



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**ESTUDIO DEL NICHOS RETICULAR HEMATOPOYÉTICO DE MÉDULA ÓSEA
EN PERROS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
AELA BERENICE MEZA LEÓN

TUTOR: DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XX1. INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XX1. INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

ENRIQUE MARTIN ABURTO FERNÁNDEZ
UNIVERSIDAD DE SASKATCHEWAN, CANADÁ

CIUDAD DE MEXICO, MAYO 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.

DEDICATORIA

A mi papá, porque donde esté, sabe que es para él y por él.

A mi mamá, porque sin ti nada sería igual...gracias siempre por todo tu apoyo.

A mis hermanos y sus familias por su apoyo, compañía, y por creer en mí.

A mis amigos, a los que estuvieron, a los que llegaron, a los que se fueron, porque cada uno contribuyo en cada etapa.

A mis criaturas de 4 patitas que han estado conmigo por años haciendo mejores mis días.

“Debidamente entrenado, un hombre puede ser el mejor amigo de un perro”

Corey Ford

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM)

A la Dra. Eugenia Flores Figueroa por incluirme en su grupo de trabajo y permitirme lograr un trabajo de gran calidad y grandes colaboraciones académicas.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Juan José Montesinos Montesinos y Dr. Enrique Martín Aburto Fernández por todas sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A los MVZ Samuel Medina, Ariel Meza, Nadia Rangel, Beremiz Sánchez y Álvaro Zugarazo por la facilidad en la obtención de muestras de sus pacientes.

A la Dra. Alicia Guadalupe Aguilar Navarro por toda la asesoría brindada para la mejora del trabajo y por todas las horas de trabajo en equipo.

A la QFB. Mónica Reynoso Espinal por la asesoría y entrenamiento en las técnicas de laboratorio.

A los histotecnólogos Jorge Anaya y Víctor Pérez por el apoyo en la realización de las técnicas histológicas.

Al centro de instrumentos de Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la facilidad para el uso del citómetro de Flujo.

Al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Centro Médico Nacional Siglo XXI por la facilidad en el servicio de escaneo de muestras histológicas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice.....	4
Lista de cuadros	7
Lista de figuras	8
Resumen.....	10
Abstract.....	11
Introducción.....	12
Hematopoyesis.....	12
Hematopoyesis primitiva y definitiva.....	13
Célula troncal hematopoyética.....	15
Estructura de la médula ósea	16
Componentes de la médula ósea.....	18
Localización <i>in situ</i> de las HSC.....	19
El nicho de las células troncales hematopoyéticas en ratón.....	20
Nicho endosteal.....	21
Nicho perivascular.....	22
Células BMSC LepR+.....	22
Células CAR.....	23
El nicho de las células troncales hematopoyéticas en humano.....	24
Antecedentes.....	25
Hematopoyesis en perros.....	26
Células troncales hematopoyéticas en perros.....	26
Justificación.....	27
Hipótesis.....	28
Objetivo general	28
Objetivos particulares.....	28
Materiales y métodos.....	29
Muestras de biopsias de médula ósea	29
Criterios de inclusión	30

Criterios de exclusión.....	30
Procesamiento histológico.....	30
Evaluación histológica.....	31
Inmunohistoquímica	32
Adquisición y análisis de imagen.....	32
Procesamiento de médula ósea	33
Obtención de células mononucleares	34
Ensayo de colonias de progenitores hematopoyéticos.....	34
Ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F).....	35
Evaluación de la frecuencia de células hematopoyéticas y BMSC por citometría de flujo.....	36
Obtención de células estromales de médula ósea (BMSC).....	37
Identificación de BMSC mediante la técnica de citometría de flujo	38
Evaluación de la capacidad de diferenciación a otros linajes celulares	39
Ensayos de proliferación celular.....	41
Estadística.....	42
Resultados	42
Muestras de médula ósea	42
Evaluación histológica de médula ósea de perros y su comparación con humano y ratón.....	43
Efecto del envejecimiento en la composición de la médula ósea en perros, humano y ratón.....	47
Expresión de marcadores <i>in situ</i> de células estromales en médula ósea (BMSC).....	47
Determinación de la población BMSC CD271+ en médula ósea de perro.	48
Determinación de la población BMSC LepR ⁺ en médula ósea de ratón ...	49
Determinación de la población BMSC CD10 ⁺ en médula ósea.....	52
Frecuencia de BMSC en humanos, ratones y perros.....	52
Determinación de la frecuencia de células progenitores/troncales hematopoyéticas y BMSC en médula ósea de perro.....	58

