces de interactuar y comunicarse mediante la interacción directa a través del contacto celular o indirecta con la producción de diferentes factores y moléculas solubles que proporcionan elementos indispensables que regulan la hematopoyesis (Szade *et al.*, 2018).

El sitio anatómico y dinámico de la MO donde residen las CTH y reciben las señales provenientes del microambiente circundante ha sido definido como nicho hematopoyético (Schofield, 1978) y durante la última década, nuestro conocimiento del nicho de las CTH en mamíferos se ha obtenido en gran medida de modelos murinos. Además, la acumulación de datos sobre cocultivos *in vitro* de células humanas, secciones de tejido humano, experimentos con xenoinjertos y estudios clínicos han brindado información sobre las interacciones celulares y moleculares que están involucradas en el soporte de las CTH, planteando así la existencia de diferentes tipos de nichos en la MO humana (van Pel *et al.*, 2015) (Figura 2).

El *nicho endosteal*, propuesto por primera vez por Calvi *et al.*, y Zhang *et al.*, (2003), mostró mediante evidencia indirecta que los osteoblastos que recubren el hueso en ratón, denominados células fusiformes N-cadherina+ osteoblásticas influían directamente en la proliferación de las CTH, dado que al ser eliminados mediante una delección del receptor de la proteína morfogenética ósea tipo 1A (BMPR1A) se generaba una drástica disminución de las CTH. Además, se ha demostrado que la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) por parte de los osteoblastos permite la expansión *in vitro* de las CTH (Taichman *et al.*, 1994). Sin embargo, también existe evidencia experimental que pone en punto de discusión el papel de los osteoblastos en el mantenimiento de las CTH, ya que la eliminación condicional de CXCL12 y SCF derivados de éstos, no afecta el mantenimiento de las CTH, en cambio los osteoblastos parecieran contribuir al soporte de los progenitores linfoides de una manera dependiente del ligando de CXCL12 y *Notch* (Ding & Morrison, 2013).

Otro nicho involucrado con las CTH es el *perivascular*, también denominado como “sinusoidal vascular o de reticulares sinusoidales”. Este nicho está altamente vascularizado con arteriolas, sinusoides y capilares, que proveen a las CTH de oxígeno, nutrientes y una amplia variedad de factores esenciales para su mantenimiento. Estudios de imágenes tridimensionales de MO, demostraron que el 60% de las CTH totales se encontraban a menos de 10 µm de distancia de la vasculatura y de éstas el 90% correspondían a CTH de largo plazo, que se encuentran en contacto directo con el nicho perivascular (Chen *et al.*, 2016). En ese mismo sentido y utilizando modelos murinos y marcadores de la familia SLAM, (CD150, CD244 y CD48), Kiel y colaboradores (2005) obtuvieron CTH altamente purificadas (CD150+ CD244- CD48-) e identificaron que estas células se localizan en un nicho de endotelio sinusoidal tanto en

medula ósea como en bazo, además, también demostraron que una menor fracción de estas células se encontraba asociada al endostio.

Por otra parte, algunos otros estudios han propuesto la existencia de un nicho *periarteriolar* (“nicho arteriolar perivascular o nicho arteriolar pericítico”) distinto al perivascular, en el que se localizan las CTH menos activas. Este modelo de nicho propone que las células del estroma periarteriolar (Nestina^{High}, NG2+) son una fuente importante de factores como SCF y CXCL12, importantes para su mantenimiento. Sin embargo, reciente evidencia ha demostrado que las células periarteriolares no son una fuente de SFC, dado que no se ha detectado la expresión de *Scf*-GFP y la eliminación condicional de SCF, Nestina o NG2 no tiene efecto directo sobre la frecuencia de CTH o la hematopoyesis en MO adulta. Así mismo, se demostró una baja expresión de CXCL12 en las células estromales Nestina+ NG2+, y su eliminación condicional solo parece afectar la frecuencia de las CTH durante las primeras semanas del nacimiento, es decir, en la MO posnatal temprana, dado que en esta etapa la expresión de Nestina y NG2 no solo se limita solo a las células del estroma periarteriolar, en contraste, su eliminación en MO adulta tampoco muestra un efecto sobre la hematopoyesis o frecuencia de las CTH (Comazzetto *et al.*, 2021). Independientemente de si las células periarteriolares Nestina+ NG2+ son una fuente de factores importantes, aproximadamente el 10% de las CTH están estrechamente asociadas a las arteriolas (que con los vasos sinusoidales), y esto ha planteado la cuestión de si las arteriolas y sinusoides crean nichos funcionalmente distintos que influyen en las propiedades de las CTH. Entre las principales diferencias destaca que contienen distintas concentraciones de oxígeno, la permeabilidad de la pared del vaso y la capacidad de las células hematopoyéticas para migrar a través de dicha pared (Crane *et al.*, 2017). Así mismo, Pinho y colaboradores (2018) demostraron que las CTH del nicho periarteriolar presentan un sesgo al linaje linfoide, lo que correlaciona con la reciente observación de que los nichos periarteriolares contienen un subconjunto de progenitores linfoides tempranos (Shen *et al.*, 2021).

Recientemente se ha propuesto la existencia de un “nicho megacariocítico sinusoidal”, después del hallazgo de que aproximadamente el 20% de las CTPH se ubicaban directamente adyacentes a los megacariocitos, que a su vez están íntimamente asociados con el endotelio sinusoidal de MO en ratones, y se ha demostrado que éstos están involucrados en el mantenimiento y actividad de las CTH, mediante la producción de moléculas como CXCL4 (Calvi & Link, 2015). Actualmente no está del todo claro si todos los nichos son realmente distintos y proporcionan funciones reguladoras únicas. Sin embargo, estos hallazgos demuestran que el nicho no es fisiológicamente estático, sino que responde a estímulos microambientales y está en constante remodelación, así mismo sus componentes celulares difieren cumpliendo funciones biológicas definidas.

Con base en lo anterior, se ha propuesto dividir los componentes celulares del nicho en dos principales grupos: *células de nicho esenciales*, cuyas función apoya y regula directamente a las CTH (como las células endoteliales y mesenquimales) y *células de nicho accesorias*, que se encargan de dar soporte a las CTH indirectamente (como macrófagos o células del sistema nervioso) (van Pel *et al.*, 2015; Crane *et al.*, 2017). La siguiente sección describe brevemente

la participación de los diferentes tipos celulares en el nicho de las CTH, haciendo particular énfasis en las células mesenquimales, que son uno de los tipos celulares utilizados en este trabajo.

Células endoteliales (CE)

Las CE son el principal componente de la vasculatura de la MO, particularmente las CE vasculares (que recubren la superficie interior de los vasos sanguíneos) son componentes claves del nicho de las CTH, ya que pueden promover la proliferación a través de la secreción de factores como SCF y la expresión de E-selectina; además, son capaces de inducir la diferenciación celular y movilización de las células primitivas en modelos de ratón, mediante la señalización de angiopoyetina/Tie2 posterior a la mielosupresión. Las CE también se involucran con procesos de autorenovación al expresar *Notch* y sus ligandos como Jagged-1 que estimula el mantenimiento, así como CXCL12 y pleiotrofina (PTN) que promueven la retención de las CTH en MO (van Pel *et al.*, 2015; Lampreia *et al.*, 2017; Torres-Barrera *et al.*, 2021).

Células neuronales

Se han identificado algunos mecanismos por los que las fibras nerviosas y células de Schwann contribuyen a la regulación de las CTH. Las fibras nerviosas pueden regular procesos como el ritmo circadiano que influye en la movilización de las CTH desde MO hacia sangre periférica. Curiosamente, los estudios murinos muestran una salida de CTPH basada en el ritmo circadiano que se asemeja con lo reportado en estudios en humanos lo que demuestran una liberación similar de CTPH en sangre periférica sugiriendo que la inervación del nicho CTH ocurre a través de mecanismos similares (Lucas *et al.*, 2008).

Si bien las fibras nerviosas no están directamente asociadas con las CTH, las terminales nerviosas eferentes hacen sinapsis en un subconjunto de células estromales perivasculares (MSC Nestina+) asociadas a sinusoides que presentan receptores β 3-adrenérgicos generando señales capaces de regular negativamente diferentes factores de retención hematopoyética como CXCL12, angiopoyetina 1 (Angpt1) y la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) (Méndez-Ferrer *et al.*, 2008). Por otra parte, las células de Schwann no mielinizantes regulan la activación proteolítica del factor de crecimiento transformante β (TGF β) de MO que promueve el mantenimiento de las CTH (Yamazaki *et al.*, 2011). No obstante, se sabe poco sobre la naturaleza de estas señales y/o los mecanismos por los cuales podrían propagarse a través de las redes de las células del estroma.

Megacariocitos

Esta población celular hematopoyética se localiza cerca de sinusoides y suelen estar asociados a las CTH, donde producen TGF β 1, CXCL4 y trombopoyetina (TPO) promoviendo la quiescencia celular (van Pel *et al.*, 2015), lo que correlaciona con experimentos en ratones donde la ablación condicional de megacariocitos conduce a la disminución de TGF β 1 que a su vez promueve la activación de CTH quiescentes, así como su proliferación a través de la señalización de TGF β 1-SMAD. Aunado a esto, se ha demostrado que después de la mieloablación, los megacariocitos en respuesta al estrés son capaces de promover la regeneración de las CTH mediante la señalización del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1), una citocina que regula la señalización inhibitoria de TGF β 1 para promover la expansión de las CTH (Zhao *et al.*, 2014).

Macrófagos

Se ha demostrado que en la región endóstica de la MO se alberga una población de macrófagos que participan en la diferenciación y mineralización de los osteoblastos, lo que contribuye al mantenimiento de los nichos en MO. La eliminación de la población de macrófagos óseos en modelos de ratones transgénicos resulta en la supresión de la función de osteoblastos y la posterior movilización de las CTH a circulación (Winkler *et al.*, 2010). Estos hallazgos, han llevado a proponer que los macrófagos contribuyen indirectamente al mantenimiento de las CTH mediante el uso de otras células del nicho que utiliza como intermediarios.

Células estromales mesenquimales (MSC)

Las MSC constituyen el 0.01-0.001% de células nucleadas en medula ósea adulta y son una población celular altamente heterogénea que proporcionan un microambiente adecuado para la proliferación y diferenciación de las poblaciones hematopoyéticas. Son poblaciones adherentes en cultivos *in vitro*, clonogénicos, no fagocíticos y forman colonias similares a fibroblastos que se han denominado unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Dazzi *et al.*, 2006). Semejante a lo reportado en la jerarquía hematopoyética y basados en la evidencia de que esta población presenta una multipotencialidad, se ha reportado que las MSC dan origen a células del estroma medular como fibroblastos estromales, células reticulares, adipocitos y osteoblastos, proponiendo la existencia de una célula troncal mesenquimal, de las que derivan células progenitoras multipotentes. Sin embargo, esta propuesta ha sido debatida ya que no se cumplen los criterios estrictos que describen a las células troncales, como es la autorenovación a largo plazo, que no se ha podido evidenciar experimentalmente así como la secuencia exacta de diferenciación, por ello, se ha propuesto el termino de “células estromales mesenquimales multipotentes” que abarca una población heterogénea de células que cubre varios subconjuntos de MSC con diferentes grados de “troncalidad”, fenotipos y funciones (Dazzi *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Aristizábal *et al.*, 2014).

En medula ósea las MSC participan en la formación de estructuras y en la organización del microambiente hematopoyético, y se les conoce como el componente celular más importante del nicho de las CTH ya que a éstas se les ha localizado muy cerca de subconjuntos específicos de MSC (Flores-Figueroa *et al.*, 2012), con roles diferenciales en el soporte de las CTH mediados por marcadores únicos y producción de factores específicos, que regulan la autorenovación, diferenciación y mantenimiento a través de interacciones de célula-célula, moléculas de adhesión, producción y liberación de citocinas, quimiocinas y activación de señales reguladoras (Sugiyama *et al.*, 2006). En medula ósea murina tanto las MSC y su progenie inmediata, que incluye células perivasculares reticulares (CXCL12 CAR+), Nestina+ y receptor de leptina+ (RLep+) son generalmente vistos como los reguladores clave en el nicho de CTH, siendo las MSC Nestina+ las más primitivas con un potencial de diferenciación de tres linajes, mientras que las MSC CXCL12 CAR+ presentan un potencial de dos linajes (adipo-osteogénico) y las MSC RLep+ representan las células más diferenciadas (Pleyer *et al.*, 2016).

En medula ósea humana, Sacchetti *et al.*, (2007) identificaron una subpoblación mesenquimal CD146+ que representa aproximadamente el 0.11% de las células nucleadas de MO, y que se localizaban en las paredes de los sinusoides venosos, además de expresar CD105, fosfatasa alcalina, y altos niveles de Jagged-1, N-cadherina, CXCL12 y SCF. Dicha población al ser trasplantada en ratones inmunocomprometidos fue capaz de formar hueso y adipocitos, así como de inducir la actividad hematopoyética. Ante estas evidencias se ha sugerido que estas MSC CD146+ podrían ser la contraparte humana de las MSC CAR+ de modelos murinos, que además presentan algunos otros marcadores asociados a la troncalidad, incluidos Stro-1, SSEA-4 y CD271 (Feng-Juan *et al.*, 2014).

Dado que las MSC producen una amplia gama de moléculas reguladoras de la hematopoyesis, y forman parte de los diferentes nichos tanto en medula ósea murina como humana, se ha propuesto relacionarlas con el término de “soporte hematopoyético”, ya que desde la descripción inicial de Dexter *et al.*, (1977) en donde se reportó que las células estromales favorecían la expansión de las células hematopoyéticas, surgieron varios estudios posteriores que demostraron que las MSC en cocultivo promueven el crecimiento *in vitro* de poblaciones celulares hematopoyéticas CD34+ de SCU, dando como resultado la expansión y mantenimiento de las células progenitoras hematopoyéticas que además presentaron una capacidad de reconstitución multilinaje a corto plazo tras su trasplante en ratones inmunodeficientes (Yamaguchi *et al.*, 2002). Así mismo, las células CD34+ cocultivadas con MSC muestran una recuperación más rápida de neutrófilos y plaquetas tras ser trasplantadas en humanos, en comparación con las CTH sin cocultivo previo (De Lima *et al.*, 2012).

Entre las moléculas que son producidas por las MSC se encuentra la TPO (importante para regular la quiescencia de las CTH), SFC y el ligando de tirosina cinasa 3 tipo FMS (Flt3-L) que favorecen el mantenimiento y autorenovación de las CTH respectivamente; citocinas como IL-6, IL-11, factor de crecimiento de macrófagos (M-CSF) y factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) asociadas a la maduración y compromiso a linaje.

Las moléculas de adhesión también juegan un papel importante en la movilización/permanencia y proliferación de las CTH ya que las MSC expresan diferentes moléculas de adhesión como N-

cadherina, E-selectina, VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, ALCAM, LFA-3. Por otra parte, no solamente la población mesenquimal se restringe a la producción de moléculas de soporte hematopoyético, sino que también produce diferentes moléculas de la matriz extracelular (MEC) tales como colágena I, fibronectina, laminina y OPN, importantes en la adhesión, mantenimiento y proliferación de las CTH, así como de la estructura espacial de los nichos hematopoyéticos (Sugiyama *et al.*, 2006; Li & Wu, 2011; van Pel *et al.*, 2015).

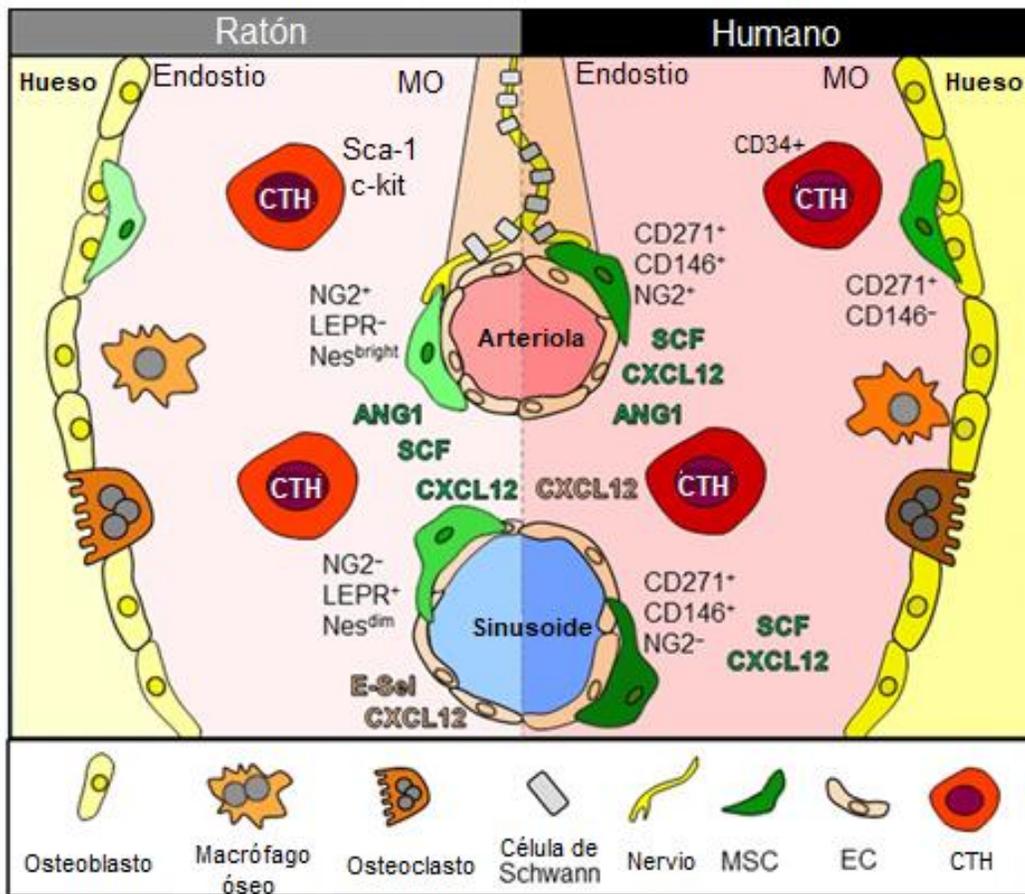


Figura 2. Organización del nicho de las células troncales hematopoyéticas en ratones y humanos. Representación esquemática del microambiente en la MO de ratón (izquierda) y humano (derecha), que muestra varias células de nicho con sus respectivos factores secretados (codificados por colores verde y rosa) que regulan el destino y función de las CTH. Así mismo se muestran los marcadores que identifican a las CTH de ratón y humano, así como las diferentes subpoblaciones de MSC son indicadas en negro. Imagen tomada y modificada de van Pel *et al.*, 2015.