Frecuencia de progenitores hematopoyéticos mediante ensayos de formación de colonias in vitro.....	60
Frecuencia de células estromales mesenquimales (BMSC) mediante ensayos de formación de colonias in vitro.....	61
Caracterización y evaluación de la funcionalidad de las BMSC de médula ósea de perro.....	62
Determinación del fenotipo de las BMSC de perro mediante citometría de flujo.....	62
Evaluación de la capacidad de diferenciación in vitro de las BMSC de perro hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos.....	63
Evaluación de la capacidad de proliferación in vitro en BMSC de perro....	64
Discusión.....	66
Conclusiones.....	76
Perspectivas.....	77
Referencias.....	78
Anexo 1. Consentimiento verbal humanos.....	88
Anexo 2. Consentimiento verbal perros.....	89

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de la hematopoyesis en el ratón y humano.....	14
Cuadro 2. Características de las Células Troncales Hematopoyéticas en ratón y humano	15
Cuadro 3. Valores hematológicos en humano y ratón.....	18
Cuadro 4. Poblaciones celulares que pertenecen al nicho hematopoyético en humano y ratón	24
Cuadro 5. Enfermedades similares en humanos y perros.....	25
Cuadro 6. Panel para la identificación de la población HSCP y BMSC en células mononucleares de perro.	37
Cuadro 7. Anticuerpos empleados en la evaluación de HSCP y BMSC por citometría de flujo	37
Cuadro 8. Anticuerpos empleados en la evaluación del fenotipo de las BMSC en cultivo por citometría de flujo	39
Cuadro 9..Características de las muestras de biopsia de médula ósea de perro	43
Cuadro 10. Resultados de la fenotipificación de BMSC de perro.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los cuatro compartimentos de las células hematopoyéticas.....	14
Figura 2. Esquematización del fenotipo de las células troncales hematopoyéticas (HSC) y los progenitores multipotentes (MPP) en ratón y humano.....	16
Figura 3. Estructura de la médula ósea.....	17
Figura 4. Nicho de las HSC.....	21
Figura 5. Evaluación de la celularidad en médula ósea en humano, ratón y perro	45
Figura 6. Evaluación de megacariocitos/mm ² en médula ósea en humano, ratón y perro	46
Figura 7. Efecto de la edad en la frecuencia de megacariocitos y relación M:E en humano, ratón y perro	48
Figura 8. Evaluación de la relación mielocítica:eritrocítica (M:E) en humano, ratón y perro	50
Figura 9. Correlación de celularidad, relación M:E y número de megacariocitos con la edad en humano, ratón y perro	51
Figura 10. Identificación de la población de BMSC CD271 ⁺ en médula ósea de humano y perro.....	54
Figura 11. Identificación de la población de BMSC LepR ⁺ en médula ósea de ratones C57BL6 y SCID.....	56
Figura 12. . Identificación de la población de BMSC CD10 ⁺ en médula ósea de humano, ratón y perro	57
Figura 13. Frecuencia de la población BMSC en humano, ratón y perro obtenida por análisis de imagen	59

Figura 14. Frecuencia de progenitores hematopoyéticos y de la población BMSC en médula ósea de perro mediante citometría de flujo.....	61
Figura 15. Identificación y evaluación de la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en médula ósea de perro.....	66
Figura 16. Frecuencia, caracterización y evaluación de la funcionalidad de las células estromales mesenquimales de médula ósea de perro.....	68
Figura 17. Modelo del nicho reticular hematopoyético en perro y su comparación con humano y ratón	77

RESUMEN

La médula ósea es el tejido en el cual se lleva a cabo la hematopoyesis; posee tres principales componentes: el hematopoyético, el vascular y el estromal. Este último, ha sido ampliamente estudiado en ratones a partir de las células estromales de médula ósea (BMSC del inglés bone marrow stromal cells) reconociendo su papel como células del nicho hematopoyético. Las BMSC humanas y de ratón tienen propiedades funcionales similares, pero se distinguen mediante diferentes marcadores (LepR y NGFR/CD271, respectivamente). Hasta ahora, no ha habido una comparación *in situ* detallada de ambas poblaciones de BMSC. El perro ha sido empleado como modelo animal en la hematopoyesis normal y patológica y su estudio es relevante en la clínica veterinaria, sin embargo, la participación de las BMSC en esta especie no se ha determinado ni han sido caracterizadas *in situ*. En este trabajo, realizamos una comparación histológica sistemática de la médula ósea de ratón, humano y perro de diferentes grupos etarios, haciendo énfasis en las BMSC. Se obtuvo la frecuencia de la población BMSC en perros *in situ* y en muestras frescas; se caracterizó y evaluó el funcionamiento de esta población a partir de muestras cultivadas. Encontramos una diferencia marcada entre la composición general del microambiente de ratón como la celularidad, ausencia de adipocitos e incremento del número de megacariocitos en comparación al humano y el perro los cuales muestran una gran similitud en su composición en diferentes etapas etarias. Las BMSC CD271⁺ se expresaron en perros y humanos, y su morfología, frecuencia y distribución fueron similares a las BMSC LepR⁺ de ratón. Funcionalmente encontramos que la capacidad clonogénica de las BMSC de perro tiene una correlación negativa con la edad como sucede en el humano. Las BMSC cultivadas de perro expresan los mismos marcadores y tienen la capacidad de diferenciarse a otros linajes como su contraparte humana y murina. En conclusión, la médula ósea humana tiene mayor similitud a la de perro y menor a la de ratón, en cuanto a la composición histológica, marcadores y funcionalidad de las BMSC.