3.3 Remodelación del microambiente en médula ósea en la enfermedad

Dado que el microambiente hematopoyético no es estático, la composición de las células del estroma en medula ósea cambia con el tiempo entre el período posnatal, la edad adulta y el envejecimiento, de tal modo que muchas células estromales que persisten después del nacimiento se agotan en la edad adulta. De acuerdo con estos cambios en el estroma, la composición celular del nicho de las CTH también cambia. Así mismo, el nicho de las CTH puede remodelarse drásticamente en respuesta a estrés hematopoyético, como es la mieloablación (p.ej. resultado de la quimioterapia) o cambios fisiológicos (p. ej. embarazo, infecciones, anemia) e incluso cuando la hematopoyesis es insuficiente en medula ósea se induce la hematopoyesis extramedular (principalmente en el bazo o hígado), que implica la formación de nichos facultativos durante la edad adulta que persisten solo mientras sea necesario con el fin de aumentar las necesidades de producción de sangre (Comazzetto *et al.*, 2021). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias el microambiente puede sufrir cambios que pueden conducir a una desregulación en el sistema hematopoyético dando lugar a un “microambiente maligno” que se ha asociado con la aparición, progresión y mantenimiento de diversas enfermedades como se ha sugerido para síndromes mielodisplásicos (SMD) y Leucemia Mieloide Aguda (Calvi & Link, 2015).

Estudios recientes sugieren un papel importante del microambiente de la médula ósea en el inicio y/o la progresión de las neoplasias malignas hematopoyéticas. El concepto de un “microambiente maligno” incluye cómo éste se extiende y desplaza gradualmente al microambiente normal alterando y suprimiendo la hematopoyesis normal, aunque su etiología aún no ha sido totalmente caracterizada. Sin embargo, la modificación en la secreción de varias quimiocinas y citocinas inflamatorias por parte de las diferentes poblaciones celulares del estroma medular o extramedulares (provenientes de circulación), contribuyen al cambio en el nicho de CTH en un microambiente permisivo a la enfermedad, que aunado a un sistema inmunológico alterado, interacciones anormales en el nicho de células troncales y un control de crecimiento deteriorado conducen a la progresión maligna (Calvi & Link, 2015; Pleyes *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que, al tratarse de una interacción bidireccional entre las diferentes poblaciones celulares y el microambiente medular, se han planteado dos principales hipótesis en relación con el inicio de las patologías hematológicas: *I)* la remodelación del nicho normal a uno maligno (de etiología multifactorial), que promueve la generación de alteraciones potencialmente genotóxicas u oncogénicas y que eventualmente altera a las CTH y la hematopoyesis normal. Esta idea es respaldada por estudios en los que se demuestra cómo es que las leucemias pueden originarse en un receptor trasplantado, donde la presión selectiva presente en el microambiente del receptor puede generar alteraciones en las células trasplantadas dando paso a una hematopoyesis maligna (Sala-Torra *et al.*, 2006) o *II)* que las células malignas que sean capaces de transformar el nicho normal, dando paso a una remodelación gradual y constante del microambiente hasta evolucionar a una alteración extendida, modificando con ello a las poblaciones tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas normales permitiendo su expansión (Méndez-Ferrer *et al.*, 2020). Un ejemplo

de esta situación es la planteada por Arranz *et al.*, (2014) quienes demostraron que CTH mutante (a través de la expresión de IL-1 β), inhibían la producción de receptores β 3-adrenérgicos de nervios simpáticos en MO de un modelo murino (JAK2 V617F1-NMP), lo que resultó en el agotamiento de las células estromales Nestina-GFP+ y con ello, se permitía la progresión acelerada hacia una neoplasia mieloproliferativa (NMP).

Los modelos murinos han demostrado que modificaciones en el microambiente de MO pueden iniciar una enfermedad mieloproliferativa, al generarse alteraciones ya sea por factores intrínsecos (mutaciones) ó extrínsecos (influencia del nicho), que puede dar origen al desarrollo de diversas enfermedades hematológicas que incluyen las NMP, síndrome mielodisplásico y leucemias. En ese sentido, Raajmakers *et al.*, (2010) mostraron que la eliminación de *Dicer1* en osteoprogenitores murinos da como resultado el desarrollo de hematopoyesis displásica, con un fenotipo similar a síndrome mielodisplásico que en etapas más avanzadas permite la adquisición de mutaciones genéticas generando la expansión del clon displásico y eventualmente da lugar al desarrollo de otras enfermedades como leucemia (Balderman & Calvi, 2014; Pleyer *et al.*, 2016).

3.4 Leucemias

Las leucemias comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias sanguíneas que se caracterizan por una producción anormal de células hematopoyéticas. La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica a las neoplasias hematológicas malignas según el linaje de origen de la célula neoplásica en mielóide o linfóide y de acuerdo con su estado de presentación y desarrollo como agudas o crónicas; además de considerar sus características clínicas, morfológicas, genéticas y estado de madurez pudiendo distinguirse formas en donde las poblaciones finales son células maduras, como en la leucemia linfocítica crónica (LLC) o células progenitoras de diversos linajes y distintos estados de maduración, como la leucemia mielóide aguda (LMA) (Arber *et al.*, 2016).

Éstas se presentan en todas las edades, pero las diferentes formas tienen distribuciones características, ya que mientras la LLA se presenta principalmente en niños, la LMA puede detectarse en un amplio rango de edad y la Leucemia mielóide crónica (LMC) es mayoritariamente un padecimiento de adultos maduros y/o mayores. Si bien estas patologías no se han asociado con un único agente etiológico, algunas condiciones fisiopatológicas como el SMD, infecciones, mutaciones puntuales, la edad, o enfermedades relacionadas con la terapia (p. ej. quimioterapia y radiación), se han vinculado con el desarrollo de leucemias (Stark *et al.*, 2016).

En el caso particular de las leucemias mieloides (LMA y LMC) se ha demostrado que su origen parte de una población troncal leucémica (CTL) (Lapidot *et al.*, 1994; Holyoake *et al.*, 1999), capaz de iniciar y mantener la enfermedad a largo plazo, cuando son trasplantadas a animales inmunodeficientes (trasplantes en serie), pudiendo diferenciarse en blastos (células inmaduras) que asemejan a la enfermedad original pero que han perdido la capacidad de autorenovarse. Las CTL al igual que su contraparte normal, expresan el antígeno CD34, carecen de CD38, y

no presentan ningún marcador específico de linaje (Lin-). Además, presentan capacidad de autorenovación y forman descendencia multilínea siguiendo también una organización jerárquica (hematopoyesis leucémica). Las CTL pueden permanecer en estado quiescente, mecanismo que se ha sugerido como el responsable de la falta de respuesta y fallas al tratamiento a diferentes agentes terapéuticos. Así mismo, esta población leucémica troncal puede permanecer en nichos protectores específicos dentro de la médula ósea, donde tienen un microambiente óptimo propicio para expandirse y desarrollar mecanismos de resistencia a terapia e inducir la recaída de la enfermedad (Chávez-González *et al.*, 2009; Thomas & Majeti, 2017; Torres-Barrera *et al.*, 2021).

3.5 Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

La LMC es una enfermedad mieloproliferativa clonal que, de acuerdo con la clasificación de la OMS, y considerando las características clínico-patológicas se estadifican en 3 fases (Figura 3). Comienza por la fase crónica, donde se presenta un incremento de células sanguíneas que retienen su capacidad de diferenciación y pueden llevar a cabo sus funciones biológicas de forma normal. Esta etapa muestra presencia de blastos no mayor al 10% en MO, por tanto, los síntomas en el paciente pueden controlarse con facilidad, y dado a que esta fase puede durar años, este es un motivo por el cual los pacientes suelen ser identificados por hallazgos casuales de un recuento elevado de glóbulos blancos en un examen de salud de rutina. Sin embargo, sin una intervención médica eficaz y oportuna, la enfermedad evoluciona a la fase acelerada que presenta entre 10 a 19% de blastos en MO o sangre periférica (SP). En ella, las células experimentan otras mutaciones y anomalías cromosómicas (inestabilidad genómica), y en consecuencia el paciente presenta sintomatología más evidente como esplenomegalia (crecimiento del bazo). Esta fase de transición puede durar semanas, hasta que finalmente transita a la fase blástica, con la presencia de $\geq 20\%$ de blastos en SP y MO, así como infiltración blástica extramedular en cualquier órgano o tejido. Así mismo se siguen acumulando mutaciones y anomalías en el cariotipo, por lo que la vida del paciente se reduce a semanas, si éste no recibe tratamiento (Apperley, 2015; Haznedaroğlu *et al.*, 2020).

Biología molecular

La LMC se caracteriza por la translocación recíproca de los brazos largos de los cromosomas 9 (Ch9) y 22 (Ch22). Este cromosoma anormal fue observado por primera vez por Janet Rowley en Filadelfia, Estados Unidos, y de ahí que se denomine “*Cromosoma Filadelfia*” (Ph, por sus siglas en inglés “*Philadelphia chromosome*”). Esta traslocación da como resultado la yuxtaposición del gen *ABL* (Ch9) con el gen *BCR* (Ch22) que genera el oncogén de fusión *Bcr::Abl1*, el cual es transcrito a un RNAm que finalmente se traduce a una proteína quimérica de 210 kDa Bcr-Abl1 (p210^{Bcr-Abl}). Por un lado, *ABL1* codifica una proteína tirosina cinasa no receptora que fosforila las proteínas sustrato a través de su dominio SH1, de esta forma modifica diferentes vías de señalización celular generando aumento de la proliferación, pérdida de la adhesión y resistencia a apoptosis. Así mismo, a través de la pérdida de elementos de control,

Bcr-Abl1 es capaz de fosforilarse, y tener actividad constitutiva que envía señales descontroladas a una gama de proteínas río abajo en la señalización celular (Apperley, 2015).

El gen *BCR*, por su parte, codifica a una proteína ubicua de 160 kDA que posee actividad serina-treonina cinasa, que actúa sobre la proteína Bap1, miembro de una familia de proteínas reguladoras del ciclo celular. Aunado a esto la región central de Bcr contiene una zona que estimula el intercambio de GTP por GDP, mientras que en el extremo carboxilo terminal presenta actividad de GTPasa para Rac, un miembro de la superfamilia Ras, que regulan la polimerización de actina (Chávez-González *et al.*, 2009).

Aunado a la inestabilidad genómica y estrés replicativo (Tubbs & Nussenzweig, 2017; Flach & Milyavsky, 2018) generada por la presencia del cromosoma Filadelfia, también se han descrito otros cambios moleculares y citogenéticos relacionados con la evolución de la LMC, por ejemplo, en aproximadamente 80% de los casos también hay alteraciones en otros cromosomas como el 8 y 17 (Chávez-González *et al.*, 2009; Giam & Rancati, 2015). En el caso del cromosoma 8, éste puede presentar trisomía, lo que se ha asociado con una sobre-expresión del oncogén *MYC* y la evasión de señales antiproliferativas. Así mismo, también se ha detectado un rearrreglo o pérdida del cromosoma 17, que conlleva a la pérdida de la función supresora de TP53 (Guinn & Mills, 1997). De esta forma, la célula leucémica puede también evitar la apoptosis mediante el aumento de expresión de reguladores antiapoptóticos (p. ej. Bcl-2 y Bcl-xL) y la disminución de elementos proapoptóticos (p. ej. BAX, PUMA y BAD) (Popp *et al.*, 2010).

Aspectos biológicos de las CTL y su microambiente

Dado que la LMC tiene origen a partir de una CTL Ph+ que, a diferencia de las células troncales normales, presentan alteraciones en sus mecanismos de respuesta a los diferentes estímulos provenientes del microambiente, provoca su expansión generando grandes números de progenitores y precursores anormales Ph+, que en consecuencia final genera un elevado número de células sanguíneas circulantes. Este incremento celular leucémico tanto en MO como en SP, desplaza la actividad y respuesta de la población residual hematopoyética normal que, aunque en números extremadamente bajos, nunca deja de existir. Otra alteración detectada en subpoblaciones hematopoyéticas de LMC es la pérdida de la adhesión celular al estroma de la MO, lo que conduce que células progenitoras y precursoras inmaduras salgan a circulación. Por ejemplo, el aumento de la expresión de CD26 en CTL interrumpe la interacción SDF1-CXCR4 liberando a las CTL hacia la circulación. Además, se ha descrito que la producción autocrina de G-CSF (un antagonista de SDF1) por las células leucémicas, puede facilitar su liberación (Chávez-González *et al.*, 2009; Houshmand *et al.*, 2019).

Desde un punto de vista metabólico, datos de transcriptoma de una sola célula sugieren una sobre-expresión de genes asociados con la glucólisis en las CTL de LMC en comparación con las CTH (Giustacchini *et al.*, 2017), además de una mayor lipólisis y oxidación de ácidos grasos con mayores niveles de glicerol-3-fosfato, carnitina y derivados de acilcarnitina y una disminución de los ácidos grasos libres en comparación con las células de LMC diferenciadas.

Además, las CTL también presentan un aumento de la fosforilación oxidativa mitocondrial mediada por la regulación positiva de genes implicados en el metabolismo oxidativo (Houshmand *et al.*, 2019).

Junto con todos estos cambios y el desbalance entre la hematopoyesis normal y leucémica, la médula ósea sufre de cambios tanto morfológicos como fisiológicos (Figura 3, A-H), que se traducen en alteraciones del microambiente en MO, alteraciones que se sugiere son consecuencia de la actividad de las CTL y su progenie, ya que estas células podrían remodelar su propio microambiente potenciando su proliferación, autorenovación, supervivencia y evasión de la respuesta inmune (Tarafdar *et al.*, 2017).

En ese sentido, varios modelos experimentales han demostrado que la secreción de varias quimiocinas y citocinas inflamatorias por parte de las células leucémicas establece una red de comunicación celular que interfiere con las decisiones sobre el destino celular de las células primitivas normales y leucémicas mediante la activación de mecanismos paracrinos y autocrinos. Por ejemplo, las células CD34+ de LMC pueden secretar IL-6 y G-CSF, relacionadas con la diferenciación mieloide a través de la estimulación de STAT5 (Jiang *et al.*, 1999; Reynaud *et al.*, 2011), además, las CTPH Ph+ pueden producir TNF- α que estimula y mejora la producción de IL-3 asociada al aumento de la proliferación (Gallipoli *et al.*, 2013). Toda esta gama de moléculas producidas por las células leucémicas contribuyen a su auto-mantenimiento, a la par de generar una remodelación del microambiente circundante, dando lugar a un microambiente leucémico permisivo para su desarrollo (Torres-Barrera *et al.*, 2021).

Tratamiento de la LMC

La asignación y eficiencia de un tratamiento para una enfermedad está determinada por distintos criterios. En la LMC, actualmente se incluyen parámetros hematológicos, citogenéticos y moleculares para definir la terapia; no obstante, las primeras opciones para combatir la enfermedad fueron propuestas desde el siglo XIX cuando se utilizaban compuestos que contenían arsénico para reducir el alto número celular. Posteriormente en el siglo XX, la irradiación del bazo fue utilizada para reducir la esplenomegalia, pero ésta fue desplazada en 1960 por agentes alquilantes como busulfán; sin embargo, al ser mutagénico e inducir a la crisis blástica, fue reemplazado por el inhibidor de ribonucleótido reductasa: hidroxicarbamina, pero ni ésta, ni el busulfán lograban retrasar la progresión de la enfermedad. Por tanto, en la década de 1970, surgieron dos estrategias de tratamiento completamente diferentes e innovadoras: el uso de interferón α y el trasplante alogénico de CTH, los cuales lograron una supervivencia prolongada de los pacientes y en ciertos casos la negatividad de células Ph+.

Desafortunadamente, el uso de interferón α presentaba una variedad de efectos secundarios que interferían con la calidad de vida de los pacientes, y aunque éste fue probado en combinación de otros agentes como la citarabina, con buenos resultados, su toxicidad no permitía su uso a largo plazo. En el mismo sentido, aunque el alotrasplante en la década de 1990 era el tratamiento de primera línea para pacientes elegibles en fase crónica y acelerada temprana, éste involucraba regímenes preparatorios de mieloablación (con irradiación corporal

total o busulfano) seguido de infusión de CTH de donantes sanos, y pese a que esta estrategia terapéutica mostraba una supervivencia a largo plazo y una probable curación (sobre todo si se realizaba en la fase crónica de la enfermedad), esta opción fue restringida a pacientes jóvenes con donantes totalmente compatibles con HLA, debido a la mortalidad relacionada con el trasplante a causa de la enfermedad de injerto contra hospederio (Chávez-González *et al.*, 2009; Apperley, 2015; Haznedaroğlu *et al.*, 2020).

En 1996, Druker y colaboradores demostraron el efecto de la inhibición de la proliferación e inducción de apoptosis de la 2-fenilaminopirimidina Abl1, entonces conocida como inhibidor de la transducción de señales 571 (STI571), hoy en día Imatinib, sobre líneas celulares de LMC; este hecho marcaría una nueva era en el tratamiento de la LMC ya que la mayoría de los pacientes reducían los niveles de proliferación leucémica y las clonas anormales Ph+ hasta que eran prácticamente indetectables, razón por la cual el Imatinib representa la primera generación de tratamiento de los Inhibidores de Tirosina Cinasa (TKI, por sus siglas en inglés *Tyrosine Kinase Inhibitor*) de Bcr-Abl, que posteriormente fue seguido por dasatinib y nilotinib (segunda generación), que son utilizados en pacientes insensibles o refractarios a Imatinib. Actualmente existen otros agentes TKI como bosutinib, y más recientemente el medicamento de tercera generación, ponatinib que, junto con los anteriores, han marcado una gran diferencia en el tratamiento, pues se trata de fármacos orales que se administran diariamente e inducen su efecto máximo de forma gradual (Apperley, 2015).

Como lo indica su nombre los inhibidores de tirosina cinasa, son un grupo de agentes farmacológicos que interrumpen las vías de transducción de señales de las proteínas quinasas mediante varios modos de inhibición (Thomson, *et al.*, 2022). En LMC funcionan inhibiendo la actividad bioquímica de p210^{Bcr-Abl} mediante el bloqueo del sitio de unión de ATP en el dominio cinasa Abl1, lo que evita su fosforilación y las activación de las múltiples cascadas de señalización río abajo, por tanto, induce muerte celular de las células leucémicas. Éste mecanismo permite que en el paciente haya restauración de la hematopoyesis normal en lugar de la proliferación neoplásica mieloide y adquisición de nuevas mutaciones por la inestabilidad inducida por *Bcr::Abl1*, así mismo la celularidad tanto en médula ósea (Figura 3, I y J) como en sangre periférica pueden regresar a la normalidad (Apperley, 2015; Haznedaroğlu *et al.*, 2020; Avilés-Vázquez *et al.*, 2013).

Si bien el uso de TKI ha aumentado considerablemente la supervivencia y calidad de vida de los pacientes tratados con estos fármacos, una fracción de éstos pueden eventualmente dejar de responder al tratamiento y recaer en la enfermedad, o presentar intolerancia debido a su toxicidad, esta última se ha manejado variando las dosis de TKI empleadas; sin embargo, la resistencia ha resultado mucho más compleja de combatir. La razón, es que se han descrito múltiples mecanismos que desarrollan las células leucémicas y les permiten generar resistencia a los diferentes TKI. Entre los principales mecanismos descritos se encuentran: la presencia de mutaciones que afectan el sitio de unión entre el fármaco y el dominio de cinasa de Bcr-Abl, estas mutaciones son diversas y afectan diferentes aminoácidos, por ejemplo, la mutación T315I, genera que la cadena lateral de isoleucina no forme un enlace de hidrógeno, provocando un impedimento estérico para la unión del fármaco con la proteína quimérica y las células

portadoras de la mutación son seleccionadas y se expanden aún en presencia del inhibidor (Chahardouli *et al.*, 2013; Best-Aguilera *et al.*, 2018).

Por otra parte la sobreexpresión del gen *Bcr::Abl1* aumenta la cantidad de p210^{Bcr-Abl} y por tanto la dosis terapéutica del fármaco se hace insuficiente, dado que no es capaz de inhibir al 100% la actividad de esta enzima quimérica. Así mismo, la resistencia a fármacos también se ha asociado a la presencia de ciertos transportadores como los de la familia ABC, que reducen significativamente la concentración intracelular de los TKI, y justo Imatinib resulta ser un sustrato de varios miembros de esta familia de transportadores como ABCB1 y ABCG2. En contraste, OCT-1 un transportador implicado en el transporte activo de imatinib hacia el interior de las células se encuentra disminuido en población leucémica incluidas las células leucémicas CD34+ CD38-, lo que reduce su concentración y, por tanto, su efecto (Avilés-Vázquez *et al.*, 2013; Best-Aguilera *et al.*, 2018).

Además de estos mecanismos, es importante considerar que una característica de la LMC es la presencia de una población de células primitivas altamente quiescente, que eventualmente pueden salir de este estado a uno proliferativo. Aparentemente, las CTL Ph+ inactivas no dependen de la actividad de Bcr-Abl1 para su supervivencia y persisten incluso durante el tratamiento efectivo con TKI que actúa sobre poblaciones metabólicamente activas, por lo que la interacción de esta población primitiva leucémica con su microambiente circundante y sus características se ha vuelto un punto central y cada vez más reconocido como un mecanismo asociado a la recaída de la enfermedad y falta de respuesta al tratamiento (Avilés-Vázquez *et al.*, 2013; Rea & Mahon, 2018). Por esta razón, numerosos estudios se han enfocado a entender la participación puntual de las diferentes poblaciones celulares no hematopoyéticas que conforman el microambiente y los nichos patológicos que resguardan y protegen a las CTL de LMC, siendo el microambiente mesenquimal uno de los más estudiados.

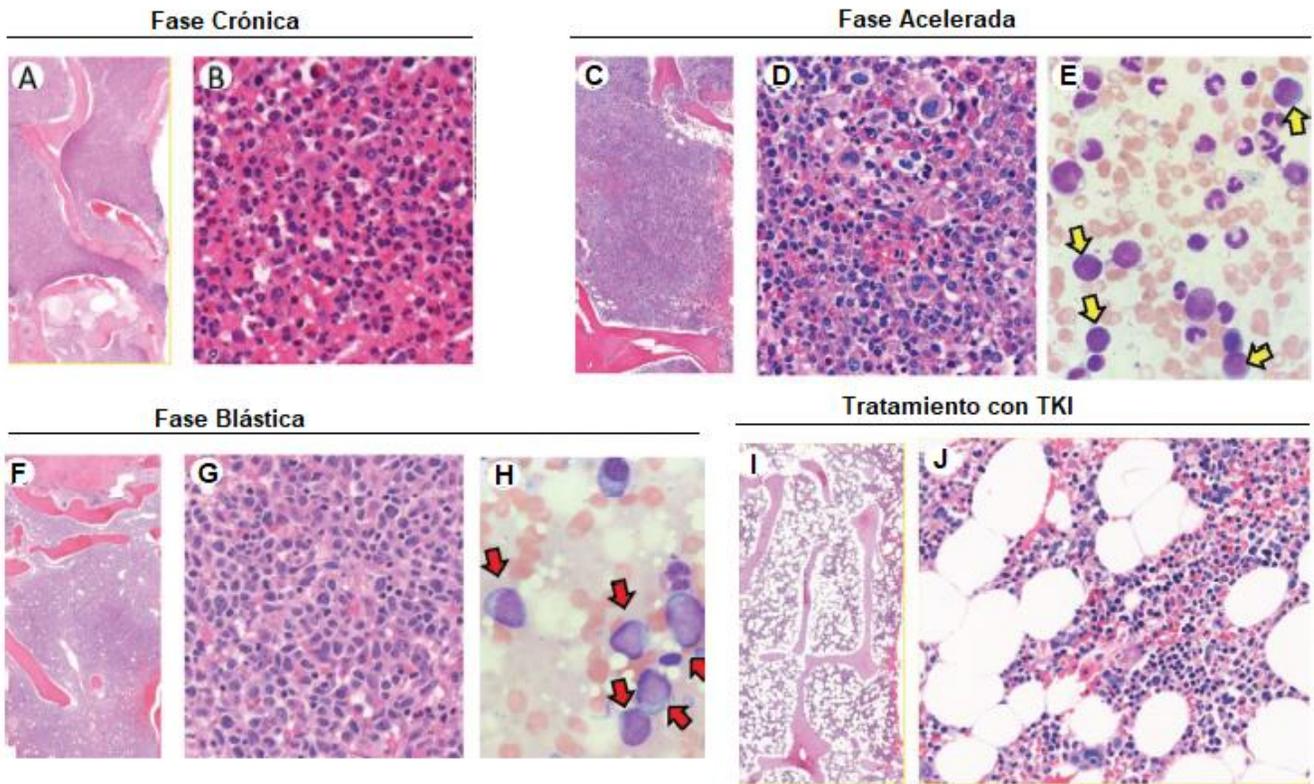


Figura 3. Biopsia de médula ósea humana en las diferentes fases de Leucemia mieloide crónica y tratamiento con Inhibidores de la tirosina cinasa. La fase crónica presenta una hiper celularidad en MO (A) la mayoría compuestas por granulocitos maduros y sus precursores (B). La fase acelerada se caracteriza por un aumento de blastos (10-19%) (E, flechas amarillas) y/o megacariocitos que promueven la fibrosis (C y D). En la última etapa de la enfermedad (Fase blástica) la presencia de blastos es dominante tanto en MO (F y G) como en aspirados de esta (H, flechas rojas). El tratamiento con TKI permite la disminución de la celularidad en aquellos pacientes que responden al tratamiento mostrando una médula ósea aparentemente normal (I y J). Imagen tomada y modificada de Haznedaroğlu *et al.*, 2020.

3.6 MSC de LMC

La participación del componente mesenquimal sobre el desarrollo tumoral ha llamado la atención desde hace tiempo, de tal modo que se ha caracterizado su función biológica en diferentes tumores sólidos epiteliales, donde pareciera favorecer el crecimiento tumoral mediante procesos como: la evasión de la respuesta inmune, promover la transición epitelio-mesénquima, inducir la proliferación e inhibir la apoptosis de las células tumorales, así como inducir la metástasis (Poggi *et al.*, 2014).

En el caso de neoplasias malignas mieloides, inicialmente se pensaba que el componente mesenquimal no presentaba mayores cambios en la médula ósea leucémica, ya que desde un punto de vista morfofuncional parecía no alterarse la diferenciación, adhesión y expresión de marcadores, incluso la supervivencia y soporte hematopoyético *ex-vivo*, eran aparentemente normales (Korn & Méndez-Ferrer, 2017). Sin embargo, los estudios recientes de secuenciación, perfiles de expresión y transcriptómicos han puesto en descubierto que a diferencia de su contraparte normal, durante las enfermedades hematológicas como SMD y leucemias mieloides, las MSC sufren alteraciones a nivel epigenético, genético y de cariotipo, que generan cambios en su fisiología e inducen diferenciación a un linaje determinado, producción aberrante de moléculas y de exosomas con diferentes elementos reguladores e interacciones defectuosas con el componente hematopoyético (Blau *et al.*, 2007; Korn & Méndez-Ferrer, 2017; Kumar *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2021).

Las consecuencias funcionales de estas alteraciones en MSC aún se encuentran en estudio, así como también se evalúa si estas alteraciones son factores predisponentes, iniciadores y/o de soporte de la enfermedad. Un ejemplo de ello es el caso de las MSC de MO de pacientes con LMC de las que poco se sabe sobre sus efectos biológicos; algunos reportes han demostrado que el estroma (el cual involucra una población celular heterogénea y no solo MSC) de LMC genera un microambiente diferente a su contraparte normal, y que éste afecta la proliferación de las CTH normales, mientras que la proliferación de las CTL permanece inalterada (Bhatia *et al.*, 1995). En ese sentido, algunos mecanismos que parecen estar involucrados es que las CTL de LMC secretan exosomas que contienen anfirregulina, que activa la vía del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células del estroma, esta interacción aumenta la secreción de IL-8, lo que facilita la adhesión de las CTL a las MSC favoreciendo su supervivencia (Corrado *et al.*, 2016).

Por otro lado, las MSC también se han asociado con mecanismos de resistencia a los TKI, por ejemplo, Zhang y colaboradores (2013) demostraron que el aumento en la actividad de la vía Wnt/ β -catenina mediante la unión de N-Cadherinas de las MSC, confiere a las CTL protección de los TKI. Sin embargo, existen otros reportes que muestran lo contrario, Zhu y colaboradores (2009) demostraron que DKK-1 (*dickkopf-1*) era secretado por MSC de MO y actúa como un regulador negativo de la vía de señalización de WNT, inhibiendo la proliferación de células leucémicas K562.

El contraste encontrado en los diferentes estudios sobre MSC y CTH (tanto normales como leucémicas), probablemente se deba a la gran variedad de modelos tanto *in vivo* como *in vitro*.

En relación con este punto, existe evidencia en modelos *in vitro* que postulan que una fracción de MSC de MO leucémica conservan la capacidad de contrarrestar el crecimiento de las células leucémicas pese la influencia del microambiente leucémico (Wei *et al.*, 2009). En cambio, otros reportes han manejado que las MSC leucémicas sufren alteraciones que se conservan aún cuando éstas ya no están expuestas a una MO leucémica, como lo que ocurre en pacientes con una respuesta molecular profunda inducida por el tratamiento TKI, o que son expandidas *in vitro* por varios pasajes, alterando así su función a largo plazo (Aggoune *et al.*, 2017). Así mismo, en modelos murinos, se observó la existencia de grupos anormales de MSC después de 8 semanas posteriores al establecimiento de la LMC. Además, estos grupos de células se encontraban enriquecidas en células primitivas c-Kit+ (Agarwal *et al.*, 2019). Estos distintos hallazgos mantienen la controversia de si las alteraciones en las MSC están dadas por el crecimiento leucémico o si sucede de forma contraria, si son las células leucémicas las que alteran su propio nicho.

Aunado a esto, es importante considerar que existe poca información que correlacione el efecto que tienen las MSC de MO normal provenientes de diferentes etapas etarias sobre la hematopoyesis normal y/o leucémica, además muy probablemente las interacciones que se establezcan entre ellas pudieran estar relacionadas con la mayor o menor incidencia de tipos específicos de leucemia en los diferentes rangos de edad, de manera que el estudio de la interacción de la hematopoyesis con diferentes componentes y estados del microambiente es un área de gran interés.

4. JUSTIFICACIÓN

Anteriormente se pensaba que las neoplasias malignas hematológicas se debían únicamente a lesiones genéticas o epigenéticas dentro de las células hematopoyéticas. Sin embargo, el microambiente de la médula ósea se ha vuelto un punto central de investigación que está demostrando una gran importancia en la fisiopatología de enfermedades hematológicas como las leucemias.

En la leucemia mieloide crónica, los Inhibidores de tirosina cinasa han mejorado notablemente la supervivencia y calidad de vida de los pacientes, sin embargo, una fracción de ellos no responde o desarrolla mecanismos de resistencia a la terapia y uno de los elementos que parece estar involucrado, es la interacción de las células troncales leucemias con su microambiente, el cual provee protección y condiciones propicias para su mantenimiento.

Por esta razón, el generar información sobre la relación que guardan las células leucémicas con distintos componentes del microambiente tanto normal como leucémico, nos permitirá distinguir factores que favorecen su establecimiento, expansión y supervivencia e identificar objetivos que a largo plazo puedan mejorar la terapia farmacológica, sin afectar a las células troncales hematopoyéticas normales residuales. En ese sentido, el presente trabajo muestra los efectos de la interacción directa entre las MSC obtenidas de sujetos hematológicamente sanos sobre la proliferación, muerte y diferenciación de la LMC utilizando como modelo la línea celular K562.

5. HIPÓTESIS

La interacción directa entre la línea celular de LMC K562 y MSC provenientes de médula ósea de adultos mayores hematológicamente sanos reducirá la proliferación y supervivencia de las células leucémicas.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la interacción directa de las células K562 de LMC con células estromales mesenquimales provenientes de medula ósea normal.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener y caracterizar cultivos de MSC provenientes de muestras primarias de médula ósea de sujetos hematológicamente sanos.
- Evaluar que las células de la línea K562 sean positivas para el gen de fusión *Bcr::Ab1* en pasajes mayores al 5to.
- Establecer un modelo de cocultivo con contacto entre MSC normales y células K562.
- Determinar la viabilidad y el índice de proliferación de las células leucémicas K562 presentes en los cocultivos con MSC normales.
- Analizar si existe muerte por apoptosis de células leucémicas K562 después del cocultivo con MSC normales.
- Determinar la proporción de poblaciones CD34 y CD38 positivas de las células leucémicas K562 presentes antes y después del cocultivo con MSC normales.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Obtención de las células mononucleares de muestras primarias de médula ósea

Las muestras primarias de médula ósea normal fueron obtenidas en el Hospital General Regional No. 2 Villa Coapa, IMSS, a partir de cirugías de cadera de pacientes con fractura y hematológicamente sanos. Las muestras se obtuvieron bajo previo consentimiento informado y una vez obtenidas, se aisló la población celular mononuclear, mediante gradiente de densidad de Ficoll (Lymphoprep™) y centrifugación, basado en el método desarrollado por Bøyum & Scand (1968). La fracción mononuclear (CMN) se recuperó con micropipeta, y se procedió con el conteo del número celular mediante el uso de azul de tripano (colorante utilizado en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten excluir a las células vivas de células muertas), y Türk para el conteo de leucocitos, en cámara de Neubauer. A partir de estos datos se calculó el número celular aproximado obtenido de cada muestra procesada, descartando aquellas muestras que obtuvieran un número celular menor a 1×10^6 células mononucleares.

A partir de las muestras que cumplieron con el número celular y viabilidad necesaria, las CMN fueron, en caso necesario, criopreservadas para su posterior uso. Para tal efecto las células se suspendieron en una mezcla de congelación compuesta de suero fetal bovino (SFB) con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y se criopreservaron a -70°C .

8.2 Obtención y formación de banco de células estromales mesenquimales (MSC)

A partir de la población mononuclear obtenida de muestras primarias se sembraron entre 5×10^5 y 5×10^6 células en cajas Petri plásticas estériles con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Gibco suplementado con SFB (10%) más una mezcla de antibióticos penicilina / estreptomina al 1%, y se cultivó por 24 horas en condiciones estándar a 37°C con 5% de CO_2 . Debido a que las células mesenquimales presentan adherencia al plástico, esta propiedad permite aislar esta población eficientemente de la fracción celular mononuclear restante no adherente (Dominici *et al.*, 2006). Una vez cumplidas las 24 horas de incubación se realizó un cambio de medio para retirar las células no adherentes, mientras que a la fracción adherida se les realizó los cambios de medio necesarios cada 2 o 3 días hasta que éstas alcanzaran una confluencia en monocapa del 90-100%. Este fue el criterio necesario para realizar una resiembra en la que se utilizó tripsina para despegar las células del plástico, que posteriormente fueron contadas y se les realizó su primera resiembra, la cual se denominó como R1. Para los diferentes ensayos fue necesario expandir la población mesenquimal hasta la tercer o cuarta resiembra (R3 o R4), esto para mantener a las células en condiciones óptimas y al mismo tiempo eliminar aquellas células adherentes residuales que no correspondieran a la fracción mesenquimal (p.ej. monocitos o macrófagos).

A partir de células adherentes en R3 y R4, una fracción de ellas se destinó a ensayos de inmunofenotipo por citometría de flujo, mientras que la otra fracción se utilizó en ensayos de diferenciación para los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico mediante el uso de medios de diferenciación específicos, con la finalidad de rectificar que se trataba de una

población mesenquimal viable. Las fracciones celulares no usadas fueron nuevamente congeladas en crioviales hasta su posterior uso en los cocultivos, de manera que se formó un stock de células provenientes de las diversas muestras primarias procesadas.

En total se obtuvieron 6 muestras de MSC, las características de los pacientes y sitio de obtención se resumen en la Tabla 1 en la sección de resultados.

8.3 Inmunofenotipo de MSC

Antes de iniciar la inmunotipificación de la población mesenquimal se realizó el diseño del panel de los anticuerpos acoplados a fluorocromos para citometría mediante el uso de la herramienta de libre uso “FluoroFinder Spectra Viewer” (Disponible en: <https://fluorofinder.com/spectra-viewer-tool/>) (Figura 1). Los antígenos utilizados en la caracterización fueron los establecidos por “The International Society for Cellular Therapy” (Dominici *et al.*, 2006) y que incluyen la positividad a: CD90, CD73 y CD105 (característicos de MSC) y ausencia de CD45 (marcador hematopoyético) y CD31 (marcador de endotelio).