Palabras clave: hematopoyesis, médula ósea, BMSC, perro, nicho hematopoyético

ABSTRACT

Hematopoiesis occurs in the bone marrow which consists of three main components: the hematopoietic, the vascular and the stromal. The stromal component has been extensively studied in mice, recognizing bone marrow stromal cells (BMSCs) as their main component due to their role regulating and maintaining hematopoietic stem/progenitor cells, as key elements of the hematopoietic niche. Human and mouse BMSCs are recognized by different markers (LepR and NGFR/CD271, respectively). However, there has not been a detailed *in situ* comparison of both populations within the hematopoietic microenvironment. The dog has been used as a model in normal and pathological hematopoiesis in humans, however, the participation of BMSCs in dogs has not been determined or characterized *in situ*. In this work, we performed a systematic histological and functional comparison of mouse, human, and dog bone marrow from different age groups. The frequency of BMSCs population in dogs was obtained *in situ* and in fresh samples, and the functionality was characterized and evaluated in cultured BMSC. We found differences between the general composition of mouse bone marrow histology such as cellularity, absence of adipocytes, and increased number of megakaryocytes, compared to humans and dogs. The latter show great similarity in their composition at different age stages. CD271+ BMSCs were present in dogs and humans, and their morphology, frequency, and distribution were similar to mouse LepR+ BMSCs. Functionally, we found that the clonogenic capacity of dog BMSCs decrease with age, as human samples. *In vitro* cultured BMSCs express the same markers and have the ability to differentiate into other cell lineages as their human and murine counterparts. In conclusion there is more similarity between human and dogs than to mouse, regarding the histological composition, markers, and functionality of BMSCs.

Keywords: hematopoiesis, bone marrow, BMSC, dog, hematopoietic niche

Introducción

Hematopoyesis

La sangre contiene diferentes tipos de células, cada uno posee un aspecto morfológico y una función biológica específica. Los eritrocitos son un tipo de células de la sangre con forma discoide anucleada, son células bicóncavas llenas de hemoglobina, la principal proteína que se une al oxígeno (1). Otros tipos celulares son los granulocitos y monocitos que pueden salir de los vasos sanguíneos y migrar a muchos tejidos (2). Estos dos tipos de células juegan un papel clave en la inflamación y la fagocitosis(2). Adicionalmente, en la sangre también se encuentran las plaquetas, las cuales son fragmentos anucleados muy pequeños que provienen del citoplasma de los megacariocitos y que contienen moléculas necesarias para la hemostasia (3). Finalmente, como parte de las células sanguíneas se encuentran los linfocitos, los cuales median la inmunidad altamente específica contra microorganismos y otras fuentes de macromoléculas extrañas (2). A pesar de estas diferencias estructurales y funcionales extremas entre las células de la sangre, todas ellas son la progenie de un solo tipo de células: las células troncales hematopoyéticas (HSC del inglés Hematopoietic Stem Cell) (4). El proceso involucrado en la producción de todos los elementos celulares de la sangre a partir de las HSC se denomina hematopoyesis. La hematopoyesis incluye la autorenovación de las HSC, la proliferación y el compromiso con linajes específicos, y la maduración de progenitores comprometidos con el linaje en células sanguíneas funcionales (5,6).

La hematopoyesis es un proceso ampliamente conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados y su potencial hematopoyético se ha estudiado con mayor amplitud en el ratón como un modelo para la hematopoyesis humana dada la disponibilidad de realizar ensayos de trasplante *in vivo*, los cuales son necesarios para definir funcionalmente la presencia de HSC y células progenitoras hematopoyéticas (HSCP) (del inglés hematopoietic stem/progenitor cell) (6).

Hematopoyesis primitiva y definitiva.

El sistema hematopoyético se desarrolla en dos olas de generación de precursores. La primer ola o el primer sitio de producción sanguínea en los mamíferos es el saco vitelino (YS *del inglés yolk sac*) el cual es una membrana que rodea el embrión en desarrollo y produce eritrocitos primitivos que le brindan al embrión transporte de oxígeno y por lo tanto son esenciales para la viabilidad del embrión; esta fase está restringida a linajes eritrocítico, megacariocítico y de macrófagos (7). La segunda ola o "hematopoyesis definitiva" ocurre en la región de la aorta-gónada-mesonefros (AGM) donde surge el progenitor eritroide definitivo denominado unidad formadora de progenitores tempranos de eritrocitos (BFU-E), y su aparición es simultánea a los neutrófilos, mastocitos y progenitores granulocito-macrófago justo antes de que inicie la circulación (8). La diferenciación de las HSC ocurre en el hígado fetal dando origen a células sanguíneas maduras, es en el hígado fetal donde las HSC también sufren expansión y en un periodo corto se incrementan unas cuarenta veces. Las HSC y los progenitores migran del hígado y colonizan en bazo donde la diferenciación al linaje mieloide y algunos subtipos de linfocitos se favorecen (7), (9,10). Finalmente, la médula ósea es el órgano donde se lleva a cabo la hematopoyesis desde el nacimiento y hasta la muerte de los individuos (Cuadro 1).

Una vez en la etapa post natal y de acuerdo al grado de maduración de las células hematopoyéticas se describen cuatro compartimentos; en el primero se sitúan las HSC, las cuales son multipotentes y tienen la capacidad de autorenovarse, esta población representa alrededor del 0.01% de las células nucleadas en médula ósea y parece ser que este número es conservado en todos los mamíferos (11). A partir de las HSC se genera el segundo compartimento que es el de los progenitores hematopoyéticos el cual corresponde a <0.5% del total de células de la médula ósea, los progenitores pueden ser multipotenciales (MPP) o estar restringidas a uno o dos linajes únicamente; el tercer compartimento consiste en los precursores hematopoyéticos, los cuales son reconocibles en médula ósea por

su morfología, este compartimento representa más del 90% de las células hematopoyéticas en médula ósea. El último compartimento corresponde a las células sanguíneas circulantes (Figura 1) (12,13).

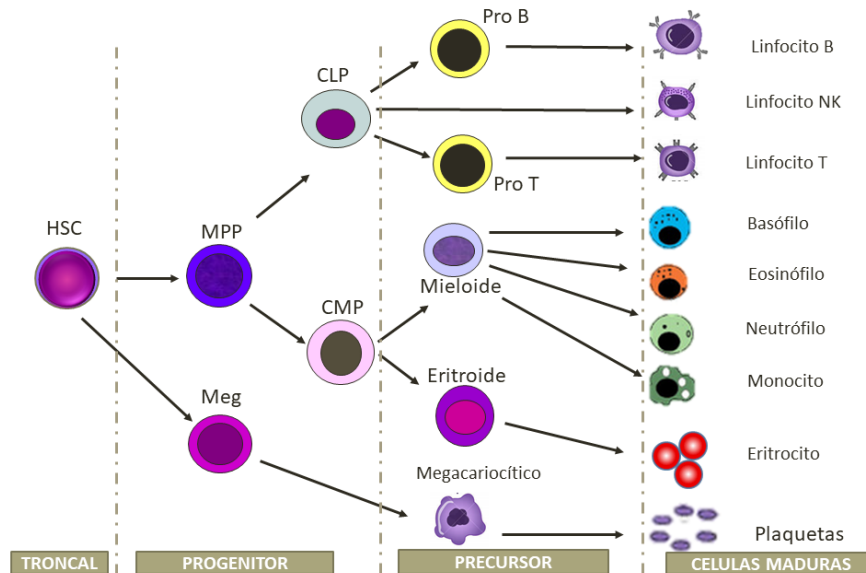


Figura 1. Representación de los cuatro compartimentos de las células hematopoyéticas.

Cuadro 1. Características de la hematopoyesis en el ratón y humano (11)		
	Ratón	Humano
Gestación	20 días (3 semanas)	267 días (38 semanas)
Sitio de hematopoyesis fetal	Saco vitelino	Saco vitelino
Sitio hematopoyesis embrionaria	Aorta-gónada mesonefros (AGM) Arterias vitelinas y umbilicales	Aorta-gónada mesonefros (AGM)
Hematopoyesis post natal	Hígado, posteriormente médula ósea y bazo	Hígado, posteriormente médula ósea
Vida media de eritrocitos	41-52 días	120 días

Célula Troncal Hematopoyética (HSC)

Las HSC, tienen dos características funcionales primordiales, la primera es la capacidad de autorenovación a largo plazo para mantener la población de células indiferenciadas dentro del grupo de células troncales y la segunda es la capacidad de diferenciarse a células especializadas, por lo que se considera una célula multipotente. En el ratón, las HSC carecen de la expresión de linaje (Lin-) y expresan marcadores como Sca-1 y c-kit conocida como población (LSK) además de los marcadores SLAM (del inglés Signaling Lymphocyte Activation Molecule) (CD150+, CD244- CD48-) (14).. En la especie humana las HSC expresan los antígenos CD34, CD90, CD117, CD133, CD49f y carecen de la expresión de CD38 y de otras moléculas características de células maduras como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD33, CD38, CD45, CD57, CD71 y CD235 (7,12–15) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de las Células Troncales Hematopoyéticas en ratón y humano		
	Ratón	Humano
Expresión de marcadores en las células troncales hematopoyéticas	Positivas: Sca-1, c-Kit , CD150	Positivas: CD34, CD90, CD117, CD133, CD49f, FLT3
	Negativas: CD244, CD48, B220, Gr1, Mac1, Ter119	Negativas: CD38, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD33, CD45, CD57, CD71 y Glicoforina A
Frecuencia de la división de las CTH	30 – 50 días	175 – 350 días