La caracterización se realizó en la R3-R4 y para ello 1×10^5 MSC se fijaron con una solución de PBS con 4% de formaldehído por 15 minutos a 4°C, para enseguida realizar 2 lavados sucesivos con PBS. Las células provenientes de cada muestra fueron fraccionadas y transferidas en dos tubos de citometría, uno donde fueron teñidas por media hora con una mezcla de los anticuerpos seleccionados y otro sin teñir para Autofluorescencia (AF). Posteriormente se realizó un lavado final con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos, y se realizó la lectura de la fluorescencia en un citómetro BD FACS Verse™. Los datos colectados se procesaron y analizaron usando el software FlowJo V.10.6.2.

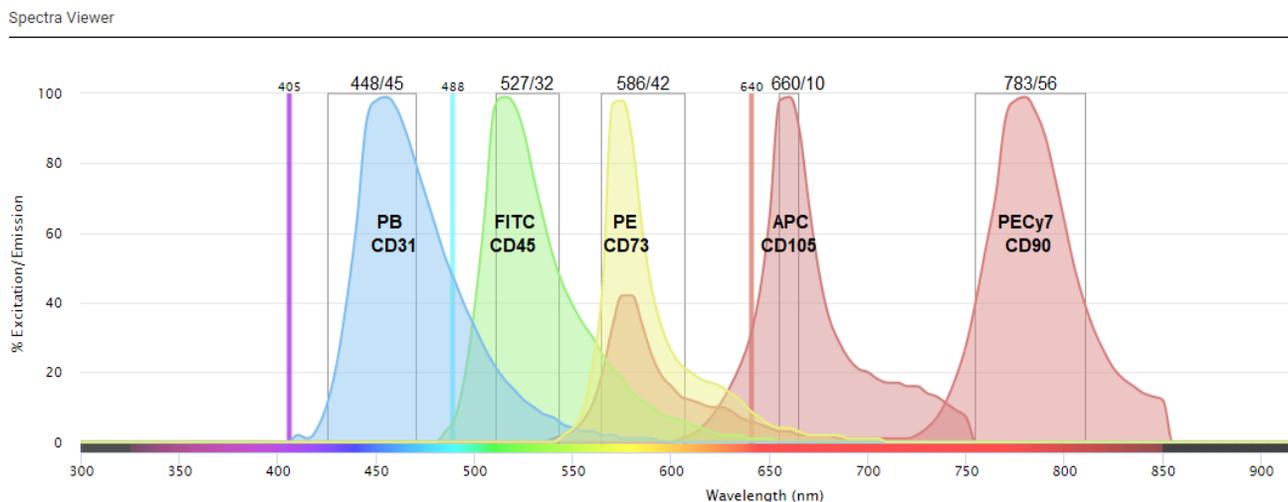


Figura 1. Diseño de panel de citometría de selección de fluorocromos acoplados a antígenos para identificación de las células estromales mesenquimales. Se muestra los antígenos seleccionados y el fluorocromo acoplado correspondiente basándonos en la configuración de láseres y filtros del equipo BD FACS Verse™ empleado, así como el espectro de emisión de cada uno y el filtro en la que es captada la señal de fluorescencia.

8.4 Diferenciación de MSC

Para todos los ensayos de diferenciación se usaron MSC en R3 y R4. Todas las tinciones se basaron de acuerdo con lo reportado por Montesinos *et al.*, (2009).

Diferenciación adipogénica

Se sembraron en placas de 12 pozos de $5 - 7 \times 10^4$ células y se mantuvieron con DMEM + SFB (10%) hasta que alcanzaran una confluencia en monocapa del 90-100% por pozo. Una vez alcanzada, el medio se retiró para lavar con PBS para enseguida cultivar en presencia de 2 ml del medio de diferenciación preparado en fresco “MesenCult™ Adipogenic Differentiation Medium (Human)” de STEMCELL Technologies (Catalogo #05412) siguiendo las instrucciones del proveedor. El cultivo se mantuvo en condiciones estándar por 12 días realizando cambios de medio cada 3 días. Una vez cumplido el tiempo de cultivo, se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS, y la diferenciación adipogénica se determinó visualizando la presencia de vacuolas lipídicas teñidas con Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Diferenciación osteogénica

Se sembraron en placas de 12 pozos de $5 - 7 \times 10^4$ células, mismas que se mantuvieron con DMEM hasta que alcanzaran una confluencia en monocapa del 90-100% para posteriormente retirar el medio y lavar con PBS. Las células fueron entonces cultivadas en presencia de 2 ml del medio de diferenciación preparado en fresco “MesenCult™ Osteogenic Differentiation Kit (Human)” de STEMCELL Technologies (Catalogo #05465) siguiendo las instrucciones del proveedor. El cultivo se mantuvo en condiciones estándar por 10 días realizando cambios de medio cada 3 días. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS, y la diferenciación osteogénica se evaluó mediante la tinción de fosfatasa alcalina usando una solución NBT / BCIP.

Diferenciación Condrogénica

En un tubo Falcón estéril de 15 ml se colocaron 1×10^5 células en presencia de 500 μ l de medio de diferenciación preparado en fresco “MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Medium” de STEMCELL Technologies (Catalogo #05455) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las células fueron mantenidas en condiciones estándar por 21 días realizando cambios de medio cada 3 días para finalmente observar la formación de micromasas, las cuales fueron fijadas con una solución de formaldehído y deshidratadas con diferentes soluciones de etanol y xilol para finalmente ser incluidas en parafina. Los cubos de parafina se enviaron al laboratorio de histología de la unidad de Morfofisiología, FES Iztacala, para realizar cortes histológicos y posteriormente la diferenciación condrogénica se evaluó mediante la tinción con colorante azul Alcian (Sigma-Aldrich) que tiñe la matriz condrogénica.

8.5 Cultivo y expansión de la línea celular leucémica K562

La línea celular K562 de leucemia mieloide crónica fue adquirida en ATCC (ATCC ® CCL-243™) y ésta ha sido mantenida en nuestro laboratorio de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Para su cultivo, se descongelaron viales entre el pasaje 3 al 5 y se expandieron a una confluencia no mayor de 1×10^6 células por ml de medio, criterio necesario para realizar una nueva resiembra hasta pasajes no mayores al décimo. Las células fueron mantenidas en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco) suplementado con SFB al 10% más una solución de penicilina / estreptomina al 1%, y crecidas en condiciones estándar a 37°C y con 5% de CO₂.

8.6 Detección del gen de fusión *Bcr::Abl1*

Antes del uso de la línea celular en el modelo de cocultivo, se verificó la presencia del oncogén y transcrito híbrido *Bcr::Abl1* en células de la línea K562 en pasajes mayores al quinto mediante RT-PCR en punto final. Para ello, se cultivó la línea K562 entre los pasajes 6 y 7, y se colectaron de 1 a 5×10^6 células de las cuales se extrajo el RNA total mediante el uso de Trizol (Invitrogen, Catalogo: 15596026), siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN total se cuantificó para rectificar su pureza y calidad usando la relación nucleótidos/proteína que considera que un ARN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0, mientras que un ARN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Posteriormente se usó 1000 ng/ µl para la síntesis del ADN complementario (ADNc) que fue utilizado en una reacción de PCR en punto final usando oligonucleótidos específicos para *Bcr::Abl1* obtenidos de Melo *et al.*, (1993) que amplifican un producto de aproximadamente 460 pb. Finalmente, la presencia del producto amplificado se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer de corrida (TBE 1X).

8.7 Ensayo de Cocultivo de células K562 con MSC.

Una vez que se obtuvieron las dos poblaciones celulares, se estableció un modelo de cocultivo con contacto directo de MSC con células K562 en una relación 3:1 respectivamente. Para ello, previamente se dejaron crecer MSC hasta una confluencia del 100% (en promedio 9×10^4 MSC a esta confluencia) en placas de 12 pozos y se adiciono 3×10^4 células K562. Estos cocultivos fueron mantenidos con medio RPMI en condiciones estándar de incubación a 37°C con 5% de CO₂ durante 3 días.

El diseño de los grupos experimentales en cultivo se organizó de la siguiente manera:

Grupo experimental	Cultivo	Condición
Cocultivo (CC)	MSC / K562 3:1	Medio RPMI libre de SFB
Control Negativo (CN)	K562	Medio RPMI libre de SFB
Control Positivo (CP)	K562	Medio RPMI + 10% SFB

8.8 Viabilidad de las células leucémicas K562

Cumplidos 3 días de cultivo, las células K562 se colectaron de cada ensayo, y se realizó el conteo de cada pozo para calcular el número de células vivas y muertas de cada grupo experimental usando cámara de Neubauer y azul de tripano. A partir de estos datos se calculó la viabilidad celular en porcentaje con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Número total de células}} \times 100$$

8.9 Ensayo de proliferación celular e identificación de poblaciones primitivas

Se evaluó la proliferación de las células K562 mediante el uso de Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) y citometría de flujo, basados en el método modificado de Quah & Parish (2010). Este método se basa en el uso de un compuesto para seguir la proliferación, el éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE), que es permeable a la membrana e ingresa al interior de ésta, donde las esterasas presentes en citoplasma escinden los acetatos de CFDA-SE y de ese modo dan lugar a la forma fluorescente (CFSE), este compuesto es menos permeable a la membrana, sin embargo, el CFSE se une a las proteínas en la parte amino terminal (NH₂) manteniéndose en este estado químico dentro de la célula (Figura 2) de manera que al haber una división celular, el compuesto es repartido de forma homogénea entre las células hijas generando una disminución de la fluorescencia que es detectada mediante citometría de flujo, la cual permite estimar el número de generaciones celulares presentes en la población teñida, donde a mayor división menor fluorescencia es detectada y viceversa.

Con este método las células K562 de los diferentes cultivos fueron teñidas al día cero de cultivo (tiempo cero). Transcurridos los 3 días de cultivo, se recuperó la población de células K562 de cada condición y se realizó la lectura de la fluorescencia del CFSE por citometría de flujo y se obtuvo la media de la intensidad de fluorescencia (MIF). A partir de este dato se calculó el índice proliferativo (IP) que es una aproximación matemática a la mediana del número de divisiones de la población teñida de interés (Erhardt, *et al.*, 2007), y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{IP} = \text{Log} [\text{FI} / \text{MIF all}] / \text{Log} [2]$$

FI: Fluorescencia de la muestra al inicio del ensayo (células recién teñidas con CFSE).

MIF all: MIF de la muestra después del experimento (células recuperadas del ensayo).

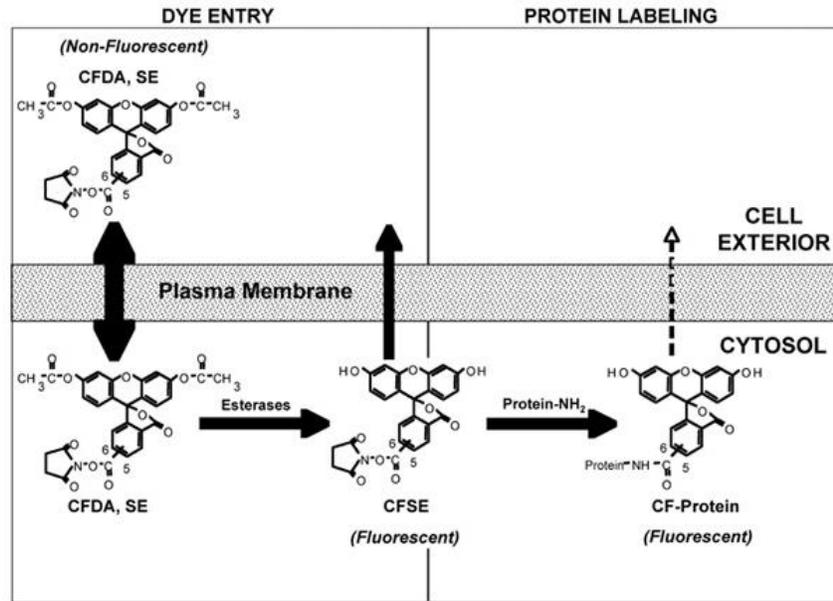


Figura 2. Representación de los diversos eventos moleculares que ocurren durante la tinción de las células con diacetato de carboxifluoresceína éster de succinimidilo (CFDA, SE).

Simultáneo a este ensayo, también a los días 0 y 3 se evaluó la presencia de una población primitiva semejante a la troncal y progenitora mediante la evaluación de los marcadores CD34 y CD38 (Figura 3).

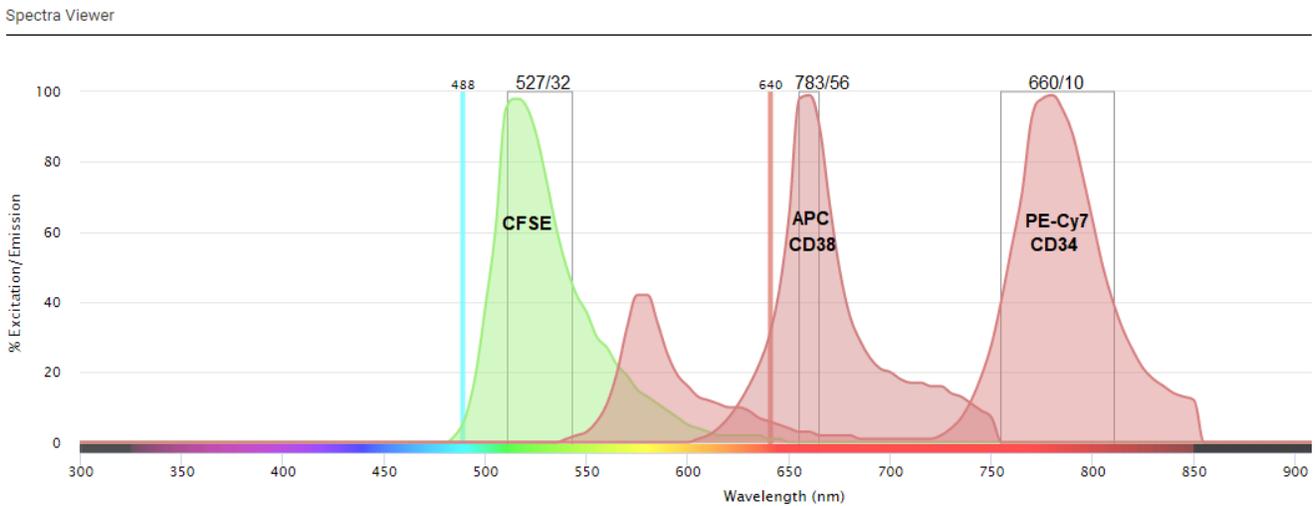


Figura 3. Diseño de panel de citometría para medición de la proliferación en las células K562. Se muestra el espectro de emisión de la fluorescencia de CFSE y de los antígenos acoplados a fluorocromos seleccionados para el rastreo de la presencia de una población con inmunofenotipo troncal (CD34+) y/o progenitor (CD38+). Así mismo se muestran los filtros del equipo BD FACS Verse™ empleado en los que son detectados los picos máximos de emisión de cada fluorocromo empleado.

8.10 Ensayo de apoptosis celular

Posterior al cocultivo de 3 días, se analizó el porcentaje de muerte por apoptosis de las células K562 en cada condición del cultivo. Para esta evaluación, se realizó la detección de Anexina V que se emplea como una sonda no cuantitativa para detectar células que expresan fosfatidilserina en la superficie celular, que es una característica observada en apoptosis y otras formas de muerte celular. Así mismo se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN.

Para ello, las células se colectaron en tubos de citometría de los diferentes cultivos y se realizó un lavado con PBS por centrifugación y se decantó el sobrenadante. Al botón celular formado se le adicionó Anexina V-FITC (BD, Catálogo: 556419) y se siguió las instrucciones del proveedor. Por último, las células fueron teñidas con DAPI durante 5 minutos para realizar la lectura de los tubos mediante citometría de flujo (Figura 4).

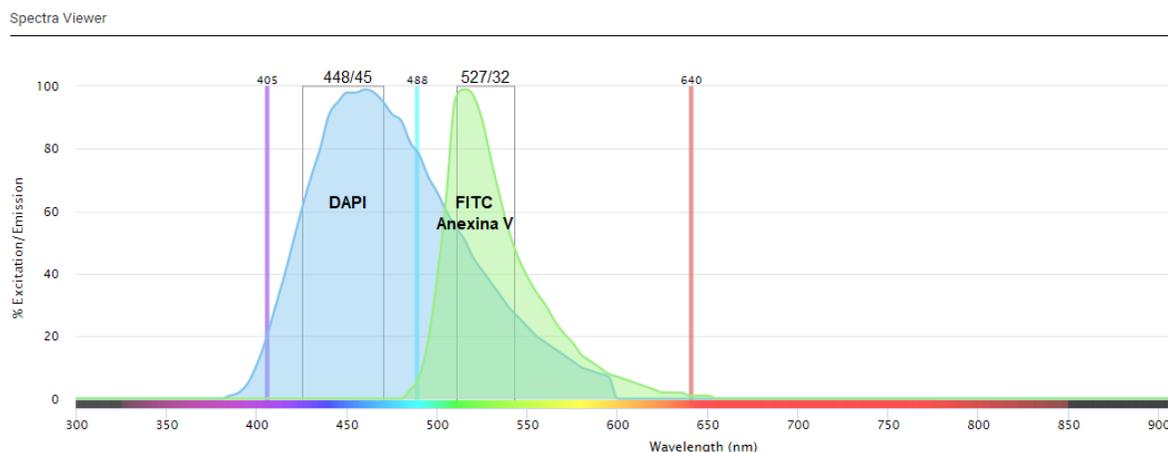


Figura 4. Panel de citometría para medición de muerte celular en células K562. Se muestra el espectro de emisión de la fluorescencia de DAPI y Anexina V acoplada a FITC, así como los filtros del equipo BD FACS Verse™ en los que son detectados los picos máximos de emisión de cada fluorocromo.

8.11 Procesamiento de datos y análisis estadísticos

Los datos obtenidos de los diferentes ensayos por citometría de flujo fueron procesados con el software FlowJo V.10.6.2. y se obtuvo la MIF o porcentajes totales de las poblaciones celulares seleccionadas. A partir de esta información, más los datos provenientes de los conteos y viabilidad celular se obtuvo la desviación estándar (SD) y el error estándar de la media (SEM) y se aplicó la prueba estadística *t* de Student, con un valor de significancia de 0.01 (*P value*) o Anova de una vía $P < 0.05$. Estos análisis, así como la construcción de los gráficos se realizó usando el programa estadístico GraphPad Prism V.9.0.0.