Aunque la jerarquía descrita en la hematopoyesis murina generalmente es preservada en otras especies, la expresión de antígenos de superficie en cada estadio de desarrollo es diferente en ratones y humanos (16). Un claro ejemplo es el antígeno CD34, mientras que todas las HSC del hígado fetal de ratón lo expresan, menos del 50% del antígeno se encuentra en ratones juveniles y menos del 10% en ratones adultos (16). Otra diferencia es la expresión de la tirosina cinasa 3 tipo fms (Flt3) en las HSC humanas mientras que las murinas no lo

expresan (16); sin embargo, los progenitores linfocíticos tanto en ratón como humano si lo expresan por lo que esta molécula es importante para la linfopoyesis murina pero no para la mielopoyesis o supervivencia de las HSC (Figura 2) (17).

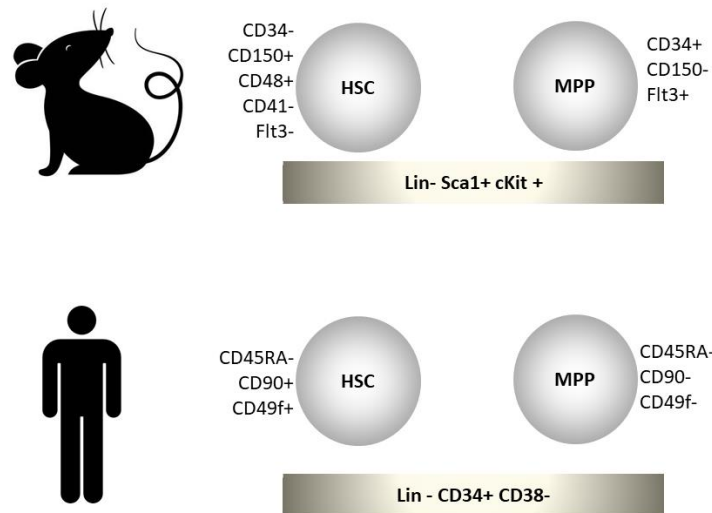


Figura 2. Esquematización del fenotipo de las células troncales hematopoyéticas (HSC) y los progenitores multipotentes (MPP) en ratón y humano.

Estructura de la médula ósea

La médula ósea es el principal órgano hematopoyético en individuos adultos, es un órgano difuso que constituye el 3% de la masa corporal en ratas y 5% en humanos (18). Es un órgano capaz de remodelarse estructural y funcionalmente en respuesta a factores nutricionales, señales endocrinas y variación en la demanda de la producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas (19). El tejido medular está presente en las cavidades de los huesos largos y axiales y consiste de un sistema sinusoidal, células hematopoyéticas, tejido adiposo, células reticulares de soporte y matriz extracelular (Figura 3) (18).