9. RESULTADOS

9.1 Detección del gen de fusión *Bcr::Abl1*

Para corroborar la presencia del oncogén *Bcr::Abl1* característico de la LMC en la línea celular K562 en los pasajes utilizados en este trabajo, se utilizó la síntesis de DNAc y PCR en punto final utilizando oligonucleótidos específicos para *Bcr::Abl1* reportados por Melo *et al.*, (1993). Los resultados indican la presencia del gen de fusión *Bcr::Abl1* en las células leucémicas K562 en pasajes mayores al quinto; en contraste, este transcrito no se encontró en las MSC aisladas de MO normal (MSC E) (Figura 1).

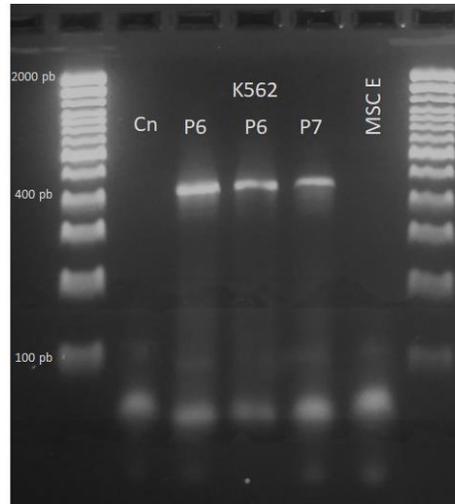


Figura 1. Detección del transcrito de *Bcr::Abl1* por PCR en punto final en la línea celular de Leucemia mieloide crónica K562. Se detectó el transcrito *Bcr::Abl1* en pasajes 6 y 7 en la línea celular K562. En contraste, este es ausente en la población mesenquimal normal (MSC E). Cn: Reacción de control interno de PCR (en ausencia de DNAc). Gel de agarosa al 1% con buffer de corrida TBE 1X.

9.2 Caracterización de MSC de médula ósea normal

A partir de muestras primarias de adultos mayores hematológicamente sanos, se aisló y expandieron un total de 6 muestras de MSC (Tabla 1) hasta la tercera y cuarta resiembra. En estos pasajes se determinó el inmunofenotipo siguiendo los criterios para definir a células estromales mesenquimales determinados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici *et al.*, 2006), donde se rectificó la presencia de marcadores de superficie característicos de esta población (CD 73, CD 90 y CD105), y la ausencia del marcador hematopoyético (CD 45) así como el marcador endotelial (CD 31). Los marcadores mesenquimales se detectaron tanto en la tercera como en la cuarta resiembra (Figura 2).

Con la intención de evaluar no solo el inmunofenotipo sino también la función mesenquimal, se procedió a realizar ensayos de diferenciación hacia los 3 linajes clásicos reportados para esta población celular: adipogénico, osteogénico y condrogénico. Los resultados de la Figura 3 indican que todas las muestras evaluadas tuvieron la capacidad de diferenciarse hacia los linajes mencionados, por lo que, a partir de estos resultados, se determinó que en este trabajo al menos hasta el cuarto pasaje se logró aislar una población mesenquimal inmunofenotípica y funcionalmente normal.

ID del paciente	Nomenclatura muestra	Sexo	Edad	Lugar de obtención
MON 5/18	MSC A	M	58	Fémur
MON 13/18	MSC B	---	---	---
MON 23/18	MSC C	M	82	Fémur
MON 50/19	MSC D	H	87	Fémur
MON 62/19	MSC E	H	67	Cadera
MON 14/20	MSC F	H	68	Fémur

Tabla 1. Características biológicas de las muestras procedentes de sujetos hematológicamente sanos de las que se obtuvieron las MSC. Media de edad de los pacientes: 72 años. MON: Médula ósea normal.

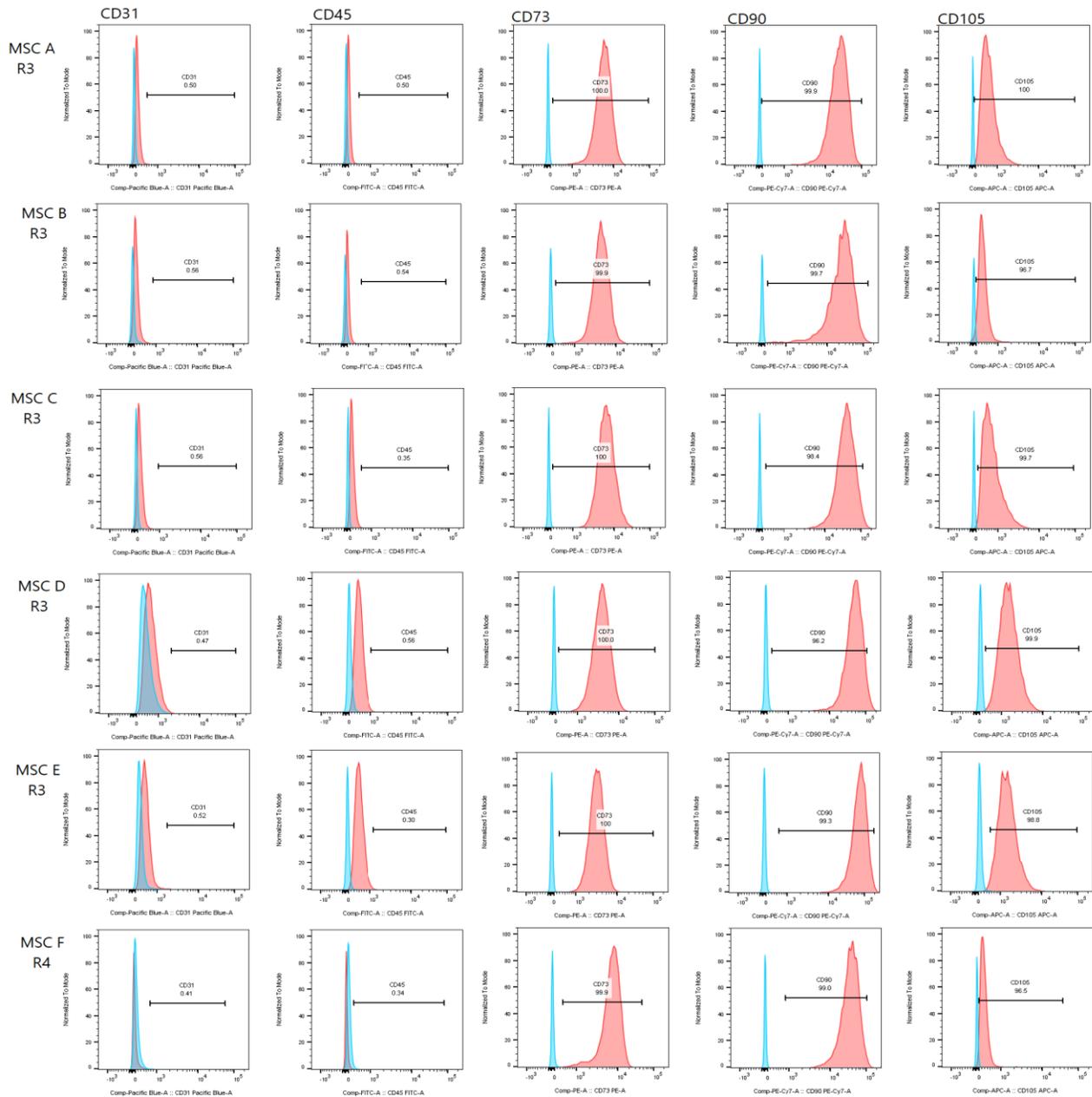


Figura 2. Immunofenotipo de MSC. Histogramas representativos de inmunofenotipo de las seis muestras de MSC empleadas en los diferentes ensayos. Se observa la positividad a los marcadores típicos de células mesenquimales: CD73, CD90 y CD105, y la ausencia para el marcador hematopoyético (CD45) y endotelial (CD31). La evaluación se realizó en la tercera (MSC A – E) y cuarta (MSC F) resiembra.

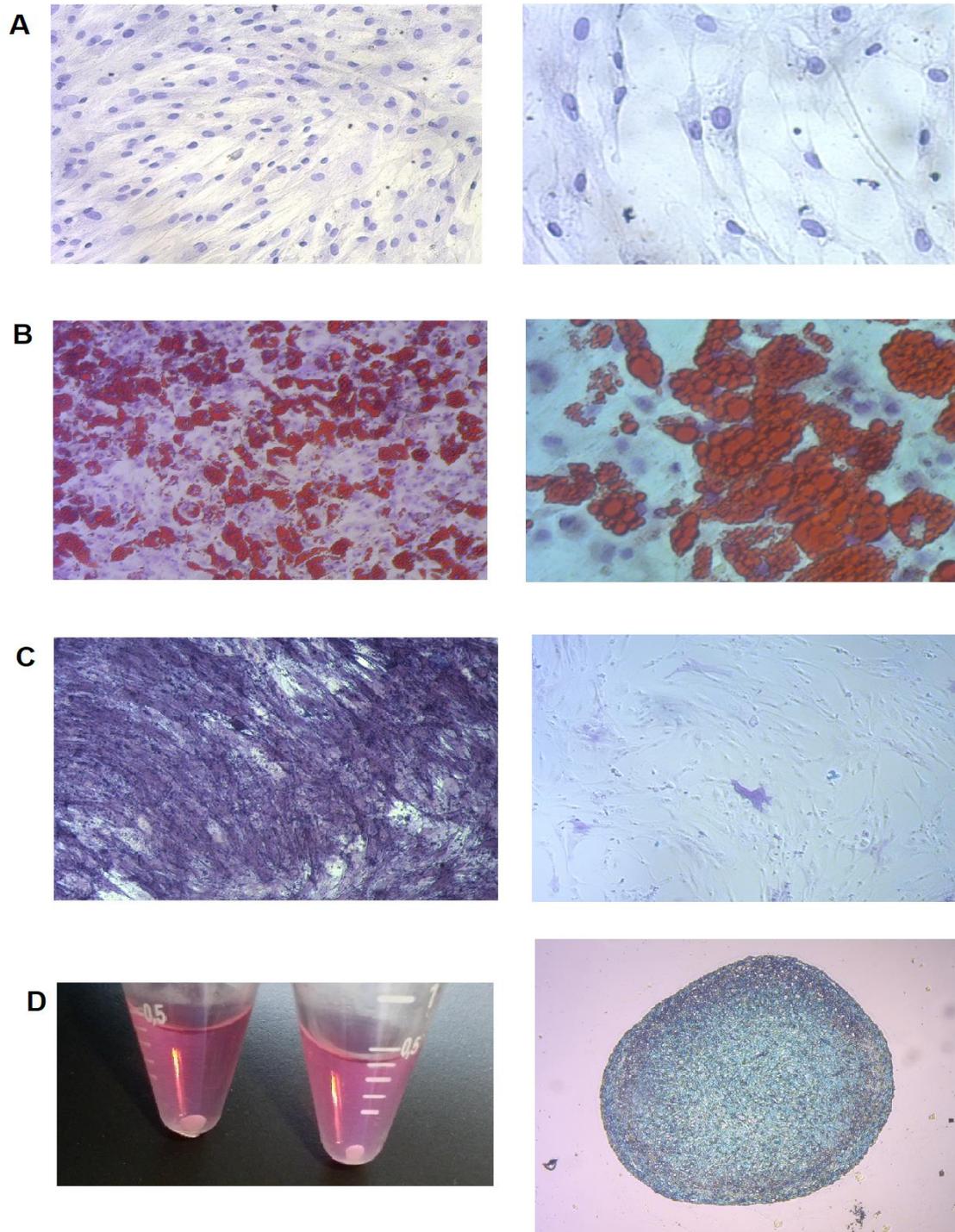


Figura 3. Expansión y Diferenciación de MSC. Las células mesenquimales obtenidas *in vitro* fueron expandidas después de alcanzar una confluencia del 100%. La imagen en A) indica un cultivo en R3 (teñido con hematoxilina) con la confluencia mencionada (imagen izquierda). Al acercarse la imagen se aprecia la morfología en fibroblasto clásica de MSC (imagen de la derecha). B-E) Figuras representativas de la diferenciación adipogénica (B) caracterizada por la presencia de gotas lipídicas con tinción rojo oleoso (imagen de la derecha); osteogénica (C) donde se evidencia la presencia de fosfatasa alcalina (FA) mediante la tinción con solución NBT / BCIP (imagen izquierda) mientras que su control negativo muestra células pobremente o nulas a FA (imagen derecha), y condrogénica (D), con la formación de microesferas (imagen izquierda) así como positivas a la tinción con azul alcian comúnmente utilizado para teñir cartílago (imagen derecha).

9.3 Proliferación de las células K562 en el modelo de cocultivo

Una vez caracterizadas ambas poblaciones celulares, se procedió a establecer un modelo de cocultivo que nos permitiera evaluar el efecto de las células MSC sobre células de LMC. Para ello las células K562 se mantuvieron en cultivo en contacto directo sobre MSC en proporción 1:3 durante 3 días en medio RPMI con 1% de antibióticos. Al cabo de este tiempo las células K562 fueron recuperadas del cocultivo para realizar un conteo celular utilizando la técnica de exclusión con azul de tripano para enseguida determinar el número celular vivo y en consecuencia el porcentaje de viabilidad en cada condición de cultivo (ver materiales y métodos).

Los resultados indican que tal y como se esperaba había un mayor número de células vivas en el control positivo (CP), obteniendo en promedio 4×10^5 células. Esto debido a la presencia del SFB que estimula la proliferación celular. En contraste a esta observación, en el control negativo (CN) no se observó incremento en el número celular ya que se cuantificó un promedio de 3×10^4 células. Interesantemente, las células leucémicas que permanecieron en cocultivo con únicamente MSC (CC) incrementaron su número celular en casi 2 veces (8.9×10^4 células) con respecto al número de células leucémicas con el que se inició el ensayo de cocultivo (3×10^4 células) (Figura 4 B).

Así mismo, el porcentaje de viabilidad demostró que la presencia del SFB permite la supervivencia de las células leucémicas casi en su totalidad (97%), mientras que la interacción directa de estas células con las MSC pareció disminuir su viabilidad a un 74%, siendo aún menos viables las células que permanecieron en el CN donde se detectó el 61% de células vivas (Figura 4 C).

Con la intención de evaluar la capacidad proliferativa de las células leucémicas después de haber estado en contacto con un microambiente mesenquimal normal, se procedió determinar el índice de proliferación en cada condición después de los 3 días de cultivo. Para ello, las células K562 se tiñeron con CFSE desde el inicio del cultivo (Tiempo cero) y posteriormente, dicho compuesto se analizó al final del experimento para finalmente calcular el índice de proliferación (IP), que estima la mediana de número de divisiones celulares (Biburger & Erhardt, 2007).

El resultado indica que el número de divisiones celulares fue igual entre el cocultivo y el control positivo con un valor de IP igual a 8.6, mientras que en el control negativo el IP fue de 7.9, por lo que se puede decir que, en todas las condiciones de cultivo, las células que se mantenían viables después de 3 días de cultivo tuvieron la capacidad de dividirse aproximadamente 8 veces (Figura 4 E). Sin embargo, al considerar los valores de IP contra la viabilidad, se puede notar que a pesar de la proliferación y después de 3 días de cocultivo, no toda la población celular permaneció viva, situación que llevó a analizar la muerte celular en cada una de las condiciones de cultivo.

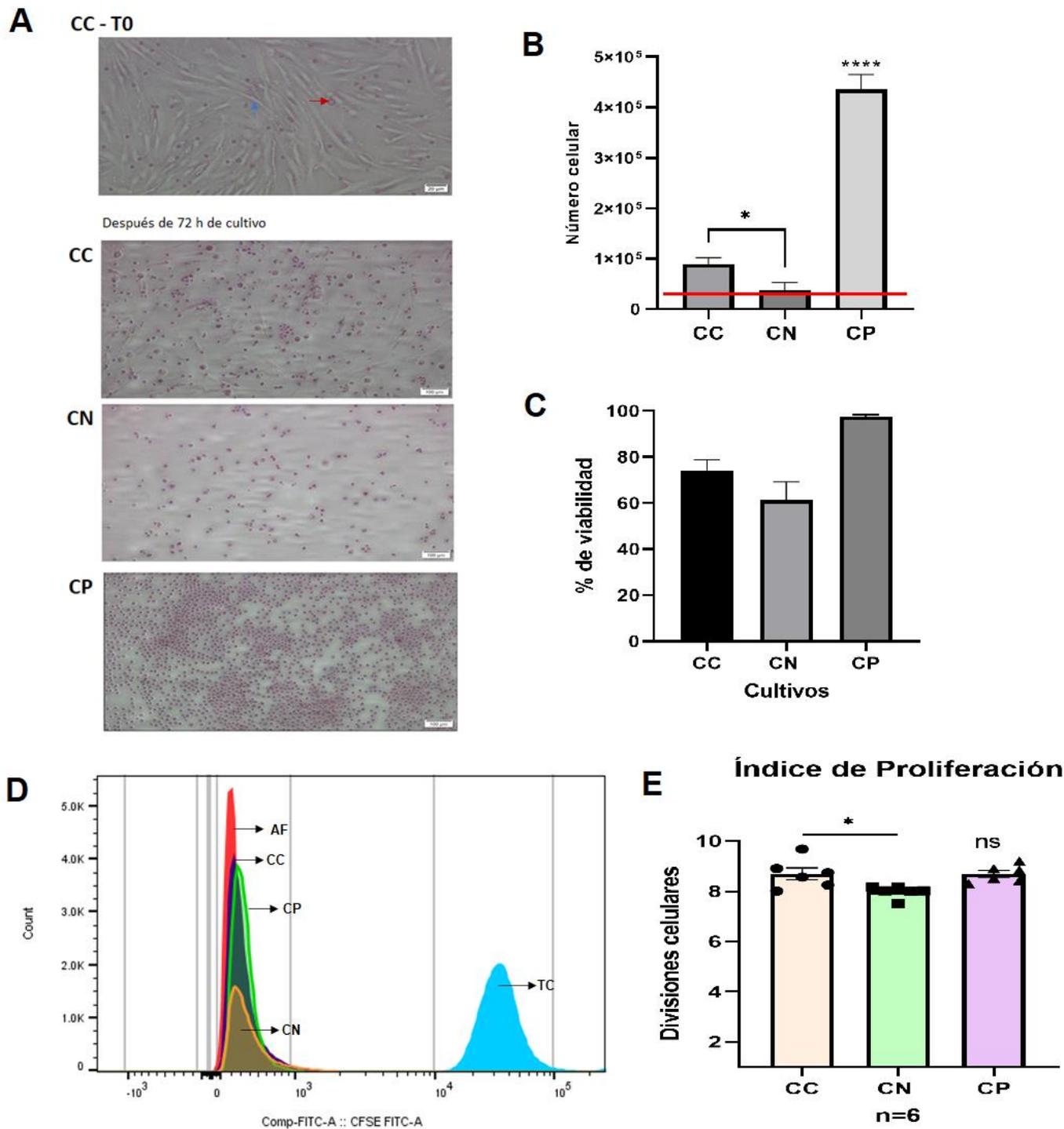


Figura 4. Proliferación de las células leucémicas K562 en presencia del microambiente mesenquimal normal. Células K562 fueron mantenidas por tres días en presencia de MSC y al final de ese tiempo se analizó el número celular (A), viabilidad (C) e índice de proliferación (E). La figura muestra un cocultivo al inicio del ensayo (CC-T0), en donde la flecha roja señala una célula leucémica mientras que la flecha azul señala una MSC; posterior a los 3 días de cultivo se observa una alta proliferación en el CP, seguido del CC y el CN. Esto coincide con el conteo absoluto de células vivas que incremento en CP y CC, mientras que en CN se mantuvo el número celular con respecto al número celular inicial (línea roja) (B). El porcentaje de viabilidad mostró que el CP fue la condición que presentó el mayor número de células viables, y esta disminuyó en el CC y CN (C). La evaluación de la proliferación mediante CFSE y citometría de flujo evidenció que en todas las condiciones de cultivo las células leucémicas se dividieron a un índice semejante ya que el histograma (D) muestra el desplazamiento de los picos derivado de la disminución de la fluorescencia después de 3 días de cultivo con respecto a la fluorescencia de las células recién teñidas con CFSE del tiempo cero (TC). Este cambio derivó en un IP aproximado a 8 para todos los grupos experimentales (E). Los datos representan los valores obtenidos del promedio del triplicado de 6 muestras (n=6) y son expresados como media \pm SEM. Se realizó prueba estadística de T (*): P valúe = 0.01, (****): P valúe = 0.0001.

9.4 Muerte celular de la línea K562 en el cocultivo con MSC

Dado que en el cocultivo se observó un incremento del número celular leucémico, pero con una disminución de la viabilidad, se evaluó si la interacción de las células K562 con las MSC podía inducir la muerte celular. Dicho análisis se realizó utilizando citometría de flujo y doble tinción con Anexina V y DAPI, la cual permite distinguir entre las células con muerte temprana (Anexina V + DAPI -) y tardía (Anexina V + DAPI +).

Los resultados en las Figuras 5 y 6, indican que mientras en el control positivo y negativo se encuentra un porcentaje de apoptosis temprana de 1 y 5.1% respectivamente, en el cocultivo con MSC existe una tendencia a incrementar el porcentaje de muerte de las células leucémicas ya que se detectó un 7.8% de ellas en apoptosis temprana (Figura 6 A). No obstante, al analizar el porcentaje de células en apoptosis tardía, se encontró que tal y como se esperaba la mayor fracción de células muertas se presentó en el CN con 11.7%, seguido del CC (5.3%) y menos del 1% en el CP (Figura 6 B). Estos resultados sugieren que la presencia MSC provenientes de pacientes hematológicamente sanos con células leucémicas puede inducir muerte celular en una fracción de las células en el cocultivo, sin embargo, esta inducción de la apoptosis (temprana y tardía) es distinta entre las diferentes muestras de MSC empleadas en los experimentos (Figura 5).

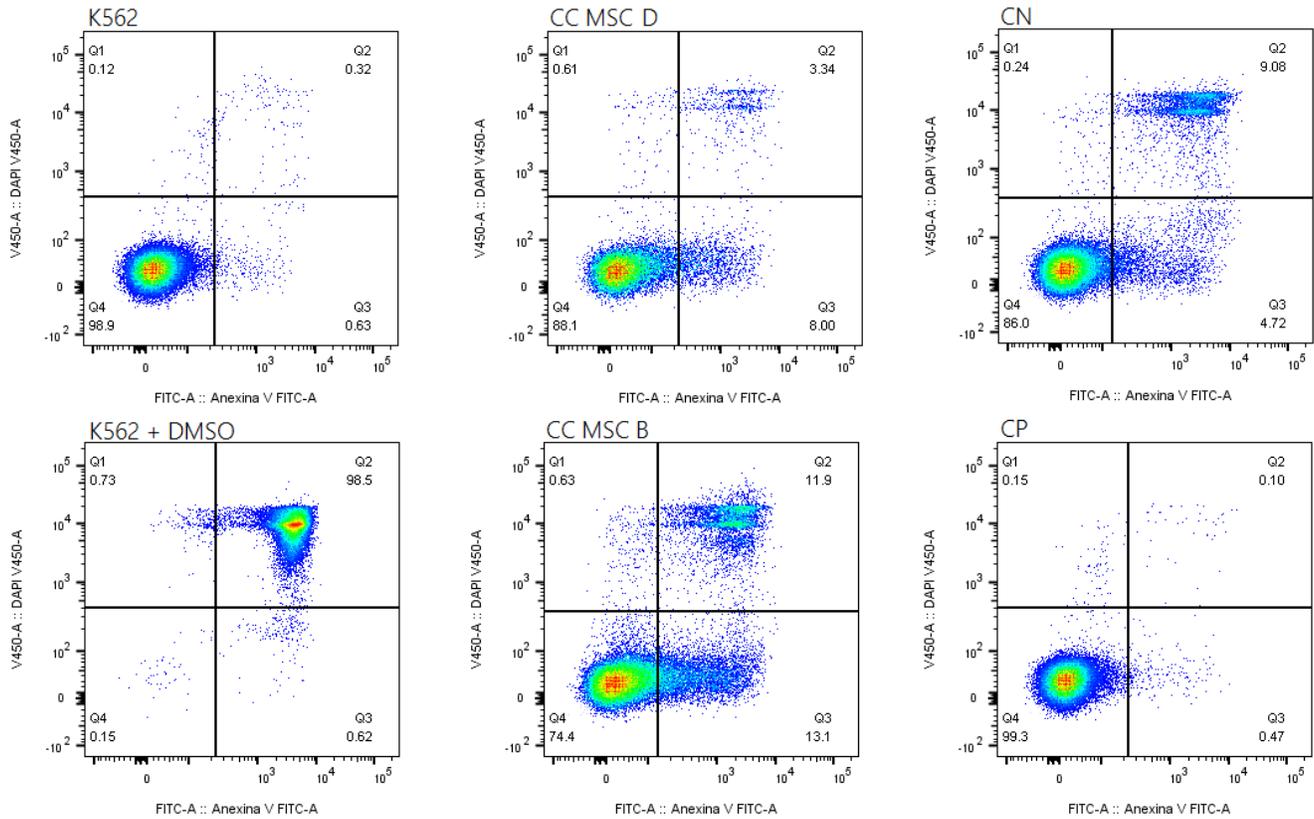


Figura 5. Evaluación de muerte celular en la línea K562 después del cocultivo con MSC. Células K562 fueron mantenidas en cocultivo con MSC por tres días y al cabo de este tiempo el porcentaje de apoptosis temprana y tardía fue analizado. La figura muestra dot plots representativos de dichos análisis observado poblaciones de células viables K562 al inicio del cultivo (Izquierda arriba), así como un control positivo de tinción de muerte (K562+DMSO) donde las células K562 fueron cultivadas con DMSO al 10% por 45 minutos (Izquierda abajo) detectando toda la población muerta en la fracción Anexina V+ DAPI+. La interacción directa de las células leucémicas con las MSC indujo la muerte celular temprana y tardía, aunque este efecto fue menor o mayor dependiendo de la muestra de MSC empleada (Dot plots de la parte central), mientras que existe una inducción de muerte celular en el CN (Derecha arriba), que no se observa en el CP donde todas las células leucémicas permanecieron viables (Derecha abajo).

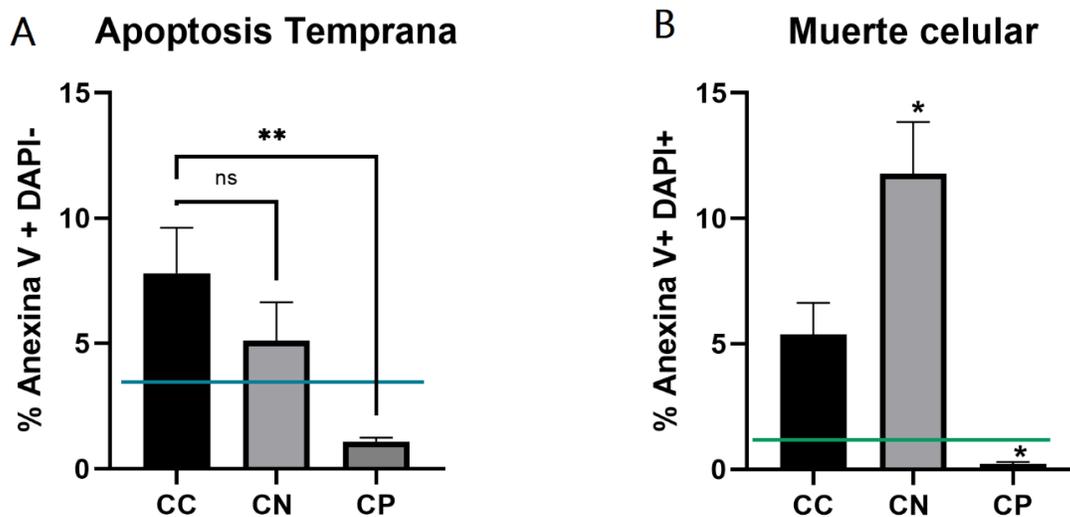


Figura 6. Porcentaje de apoptosis temprana y muerte celular en la línea K562 después del cocultivo con MSC. Tras el cocultivo con MSC por tres días el porcentaje de apoptosis temprana (Anexina V + DAPI-) en A y muerte total (Anexina V + DAPI+) en B en la línea K562 fue analizado mediante citometría de flujo. Se muestra los valores obtenidos del promedio del duplicado de 6 muestras (n=6) y la línea azul marca el porcentaje de células apoptóticas al día cero del experimento. Los resultados son expresados como media \pm SEM. Se realizó prueba estadística de Anova de una vía $P < 0.05$.

9.5 Evaluación de la población primitiva en la línea K562

Considerando que se ha reportado que el microambiente estromal (que involucra MSC) dentro de la médula ósea es capaz de regular distintas respuestas biológicas de las células leucémicas, surgió el interés de analizar: 1) si dentro de la línea celular de LMC había células con inmunofenotipos troncales y 2) si el cocultivo con poblaciones de MSC modificaban su presencia.

Para realizar esta evaluación la línea celular K562 se incubó con anticuerpos anti CD34 y anti CD38, para una vez realizado el cocultivo cuantificar poblaciones de células troncales (CD34+CD38-) y/o progenitoras (CD34+CD38+) leucémicas (Figura 7 A).

Nuestros resultados mostraron que tal y como había sido observado en nuestro grupo de trabajo, la línea celular K562 contiene una fracción muy reducida de células con inmunofenotipos primitivos hematopoyéticos, ya que las células troncales representan aproximadamente el 0.4% del total de la línea celular, mientras que las poblaciones progenitoras y precursoras se encuentran en porcentajes mucho menores. Interesantemente, al evaluar el porcentaje de estas poblaciones tras el cocultivo en presencia o ausencia de MSC, los resultados demuestran que existe una disminución significativa de las poblaciones con inmunofenotipo troncal (CD34+ CD38-) en todos los grupos experimentales con respecto a la población celular inicial (TC) (Figura 7 B). En contraste, en el caso de células con inmunofenotipo de progenitores (CD34+ CD38+) y precursores (CD34- CD38+), se observó una tendencia al incremento, siendo ésta más evidente en el control negativo y en el cocultivo, mientras que en el control positivo los porcentajes totales permanecieron sin cambios (Figura 7 C y D). Cabe mencionar que, si bien estos datos sugieren un cambio, la evaluación adecuada debe realizarse utilizando poblaciones leucémicas primarias en fase crónica, ya que como se mencionó anteriormente la línea celular K562 representa una etapa leucémica en crisis blástica en donde prácticamente toda la línea celular representa blastos leucémicos, que no necesariamente representan (como lo hemos visto), poblaciones primitivas de la hematopoyesis leucémica.

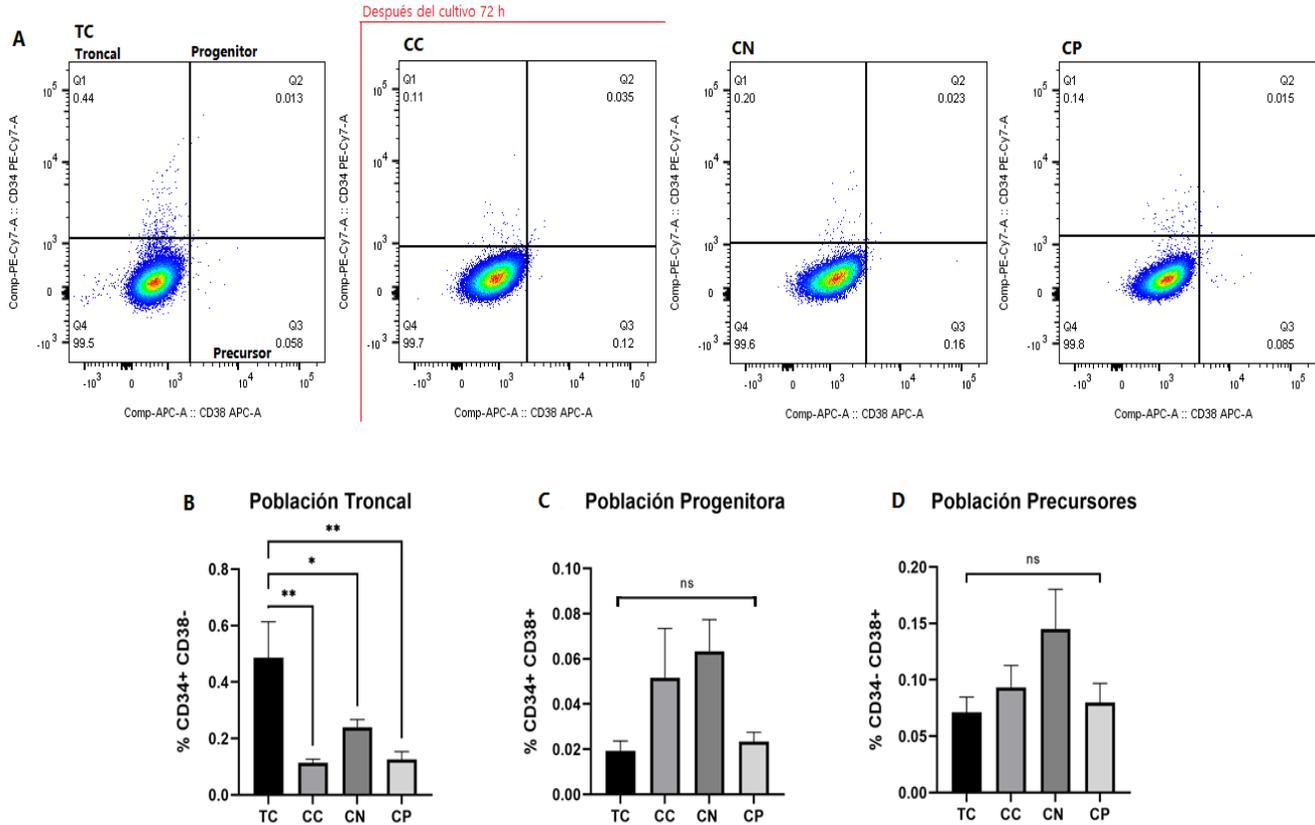


Figura 7. Evaluación del porcentaje de las diferentes subpoblaciones hematopoyéticas en la línea celular K562. Posterior al cocultivo con MSC el contenido de poblaciones hematopoyéticas primitivas fue analizado. La figura A) muestra dot plots representativos de las distintas fracciones hematopoyéticas dentro de la línea celular total al inicio del cultivo, así como posterior a 72 horas de cocultivo, al cabo de los cuales se analizó el porcentaje de células con inmunofenotipo troncal (B), progenitor (C) y precursor (D). Los datos muestran el promedio del triplicado de 6 muestras independientes (n=6) y los resultados son expresados como media \pm SEM. Se realizó prueba estadística de Anova de una vía $P < 0.05$.

10. DISCUSIÓN

Existe evidencia creciente que indica que el microambiente de la médula ósea juega un papel importante en la regulación de la hematopoyesis normal y maligna. Sin embargo, existe controversia sobre el papel que cada componente desempeña y como es que se regulan los distintos linajes hematopoyéticos tanto en condiciones normales como de enfermedad. En ese sentido y tomando como modelo las células estromales mesenquimales que provienen de MO de LMA y LMC, hay evidencia que describe que éstas parecen favorecer el crecimiento y permanencia de células leucémicas, lo que se ha asociado con el desarrollo de resistencia a terapia y recaída de la enfermedad mediante diferentes mecanismos, que incluyen una capacidad inmunomoduladora que disminuye la activación de linfocitos T (Xishan *et al.*, 2014), la producción de diferentes mediadores solubles que se vinculan a la formación de un nicho permisivo para la leucemia, como los factores de crecimiento angiogénicos (P. ej. VEGF y Ang-1), IL-6, CXCL12 que es expresado de forma constitutiva por las MSC y que regula la proliferación, progresión del ciclo celular y supervivencia de las células leucémicas. Y que CCL3 que favorece la expansión de las MSC (Brenner *et al.*, 2017) o un sesgo a la diferenciación hacia linajes específicos de las MSC como el adipogénico, que favorecen el crecimiento leucémico (Azadniv *et al.*, 2020).