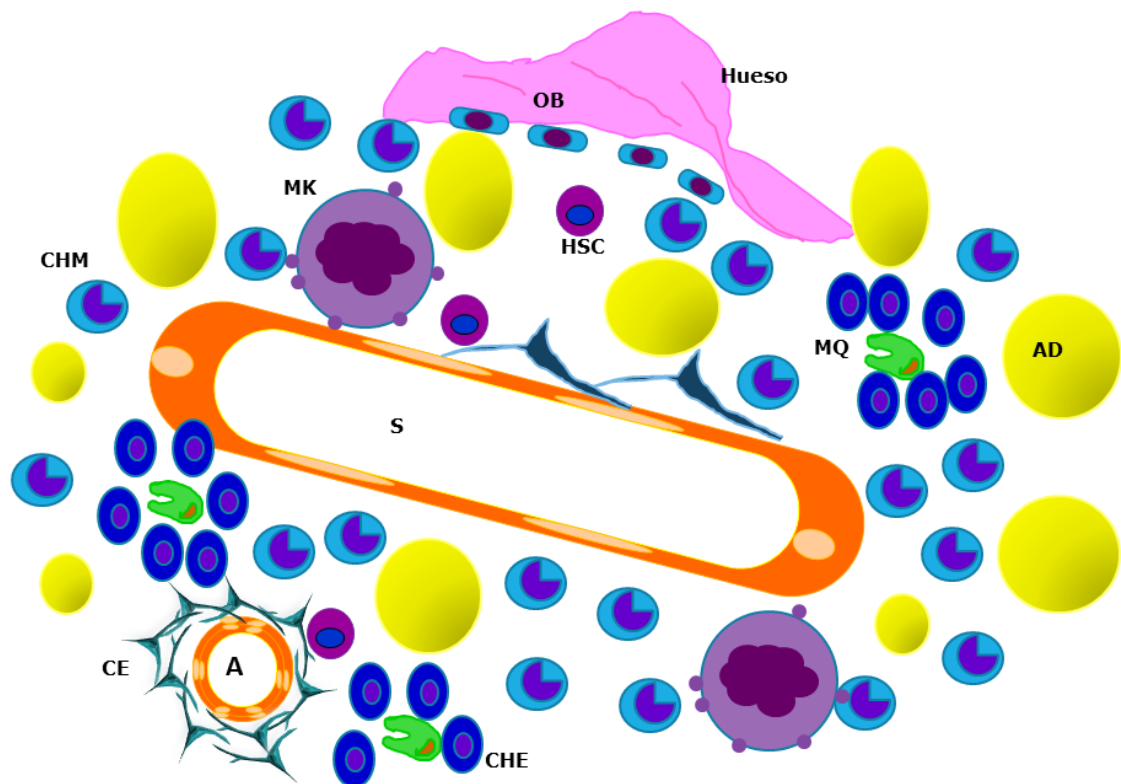


Figura 3. Estructura de la médula ósea. S: sinusoide, A: arteria, CE: célula estromal, AD: adipocito, OB: osteoblasto, MK: megacariocito, HSC: célula troncal hematopoyética, MQ : macrófago, CHM: célula hematopoyética de origen mielocítico, CHE: célula hematopoyética de origen eritrocítico.

La médula ósea en el ratón está presente en el esqueleto axial (cráneo, esternón, columna vertebral) y apendicular; y se ha determinado que el esternón, costillas, húmero y fémur, además del bazo, permanecen hematopoyéticamente activos independientemente de la edad del ratón (18), mientras que en el humano una vez que el individuo nace la hematopoyesis está restringida únicamente a la médula ósea, en individuos jóvenes todo el esqueleto es productor de células sanguíneas y conforme el individuo envejece la hematopoyesis se va restringiendo a las epífisis de los huesos largos y perdura en el esqueleto axial (20).

Componentes de la médula ósea.

La médula ósea posee tres principales componentes que son el hematopoyético, el vascular y el estromal. El componente hematopoyético es el encargado de la producción de todas las células sanguíneas y se deriva de la HSC de la cual ya se ha hecho referencia previamente. Dicho componente puede variar de acuerdo a la especie estudiada y a la edad de los individuos. Así, en la mayoría de las cepas de ratón los linfocitos representan cerca del 70 – 80 % de todos los leucocitos circulantes y del 7 - 21% en médula ósea, mientras que los neutrófilos apenas representan del 20 – 30% de todos los leucocitos circulantes por lo que se consideran especies linfocíticas; la relación neutrófilo: linfocito cambia con la edad ya que los linfocitos disminuyen mientras que los neutrófilos incrementan conforme el animal envejece (21,22). Esto demuestra una importante diferencia respecto al humano donde los neutrófilos representan el 60-65% de los leucocitos circulantes y también hay mayor porcentaje en médula ósea respecto al ratón (Cuadro 3). (23–26).

Cuadro 3. Valores hematológicos en humano y ratón		
	Humano	Ratón
Hemoglobina g/dL	12.7-17.0	12.2 – 13.9
Eritrocitos $10^{12}/L$	4.0-5.6	6.1 – 10.7
Plaquetas $10^9/L$	150-450	853 - 1951
Leucocitos $10^9/L$	3.6-9.2	4.0 – 10.9
Neutrófilos $10^9/L$	1.7-6.1	0.1 – 0.6
Linfocitos $10^9/L$	1.0-2.9	2.3 – 9.7
Monocitos $10^9/L$	0.18-0.62	0 – 0.08
Eosinófilos $10^9/L$	0.03-0.48	0 – 0.04

El componente vascular se deriva de un progenitor capaz de dar origen a las células endoteliales para formar sinusoides y otros vasos sanguíneos como capilares y arterias, la función principal es regular la movilización y proliferación de las células sanguíneas, los megacariocitos suelen estar adyacentes a los sinusoides endoteliales (18). El componente mesenquimatoso está conformado por las células estromales mesenquimales de médula ósea (del inglés *Bone Marrow Stromal Cells, BMSC*) las cuales se diferencian a osteoblastos y adipocitos regulando de esta manera la hematopoyesis (27–29) .

Otra diferencia marcada en la composición de la médula ósea murina y humana es la presencia de adipocitos ya que en esta última especie se observan con frecuencia espacios ocupados por adipocitos los cuales toman el lugar de células hematopoyéticas preexistentes pero que fueron disminuyendo conforme el individuo envejece (Figura 3) (20,30) .