Aunado a lo anterior, también se ha demostrado lo contrario, ya que al utilizar células mesenquimales obtenidas de diversas fuentes normales como sangre de cordón umbilical (Sarmadi *et al.*, 2020), medula ósea humana (Zhang & Zhang, 2009), MSC murinas (Fathi *et al.*, 2019) e incluso tejido adiposo (Zhu *et al.*, 2009) éstas inducen una disminución en el crecimiento leucémico, todo ello asociado a mecanismos como la interacción directa mediante moléculas de adhesión, producción de factores solubles y excreción de exosomas por parte de las MSC, que contienen diversos elementos reguladores como proteínas funcionales, microRNAs (miRNAs) y RNA mensajero que ejercen varios efectos sobre la supervivencia de las células leucémicas (Zhang *et al.*, 2020).

Si bien, los contrastes en los efectos de las poblaciones mesenquimales pueden deberse a la variedad de modelos tanto *in vivo* como *in vitro* empleados en cada estudio, no puede perderse de vista que en estos sistemas la comunicación e interacción entre las MSC con células hematopoyéticas, es bidireccional y depende tanto del contacto celular como de la participación de moléculas solubles (Boyd *et al.*, 2017), lo que puede generar respuestas y/o modificaciones a nivel genómico, proteómico y de secretoma, en ambas direcciones (Kumar *et al.*, 2018).

En ese sentido y con la intención de generar información sobre la relación que existe entre el microambiente mesenquimal normal y la leucemia mieloide crónica, en este proyecto se estableció un modelo de cocultivo con contacto directo para evaluar la viabilidad, proliferación y muerte de células leucémicas de la línea K562 después de 72 horas de cocultivo con MSC normales provenientes de sujetos adultos mayores. Los datos aquí obtenidos demuestran que posterior a 72 horas de cocultivo existe un incremento en el número celular leucémico de casi tres veces (Figura 4B) en presencia de MSC. Este dato contrasta con lo reportado por Zhang y colaboradores (2009), quienes mencionan que MSC de MO normal reducen el crecimiento de células de LMC que provienen de pacientes recién diagnosticados y sin tratamiento, efecto que

ha sido asociado a la secreción de IFN- α , vinculado con la inhibición de la proliferación. Sin embargo, aunque las MSC normales parecieran contrarrestar el crecimiento leucémico, también se ha reportado que la línea celular K562 puede utilizar otros mecanismos que le permiten proliferar pese a interacción directa e influencia del estroma, por ejemplo, mediante la secreción de exosomas que contienen miRNA-711, que son internalizados en las MSC induciendo la regulación negativa de CD44, una molécula asociada con la adhesión celular, generando una disminución de la adherencia celular por parte de las células leucémicas, lo cual se ha asociado como un mecanismo que permite la progresión de la enfermedad (Jiang *et al.*, 2020).

En relación a este punto, es importante mencionar que existen muy pocos reportes en donde se analice el efecto de células del microambiente proveniente de médula ósea normal sobre la hematopoyesis leucémica, pero lo que sí ha sido demostrado es que en condiciones normales las MSC participan y regulan activamente la hematopoyesis a través de lo que se ha denominado “soporte hematopoyético”, en el cual la producción de diferentes moléculas por parte de la población mesenquimal influye directamente sobre la quiescencia, proliferación y diferenciación de las células normales, tanto troncales hematopoyéticas como de su progenie (Blanc, 2009; Nagasawa *et al.*, 2011). No obstante, este equilibrio en el soporte hematopoyético puede verse modificado dependiendo del estado de envejecimiento de las MSC ya que se ha demostrado que las MSC de médula ósea sufren alteraciones asociadas a la senescencia (Baker *et al.*, 2014) lo que conduce a un deterioro de sus funciones contribuyendo a una disminución progresiva en el mantenimiento y reparación del microambiente, debido a que ocurren modificaciones en su perfil de expresión génica, epigenética y secretoma, donde las células de soporte adoptan una condición denominada como “fenotipo secretor asociado a senescencia” (SASP, por sus siglas en inglés “*senescence-associated secretory phenotype*”) (Neri, & Borzi, 2020), caracterizado por una mayor secreción de factores de crecimiento, factores angiogénicos, factores de remodelación de la matriz extracelular y especialmente citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-8 e IL-6, esta última implicada en el soporte del crecimiento tumoral y la promoción de diferenciación hematopoyética hacia linajes mieloides (Massaro *et al.*, 2021; O'Hagan-Wong *et al.*, 2016).

Estas observaciones son relevantes ya que se debe considerar que en este trabajo se utilizó como fuente de MSC, muestras de médula ósea proveniente de sujetos hematológicamente sanos pero que presentaban un promedio de edad de 72 años (ver tabla 1 en resultados), lo cual puede estar asociado con una reducción de la capacidad de las MSC para frenar eficientemente el crecimiento leucémico, tal y como ha sido observado en trabajos en donde se utilizan como modelo de estudio, MSC obtenidas de fuentes más jóvenes como sangre de cordón umbilical, donde la proliferación de la línea K562 disminuye considerablemente en cocultivo de contacto directo (Fonseka *et al.*, 2012) o MSC provenientes de gelatina de Wharton, que muestran una capacidad inhibitoria del crecimiento leucémico mediante la detención del ciclo celular e inducción de apoptosis por la disminución de una gama de factores proinflamatorios como IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12A, y aumento de factores antiinflamatorios como IL-4 e IL-10 (Huwaikem *et al.*, 2021).

Aunado a lo anterior esta pérdida de la funcionalidad y soporte hematopoyético de las MSC causado por el envejecimiento podría justificar por qué la LMC tiene mayor incidencia en grupos de adultos mayores, dado que la remodelación de la MO en estos individuos puede generar un microambiente permisivo que promueva el desarrollo leucémico (Aristizábal *et al.*, 2014; Massaro *et al.*, 2020) y culmine con otras alteraciones como el aumento de adipocitos y surgimiento de la hematopoyesis clonal relacionada con una mayor densidad de células mieloides, así como disminución del linaje linfóide (Flores-Figueroa *et al.*, 2016; Aguilar-Navarro *et al.*, 2020).

Un punto importante de comentar es que contrario a lo que sucede con el soporte hematopoyético normal, los modelos de estudio en donde se usan células mesenquimales provenientes de condiciones leucémicas han demostrado que se induce un aumento en la proliferación *in vitro* de las poblaciones hematopoyéticas leucémicas (Brenner *et al.*, 2017; Azadniv *et al.*, 2020), lo que ha llevado a plantear que las MSC provenientes de leucemia presentan alteraciones funcionales que permiten la permanencia leucémica.

Existen pocos reportes acerca de estas alteraciones funcionales que presentan las MSC en LMC, pero de manera generalizada se ha observado que estas células no presentan el oncogén *Bcr::Abl1*, y son muy semejantes a las MSC normales en cuanto al fenotipo, morfología y capacidad de diferenciación multilinaje (Zhao *et al.*, 2006). Sin embargo, un reporte reciente de Xu *et al.*, (2021) ha demostrado que a nivel transcripcional las MSC de LMC presentan una desregulación de la expresión de genes asociados a *WNT/β-catenina*, *CTNNB1*, *CMYC*, *LEF1* y *FRZB*, lo que genera alteraciones en su proliferación, además de un fenotipo senescente. Esto se acompaña con un deterioro de la capacidad para soportar la hematopoyesis normal de células CD34+.

Ante esta evidencia acerca de la alteración a nivel genómico y fisiológico, también se ha evaluado si las MSC leucémicas presentan la capacidad de regresar a un estado homeostático cuando los pacientes alcanzan la remisión de la enfermedad. De acuerdo con Aggoune y colaboradores (2017) se ha encontrado que las MSC de LMC tienen una expresión aberrante de los genes *BMP1*, *FOXO3*, *MET*, *MITF*, *NANOG*, y *PDPN*, lo que no sucede con su contraparte normal. Además, al comparar este perfil inicial con MSC de pacientes provenientes de sujetos que han alcanzado una respuesta molecular profunda inducida por el tratamiento TKI, se encontró que prácticamente todos los genes (con excepción de *FOXO3*), se mantenían regulados al alza, lo que sugiere que estas células mesenquimales conservan una expresión genética anormal aún después del tratamiento y eliminación de la población leucémica.

De manera interesante y de acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, se observó que pese al incremento en el número celular leucémico tras el cultivo con MSC normales, el índice de proliferación fue muy semejante al compararlo con los controles (sin células mesenquimales y en ausencia o presencia de SFB), encontrando que en promedio todos los grupos experimentales se dividieron aproximadamente ocho veces (Figura 4E), aunque su porcentaje de viabilidad era diferente (Figura 4C) ya que la única condición que se mantuvo con la viabilidad cercana al 100% fue el cultivo de la línea K562 en presencia de SFB, lo que ya ha sido descrito

previamente por nuestro grupo (Flores-López *et al.*, 2018) y que corresponde al comportamiento habitual en esta línea celular leucémica.

La observación del alto número celular y baja viabilidad en los cocultivos con células mesenquimales, sugirió la posibilidad de que además de la proliferación, algún otro evento pudiera estar sucediendo de forma simultánea en el cultivo, lo que correlaciona con el hallazgo en nuestras evaluaciones del incremento en el nivel de muerte celular (tanto total como temprana) después de tres días de cocultivo (Figura 6). Estos datos coinciden con lo reportado por Fathi *et al.*, (2019), donde demuestran que las MSC derivadas de MO normal inducen un incremento en apoptosis sobre las células K562 después de 7 días de cocultivo. Además, en este estudio también se encontró un aumento de la fase G_0/G_1 disminuyendo el porcentaje de células proliferantes, lo cual parece estar asociado con un incremento de TIMP-1 y CINC-1, citocinas que incluso podrían estar involucradas en la inducción de la apoptosis de las células K562 a través de las vías de BAX y caspasa-3. Cabe mencionar que las diferencias menores entre lo reportado por Fathi y el presente trabajo podrían estar asociadas a los distintos tiempos de evaluación (3 y 7 días respectivamente) utilizados en cada caso y al hecho de que la fuente de MSC utilizada por ellos fueron MSC derivadas de médula ósea murina.

En ese mismo sentido, Han y colaboradores (2013) reportaron que el cocultivo de MSC de MO normal disminuía el crecimiento e inducía apoptosis en células K562 y células hematopoyéticas de LMC en fase blástica, efecto que se potenciaba cuando éstas eran tratadas previamente con el agente quimioterapéutico Adriamicina. Aunado a lo anterior, recientemente Huwaikem y colaboradores (2020), encontraron que MSC provenientes de gelatina de Warton, fueron capaces de inducir apoptosis y detención del ciclo celular de la línea celular K562 cuando eran cocultivadas o expuestas sus medios condicionados, esto a través de los factores solubles que aumentaban la expresión de los agentes proapoptótico *BAX* y *Caspasa-3*, a la par que disminuía la expresión del gen *BIRC5* que codifica para la proteína Survivina, miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis.

Los reportes antes mencionados aunados a los hallazgos de este trabajo, sugieren que independientemente de la fuente de origen, las MSC normales son capaces de inducir apoptosis en poblaciones leucémicas (líneas celulares o muestras primarias); además dicho efecto pudiera estar asociado con el tiempo de cocultivo y el estado de envejecimiento de las células MSC, pero bajo cualquier circunstancia el microambiente debería favorecer la activación de mecanismos de señalización de muerte celular a través de la secreción de factores solubles que aunque en este trabajo no fueron analizados, es posible que en los medios condicionados (mismos que fueron obtenidos y congelados, para futuros estudios), se puedan detectar moléculas asociadas con la inducción de la apoptosis.

Aunado a lo anterior, Wei y colaboradores (2009), observaron que el uso de MSC provenientes de pacientes con LMC, LMA y LLA también tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de células K562 en cocultivos con o sin contacto directo, provocando al mismo tiempo la permanencia de las células leucémicas en las fases G_0/G_1 del ciclo celular, lo que las protege de su agotamiento. Así mismo, dicho efecto protector parece mantenerse en algunas células incluso cuando las células mesenquimales provienen de MO de LMC en crisis blástica, ya que

se ha observado que existe un incremento de la actividad antiapoptótica mediante la activación de la señalización de la vía Wnt cuando son cocultivadas con la línea celular K562 o células leucémicas en crisis blástica (Han *et al.*, 2013). Un efecto semejante también ha sido reportado en patologías como mieloma múltiple, en donde se ha descrito que las células malignas en contacto o sin contacto con MSC de la misma patología adquieren una condición protectora que parece estar mediada no solo por factores solubles sino por la interacción entre ambos tipos celulares contribuyendo así a la permanencia tumoral (Nefedova, 2003).

Si bien es cierto que la información generada parece sugerir que el microambiente leucémico favorece el mantenimiento de la enfermedad, pocos estudios se han enfocado en analizar la permanencia de las poblaciones primitivas leucémicas tras el cocultivo con el componente microambiental. En ese sentido este trabajo presenta una aproximación al evaluar poblaciones troncales, progenitoras y precursoras hematopoyéticas después del cocultivo con MSC normales, encontrando que, aunque no hay cambios significativos en la frecuencia de las poblaciones progenitoras y precursoras leucémicas, existe una tendencia a su aumento en la condición de cocultivo y control negativo (Figura 7 C y D respectivamente). Sin embargo, en el caso de la población con fenotipo troncal (CD34+CD38-), hubo una aparente disminución en el cocultivo con respecto a la población celular inicial (Figura 7A).

Estos datos deben ser tomados con cautela, ya que aunque es bien conocido que la LMC y la LMA se originan en poblaciones con fenotipos troncales (CD34+CD38-) que presentan organización jerárquica (Lapidot *et al.*, 1994 y Holyoake *et al.*, 1999), no debe perderse de vista que la evaluación aquí presentada se realizó con una línea celular (K562) proveniente de una LMC en crisis blástica, en donde pudiera existir un cambio en la expresión de los marcadores de superficie incluidos los asociados a troncalidad, tal y como se ha descrito para las Leucemias Mieloides Agudas (Eppert *et al.*, 2011), por lo que la evaluación de la permanencia de las distintas poblaciones sería mucho más contundente si se hubiera realizado en muestras provenientes de sujetos con LMC en fase crónica.

11. CONCLUSIÓN

Es un hecho de que el microambiente de la médula ósea desempeña un papel fundamental en la regulación del sistema hematopoyético tanto normal como patológico. Sin embargo, aún existen importantes interrogantes sobre cómo es que cada uno de sus componentes biológicos participan. En ese sentido, en el presente trabajo evidenciamos que la hematopoyesis en LMC puede ser regulada negativamente por MSC normales provenientes de adultos mayores, al reducir su viabilidad celular e inducir muerte por apoptosis, efecto que de inicio puede indicar un papel antileucémico proveniente del microambiente normal. Sin embargo, cabe también la posibilidad que este efecto no sea tan evidente, debido a una pérdida de la funcionalidad y soporte hematopoyético por parte de las MSC asociado al envejecimiento, lo que en parte puede explicar por qué la LMC tiene una mayor incidencia en grupos de adultos mayores.

Aunado a lo anterior, es muy probable que los efectos de las MSC sobre células leucémicas sea también dependiente de la etapa de la enfermedad, ya que en este trabajo se utilizó la línea K562 que representa la última fase (crisis blástica), y ha demostrado tener mayores alteraciones que las células provenientes de la fase crónica, por lo que la caracterización de los componentes microambientales sobre la hematopoyesis leucémica en general, debe considerar entre otros elementos: el tipo de leucemia, la etapa de la enfermedad, el tipo de componente microambiental (MSC, adipocitos, endotelio, etc.), así como la fuente (normal o leucémico) y edad del mismo.

12. PERSPECTIVAS

Con el fin de complementar el entendimiento de la participación de las MSC normales en la hematopoyesis de la LMC se proponen las siguientes perspectivas:

- Realizar la medición de qué citocinas y factores de crecimiento que se produjeron en los medios condicionados de cada grupo experimental utilizados en este trabajo con el fin de asociarlos con los procesos de proliferación e inducción de apoptosis observado en la línea K562.
- Evaluar el ciclo celular de las células K562 antes y después del cocultivo, a fin de dilucidar si hay una fracción de células leucémicas que pasan o permanezcan en un estado quiescente y definir qué características presenta dicha población (inmunofenotipo, moléculas de adhesión, expresión de genes).
- Evaluar los mismos procesos celulares utilizando MSC derivadas de médula ósea normal proveniente de sujetos jóvenes o en su defecto SCU o gelatina de Warton para contrastar los resultados obtenidos en este proyecto.
- Incluir un control de células primitivas hematopoyéticas normales provenientes de Médula Ósea Normal que permita evaluar qué efecto tiene su interacción con MSC normales de adultos mayores sobre su proliferación, diferenciación y ciclo celular, con el fin de evaluar la capacidad de soporte hematopoyético por parte de la población mesenquimal.
- Para poder contrastar los resultados del microambiente normal vs el leucémico, sería importante obtener MSC de MO de pacientes recién diagnosticados, sin tratamiento y/o en diferentes etapas de la enfermedad (fase crónica y crisis blástica).
- Dado que la interacción celular en nuestro modelo de cocultivo es bidireccional, sería importante evaluar qué efecto tiene esta interacción sobre la población mesenquimal, si la interacción leucémica genera cambios en la diferenciación a un linaje determinado e inmunofenotipo antes y después del cocultivo.

13. REFERENCIAS

Agarwal, P., Isringhausen, S., Li, H., Paterson, A. J., He, J., Gomariz, Á., ... & Bhatia, R. (2019). Mesenchymal niche-specific expression of Cxcl12 controls quiescence of treatment-resistant leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 24(5), 769-784.

Aggoune, D., Sorel, N., Bonnet, M. L., Goujon, J. M., Tarte, K., Héroult, O., Domenech, J., Réa, D., Legros, L., Johnson-Ansa, H., Rousselot, P., Cayssials, E., Guerci-Bresler, A., Bennaceur-Griscelli, A., Chomel, J. C., & Turhan, A. G. (2017). Bone marrow mesenchymal stromal cell (MSC) gene profiling in chronic myeloid leukemia (CML) patients at diagnosis and in deep molecular response induced by tyrosine kinase inhibitors (TKIs). *Leukemia research*, 60, 94–102. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.leukres.2017.07.007>

Aguilar-Navarro, A. G., Meza-León, B., Gratzinger, D., Juárez-Aguilar, F. G., Chang, Q., Ornatsky, O., Tsui, H., Esquivel-Gómez, R., Hernández-Ramírez, A., Xie, S. Z., Dick, J. E., & Flores-Figueroa, E. (2020). Human Aging Alters the Spatial Organization between CD34+ Hematopoietic Cells and Adipocytes in Bone Marrow. *Stem cell reports*, 15(2), 317–325. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.stemcr.2020.06.011>.

Apperley, J. F. (2015). Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*, 385(9976), 1447-1459.

Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ... & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2391-2405.

Aristizábal, J. A., Chandia, M., Del Cañizo, M. C., & Sánchez-Guijo, F. (2014). Microambiente medular en la leucemia mieloide crónica: su relación con la enfermedad y la respuesta al tratamiento [Bone marrow microenvironment in chronic myeloid leukemia: implications for disease physiopathology and response to treatment]. *Revista médica de Chile*, 142(5), 599–605. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.4067/S0034-98872014000500008>

Arranz, L., Sánchez-Aguilera, A., Martín-Pérez, D., Isern, J., Langa, X., Tzankov, A., ... & Méndez-Ferrer, S. (2014). Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*, 512(7512), 78-81.

Avilés-Vázquez, S., Chávez-González, A., & Mayani, H. (2013). Tyrosine kinase inhibitors (TKI): a new revolution in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). *Gaceta Médica de México*, 149(6), 646-654.

Baker, N., Boyette, L. B., & Tuan, R. S. (2015). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, 70, 37–47. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.bone.2014.10.014>.

Balderman, S. R., & Calvi, L. M. (2014). Biology of BM failure syndromes: role of microenvironment and niches. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2014(1), 71-76.

Baldrige, M. T., King, K. Y., Boles, N. C., Weksberg, D. C., & Goodell, M. A. (2010). Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- γ in response to chronic infection. *Nature*, 465(7299), 793-797.

Bhatia, R., McGlave, P. B., Dewald, G. W., Blazar, B. R., & Verfaillie, C. M. (1995). Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages.

Blau, O., Hofmann, W. K., Baldus, C. D., Thiel, G., Serbent, V., Schümann, E., ... & Blau, I. W. (2007). Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Experimental hematology*, 35(2), 221-229.

Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3(7), 730–737. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nm0797-730>

Bøyum A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum*, 97, 77–89.

Brenner, A. K., Nepstad, I., & Bruserud, Ø. (2017). Mesenchymal Stem Cells Support Survival and Proliferation of Primary Human Acute Myeloid Leukemia Cells through Heterogeneous Molecular Mechanisms. *Frontiers in immunology*, 8, 106. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fimmu.2017.00106>

Bujko K., Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak MZ (2019) Células madre y progenitoras hematopoyéticas (CTPH). En: Ratajczak M. (eds) *Stem Cells. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1201. Springer, Cham. https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-3-030-31206-0_3

Calvi, L. M., & Link, D. C. (2015). The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 126(22), 2443-2451.

Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., ... & Scadden, D. T. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960), 841-846.

Chahardouli, B., Zaker, F., Mousavi, S. A., Kazemi, A., Ostadali, M., Nadali, F., ... & Ghavamzade, A. (2013). Evaluation of T315I mutation frequency in chronic myeloid leukemia patients after imatinib resistance. *Hematology*, 18(3), 158-162.

Chávez-González, A., Rosas-Cabral, A., Vela-Ojeda, J., González, J. C., & Mayani, H. (2004). Severe functional alterations in vitro in CD34+ cell subpopulations from patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia research*, 28(6), 639-647.

Chávez-González, M. A., Ayala-Sánchez, M., & Mayani, H. (2009). La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento [Chronic myeloid leukemia in the 21st century: biology and treatment]. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 61(3), 221–232.

Chen, J. Y., Miyanishi, M., Wang, S. K., Yamazaki, S., Sinha, R., Kao, K. S., ... & Weissman, I. L. (2016). Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature*, 530(7589), 223-227.

Comazzetto, S., Shen, B., & Morrison, S. J. (2021). Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Developmental cell*, 56(13), 1848-1860.

Corrado, C., Saieva, L., Raimondo, S., Santoro, A., De Leo, G., & Alessandro, R. (2016). Chronic myelogenous leukaemia exosomes modulate bone marrow microenvironment through activation of epidermal growth factor receptor. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(10), 1829-1839.

Crane, G. M., Jeffery, E., & Morrison, S. J. (2017). Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 573-590.

De Lima, M., McNiece, I., Robinson, S. N., Munsell, M., Eapen, M., Horowitz, M., ... & Shpall, E. J. (2012). Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *New England Journal of Medicine*, 367(24), 2305-2315.

Dexter, T. M., Allen, T. D., & Lajtha, L. G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Journal of cellular physiology*, 91(3), 335-344.

Ding, L., & Morrison, S. J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*, 495(7440), 231-235.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1080/14653240600855905>

- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell*, 10(2), 120-136.
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., ... & Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. *Nature medicine*, 2(5), 561-566.
- Duchosal, M. A., & Trumpp, A. (2009). IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*, 458(7240), 904908.
- Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E. R., Waldron, L., Nilsson, B., Van Galen, P., ... & Dick, J. E. (2011). Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nature medicine*, 17(9), 1086-1093.
- Feng-Juan, Lv., Tuan, R. S., Cheung, K. M., & Leung, V. Y. (2014). Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*, 32(6), 1408-1419.
- Flach, J., & Milyavsky, M. (2018). Replication stress in hematopoietic stem cells in mouse and man. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 808, 74-82.
- Flores-Figueroa, E., & Gratzinger, D. (2016). Beyond the Niche: Myelodysplastic Syndrome Topobiology in the Laboratory and in the Clinic. *International journal of molecular sciences*, 17(4), 553. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/ijms17040553>.
- Flores-Lopez, G., Moreno-Lorenzana, D., Ayala-Sanchez, M., Aviles-Vazquez, S., Torres-Martinez, H., Crooks, P. A., ... & Chávez-González, A. (2018). Parthenolide and DMAPT induce cell death in primitive CML cells through reactive oxygen species. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(10), 4899-4912.
- Gallipoli, P., Pellicano, F., Morrison, H., Laidlaw, K., Allan, E. K., Bhatia, R., ... & Holyoake, T. L. (2013). Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(19), 3335-3339.
- Giam, M., & Rancati, G. (2015). Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell division*, 10(1), 3.
- Giustacchini, A., Thongjuea, S., Barkas, N., Woll, P. S., Povinelli, B. J., Booth, C. A., ... & Mead, A. J. (2017). Single-cell transcriptomics uncovers distinct molecular signatures of stem cells in chronic myeloid leukemia. *Nature medicine*, 23(6), 692-702.
- Groarke, E. M., & Young, N. S. (2019). Aging and Hematopoiesis. *Clinics in geriatric medicine*, 35(3), 285–293. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.cger.2019.03.001>
- Guinn, B. A., & Mills, K. I. (1997). p53 mutations, methylation and genomic instability in the progression of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia & lymphoma*, 26(3-4), 211-226.
- Han, Y., Wang, Y., Xu, Z., Li, J., Yang, J., Li, Y., Shang, Y., & Luo, J. (2013). Effect of bone marrow mesenchymal stem cells from blastic phase chronic myelogenous leukemia on the growth and apoptosis of leukemia cells. *Oncology reports*, 30(2), 1007–1013.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Haznedaroğlu, İ. C., Kuzu, I., & İlhan, O. (2020). WHO 2016 definition of chronic myeloid leukemia and tyrosine kinase inhibitors. *Turkish Journal of Hematology*, 37(1), 42.
- He, Q., Wan, C., & Li, G. (2007). Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem cells*, 25(1), 69-77.

- Ho, Y. H., Del Toro, R., Rivera-Torres, J., Rak, J., Korn, C., García-García, A., ... & Méndez-Ferrer, S. (2019). Remodeling of bone marrow hematopoietic stem cell niches promotes myeloid cell expansion during premature or physiological aging. *Cell stem cell*, 25(3), 407-418.
- Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C., & Eaves, A. (1999). Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 94(6), 2056–2064.
- Houshmand, M., Simonetti, G., Circosta, P., Gaidano, V., Cignetti, A., Martinelli, G., ... & Gale, R. P. (2019). Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia*, 33(7), 1543-1556.
- Huwaikem, M. A., Kalamegam, G., Alrefaei, G., Ahmed, F., Kadam, R., Qadah, T., ... & Pushparaj, P. N. (2021). Human Wharton's Jelly Stem Cell Secretions Inhibit Human Leukemic Cell Line K562 in vitro by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 614988.
- Jiang, X., Lopez, A., Holyoake, T., Eaves, A., & Eaves, C. (1999). Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12804-12809.
- Jiang, Y. H., Liu, J., Lin, J., Li, S. Q., Xu, Y. M., Min, Q. H., ... & Wang, X. Z. (2020). K562 cell-derived exosomes suppress the adhesive function of bone marrow mesenchymal stem cells via delivery of miR-711. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(3), 584-589.
- Kiel, M. J., Yilmaz, Ö. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C., & Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *cell*, 121(7), 1109-1121.
- Kumar, A., Anand, T., Bhattacharyya, J., Sharma, A., & Jaganathan, B. G. (2018). K562 chronic myeloid leukemia cells modify osteogenic differentiation and gene expression of bone marrow stromal cells. *Journal of cell communication and signaling*, 12(2), 441–450. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s12079-017-0412-8>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., & Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645–648. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/367645a0>
- Le Blanc K. (2009). Hematopoiesis does not always get support from MSC. *Cytotherapy*, 11(6), 674–675. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3109/14653240903332115>
- Li, T., & Wu, Y. (2011). Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. *Bone marrow research*, 2011.
- Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Bamberger, E. G., & Feliu, A. S. (1981). A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 166(4), 546–550. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3181/00379727-166-41106>
- Lucas, D., Battista, M., Shi, P. A., Isola, L., & Frenette, P. S. (2008). Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell stem cell*, 3(4), 364-366.
- Lyons, A. B., Blake, S. J., & Doherty, K. V. (2013). Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Current protocols in cytometry*, Chapter 9, Unit9.11. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/0471142956.cy0911s64>
- Massaro, F., Corrillon, F., Stamatopoulos, B., Meuleman, N., Lagneaux, L., & Bron, D. (2020). Aging of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Hematopoiesis Disturbances and Potential Role in the Development of Hematologic Cancers. *Cancers*, 13(1), 68. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3390/cancers13010068>

- Mayani, H. (2003). A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of medical research*, 34(1), 3-15.
- Melo, J. V., Gordon, D. E., Cross, N. C., & Goldman, J. M. (1993). The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 81(1), 158–165.
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghobrial, I. M., Gribben, J. G., ... & Krause, D. S. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 20(5), 285-298.
- Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., & Frenette, P. S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452(7186), 442-447.
- Mirantes, C., Passequé, E., & Pietras, E. M. (2014). Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Experimental cell research*, 329(2), 248-254.
- Morrison, S. J., & Scadden, D. T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505(7483), 327-334.
- Nagasawa, T., Omatsu, Y., & Sugiyama, T. (2011). Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends in immunology*, 32(7), 315–320. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.it.2011.03.009>.
- Nefedova, Y., Landowski, T. H., & Dalton, W. S. (2003). Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia*, 17(6), 1175–1182. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/sj.leu.2402924>
- Neri, S., & Borzì, R. M. (2020). Molecular mechanisms contributing to mesenchymal stromal cell aging. *Biomolecules*, 10(2), 340.
- O'Hagan-Wong, K., Nadeau, S., Carrier-Leclerc, A., Apablaza, F., Hamdy, R., Shum-Tim, D., Rodier, F., & Colmegna, I. (2016). Increased IL-6 secretion by aged human mesenchymal stromal cells disrupts hematopoietic stem and progenitor cells' homeostasis. *Oncotarget*, 7(12), 13285–13296. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.18632/oncotarget.7690>
- Pantoja, M. D., Romero-Ramirez, H., & Alba, J. C. R. (2015). Células Madre Hematopoyéticas: origen, diferenciación y función. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1), 29-37.
- Passequé, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C., & Weissman, I. L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *The Journal of experimental medicine*, 202(11), 1599-1611.
- Pinho, S., Marchand, T., Yang, E., Wei, Q., Nerlov, C., & Frenette, P. S. (2018). Lineage-biased hematopoietic stem cells are regulated by distinct niches. *Developmental cell*, 44(5), 634-641.
- Poggi, A., Musso, A., Dapino, I., & Zocchi, M. R. (2014). Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immunology letters*, 159(1-2), 55-72.
- Popp, H. D., Kohl, V., Naumann, N., Flach, J., Brendel, S., Kleiner, H., ... & Fabarius, A. (2020). DNA damage and dna damage response in chronic myeloid leukemia. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1177.
- Quah, B. J., & Parish, C. R. (2010). The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (44), 2259. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3791/2259>
- Raaijmakers, M. H., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., ... & Scadden, D. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, 464(7290), 852-857.

- Rea, D., & Mahon, F. X. (2018). How I manage relapse of chronic myeloid leukaemia after stopping tyrosine kinase inhibitor therapy. *British Journal of Haematology*, 180(1), 24-32.
- Reynaud, D., Pietras, E., Barry-Holson, K., Mir, A., Binnewies, M., Jeanne, M., ... & Passegué, E. (2011). IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer cell*, 20(5), 661-673.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., ... & Bianco, P. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131(2), 324-336.
- Sala-Torra, O., Hanna, C., Loken, M. R., Flowers, M. E., Maris, M., Ladne, P. A., ... & Radich, J. P. (2006). Evidence of donor-derived hematologic malignancies after hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 12(5), 511-517.
- Saldívar-Santoyo, H. J., Flores-Guzmán, P., Mayani, H., & Flores Figueroa, E. (2013). El nicho de las células troncales: los secretos de su " código postal". *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 56(3), 47-59.
- Sarmadi, V. H., Ahmadloo, S., Boroojerdi, M. H., John, C. M., Al-Graite, S., Lawal, H., Maqbool, M., Hwa, L. K., & Ramasamy, R. (2020). Human Mesenchymal Stem Cells-mediated Transcriptomic Regulation of Leukemic Cells in Delivering Anti-tumorigenic Effects. *Cell transplantation*, 29, 963689719885077. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1177/0963689719885077>
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, 4(1-2), 7-25.
- Shen, B., Tasdogan, A., Ubellacker, J. M., Zhang, J., Nosyreva, E. D., Du, L., ... & Morrison, S. J. (2021). A mechanosensitive peri-arteriolar niche for osteogenesis and lymphopoiesis. *Nature*, 591(7850), 438-444.
- Stark, D. P., Vassal, G., Stahel, R. A., & Peters, S. (2016). Tumors in adolescents and young adults. *Karger*. vol 43, pp 87-100. doi: 10.1159/000447076
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), 977-988.
- Szade, K., Gulati, G. S., Chan, C. K., Kao, K. S., Miyanishi, M., Marjon, K. D., ... & Weissman, I. L. (2018). Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche. *Antioxidants & redox signaling*, 29(2), 191-204.
- Tarafdar, A., Hopcroft, L. E., Gallipoli, P., Pellicano, F., Cassels, J., Hair, A., ... & Michie, A. M. (2017). CML cells actively evade host immune surveillance through cytokine-mediated downregulation of MHC-II expression. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(2), 199-208.
- Thomas, D., & Majeti, R. (2017). Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(12), 1577-1585.
- Thomson, R. J., Moshirfar, M., & Ronquillo, Y. (2022). Tyrosine Kinase Inhibitors. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Torres-Barrera, P., Mayani, H., & Chávez-González, A. (2021). Understanding the hematopoietic microenvironment in chronic myeloid leukemia: A concise review. *Current Research in Translational Medicine*, 69(3), 103295.
- Tubbs, A., & Nussenzweig, A. (2017). Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell*, 168(4), 644-656.
- Valletta, S., Thomas, A., Meng, Y., Ren, X., Drissen, R., Sengül, H., ... & Nerlov, C. (2020). Micro-environmental sensing by bone marrow stroma identifies IL-6 and TGFβ1 as regulators of hematopoietic ageing. *Nature communications*, 11(1), 1-13.

- Wei, Z., Chen, N., Guo, H., Wang, X., Xu, F., Ren, Q., Lu, S., Liu, B., Zhang, L., & Zhao, H. (2009). Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 28(1), 141. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/1756-9966-28-141>.
- Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., ... & Lévesque, J. P. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(23), 4815-4828.
- Xishan, Z., Guangyu, A., Yuguang, S., & Hongmei, Z. (2011). The research on the immuno-modulatory defect of mesenchymal stem cell from Chronic Myeloid Leukemia patients. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 30(1), 47. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/1756-9966-30-47>
- Xu, R., Huang, X., Li, C., Deng, C., Li, M., Wu, P., Geng, S., Lai, P., Lu, Z., Weng, J., & Du, X. (2021). Bone marrow mesenchymal stromal cells in chronic myelomonocytic leukaemia: overactivated WNT/ β -catenin signalling by parallel RNA sequencing and dysfunctional phenotypes. *British journal of haematology*, 193(5), 928–940. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/bjh.17425>
- Yamaguchi, M., Hirayama, F., Murahashi, H., Azuma, H., Sato, N., Miyazaki, H., ... & Ikebuchi, K. (2002). Ex vivo expansion of human UC blood primitive hematopoietic progenitors and transplantable stem cells using human primary BM stromal cells and human AB serum. *Cytherapy*, 4(2), 109-118.
- Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., ... & Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*, 147(5), 1146-1158.
- Zhang, B., Ho, Y. W., Huang, Q., Maeda, T., Lin, A., Lee, S. U., ... & Bhatia, R. (2012). Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer cell*, 21(4), 577-592.
- Zhang, B., Li, M., McDonald, T., Holyoake, T. L., Moon, R. T., Campana, D., ... & Bhatia, R. (2013). Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt- β -catenin signaling. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(10), 1824-1838.
- Zhang, H. M., & Zhang, L. S. (2009). Influence of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation of chronic myeloid leukemia cells. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*, 28(1), 29–32.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., ... & Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960), 836-841.
- Zhang, X., Yang, Y., Yang, Y., Chen, H., Tu, H., & Li, J. (2020). Exosomes from bone marrow microenvironment-derived mesenchymal stem cells affect CML cells growth and promote drug resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Stem cells international*, 2020.
- Zhao, M., Perry, J. M., Marshall, H., Venkatraman, A., Qian, P., He, X. C., ... & Li, L. (2014). Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature medicine*, 20(11), 1321-1326.
- Zhao, Z., Tang, X., You, Y., Li, W., Liu, F., & Zou, P. (2006). Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hemotopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia research*, 30(8), 993–1003. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.leukres.2005.12.010>
- Zhu, Y., Sun, Z., Han, Q., Liao, L., Wang, J., Bian, C., ... & Zhao, R. C. (2009). Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*, 23(5), 925-933.