Localización *in situ* de las HSC

Un desafío en el estudio de las HSC ha sido determinar su localización específica dentro de la médula ósea, debido a esto, se han empleado un gran número de técnicas microscópicas de imagen para lograr su identificación (31,32) a partir de biomarcadores. La observación *in situ* de las HSC en médula ósea empleando secciones congeladas de tejido y a partir del uso de marcadores de la familia SLAM ($CD150^+ CD48^- CD41^-$) demostraron que la mayoría de las HSC se localizan asociadas a vasos sanguíneos principalmente sinusoides y menos del 20% se encontraban cercanas a la región ósea (14). Posteriormente, mediante el uso de microscopía confocal y modelos computacionales se demostró que las HSC se localizaban además de en los sinusoides, cercanas a arteriolas lo que además, promovía su quiescencia (33) . Otro proceso es el uso de la técnica de aclaramiento óseo en ratones reporteros, mediante el cual las células α -catulina-GFP+ junto con c-kit+ identifican las HSC las cuales residen dentro los sinusoides de 10 μ m en la parte central de la diáfisis de la médula ósea más que en las

metáfisis o epífisis y en esta zona se encuentran tanto las células que están en división como las que están quiescentes, aunque las primeras se localizan más cercanas a la superficie ósea (34). En humanos, las HSC se han purificado a partir de la expresión de marcadores distintos al ratón $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^- \text{CD45RA}^- \text{CD49f}^+$ y se presentan con mayor frecuencia en la zona trabecular de la médula ósea (35,36) .

El nicho de las células troncales hematopoyéticas en ratón.

Se define como nicho hematopoyético el sitio anatómico y dinámico, que protege a las células troncales de ser depletadas y protegiéndolas de una proliferación exacerbada. Se considera la unidad básica del tejido, integrando señales que median el balance entre los requerimientos del organismo y las respuestas de las células troncales en procesos de generación de tejidos, homeóstasis y su reparación (37) .

A diferencia de otros modelos de nicho como el de la gónada femenina en *Drosophila* donde se conocen los tipos específicos de células y el papel de ellas como reguladoras del nicho (38). En el ratón, el nicho hematopoyético es más complejo, dado que a diferencia del nicho anterior, en esta especie son varias poblaciones celulares las que comprenden el nicho, y algunas de ellas están en contacto con células maduras además de las células troncales (37) Cuadro 4.

En los últimos años, se ha avanzado en el estudio de las células que conforman el nicho hematopoyético dentro de las que destacan las células estromales mesenquimales de médula ósea y se ha realizado mediante diversas técnicas de imagen de detección de biomarcadores y el uso de modelos de ratón en los cuales han deletado poblaciones celulares específicas como las denominadas células reticulares abundantes del ligando de quimiocina CXC (CXCL) 12 células (también conocidas como células CAR) (39,40), células que expresan el receptor de leptina (LepR) (41) , células Nes-CreEr (42) y células Ng2-CreER (33) además de células de otro origen como los megacariocitos (43–45), los macrófagos (46–48) y los adipocitos (49,50) lo que ha demostrado su papel en la regulación de la

proliferación, quiescencia, diferenciación, inhibición de la hematopoyesis y la permanencia de las HSC en el nicho (18,51).

Nicho endosteal

Los primeros estudios que identificaron a los osteoblastos (OB) como células reguladoras del nicho fueron indirectos; ya que inhibiendo, sobreexpresando o mediante la delección condicional de estas células, se vieron cambios en la frecuencia de HSC en la médula ósea (27,29,52). En 2005, gracias a la publicación del grupo del Dr. Morrison, donde se localizaron a las HSC en la médula ósea mediante el uso moléculas de la familia SLAM se reportó que la mayoría de las HSC en el ratón se encontraban asociadas a los vasos sanguíneos principalmente sinusoides y menos del 20% se encontraban cercanas a la región ósea. (Figura 4) (14).

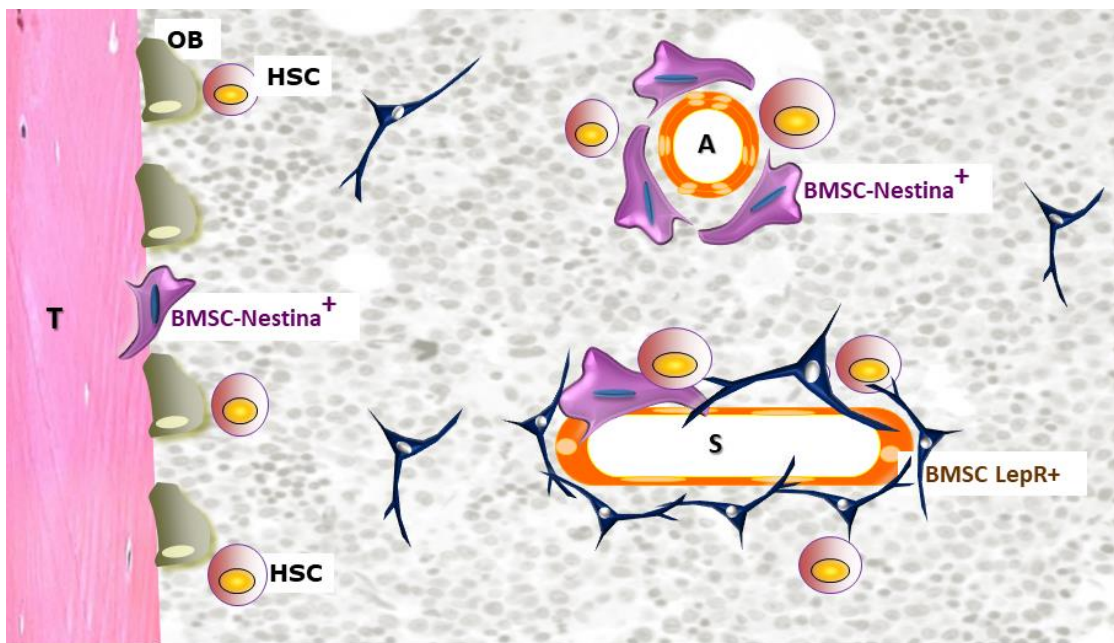


Figura 4. Nicho de las HSC. T: hueso trabecular, OB: osteoblastos, BMSC Nestina+: células estromales de médula ósea que expresan leptina y se encuentran principalmente rodeando arteriolas, BMSC LepR+: células estromales de médula ósea que expresan el preceptor de leptina y se encuentran cercanas a sinusoides, A: arteriola, S: sinusoide, HSC: célula troncal hematopoyética.

Nicho perivascular

Hasta ahora se ha reconocido que la mayoría de HSC se encuentran en estrecha cercanía a diferentes subtipos de BMSC en zonas vasculares ya sea rodeando sinusoides o arteriolas formando una red entre ellas, estas células se han identificado a través de marcadores como LepR, Nes-GFP y CXCL12 dependiendo de su localización en la vasculatura. Mientras que el grupo del Dr. Frenette encontró que las células Nes-GFP⁺ se localizan en regiones periarteriolas (33,42), el grupo del Dr. Morrison, (41) usando la expresión del receptor de Leptina (LepR) para definir a las células estromales mesenquimales de médula ósea en ratón adulto, encontró que las células que expresan LepR se encuentran principalmente alrededor de los sinusoides y casi todas las células estromales que expresan el factor de células troncales (SCF) (del inglés Stem Cell Factor) y CXCL12, también expresan LepR, por lo que son considerados factores importantes del nicho hematopoyético (Figura 4) (41) .

Células BMSC LepR+

Las células LepR⁺ se localizan rodeando principalmente sinusoides y son la principal fuente de producción de SCF y CXCL12, además de que son la fuente principal de adipocitos y osteoblastos en la médula ósea murina (41). La producción de SCF y CXCL12 por parte de las BMSC Nes- GFP⁺ (BMSC que se localizan rodeando arteriolas principalmente) y LepR⁺ son indispensables para el mantenimiento de las HSC ya que su depleción induce la reducción en el número de HSC así como el *homing* de las HSC (34,40–42,53), de esta manera se demuestra su participación como células reguladoras del nicho hematopoyético en ratón.

Mediante el uso de la técnica de scRNA-seq (expresión génica a resolución de una sola célula) se demostró que las BMSC expresan LepR pero existen subpoblaciones; las que poseen una expresión alta de LepR las cuales, expresan principalmente marcadores adipogénico y en ensayos funcionales tienen alta actividad en la formación de unidades formadoras de colonias fibroblásticas.

(CFU-F); mientras que la subpoblación que expresa principalmente marcadores osteogénicos parece ser la progenie de las primeras ya que la expresión de LepR es menor (54–56) .

Células CAR (células que expresan en abundancia CXCL12)

Omatsu y colaboradores (2010), usaron un ratón al cual le deletaron a las células CAR en médula ósea, lo que resultó en disminución de la frecuencia de HSC en médula ósea. Sin embargo, este modelo pudo haber eliminado otros tipos celulares productores también de CXCL12 (40). Greenbaum, deletó de manera selectiva a subpoblaciones celulares productoras de CXCL12 para evaluar el efecto sobre las HSC. La delección en células endoteliales y BMSC que expresaban la proteína Prx1 (factor de transcripción que se expresa en el desarrollo temprano del mesodermo), se asoció con disminución del número de HSC, tales resultados demuestran el papel de las células CAR como parte del nicho de las células troncales (39) .

La delección de SCF y CXCL12 en diferentes poblaciones celulares tienen un efecto diferente en HSC, progenitores mieloides y linfoides por lo que se presume que existen diferentes nichos para cada población celular donde las HSC se encuentran principalmente en un nicho perivascular que las mantienen en estado de quiescencia. mientras que los progenitores linfoides que se encuentran dentro del nicho endosteal en un estado activo (33,40,53,57) . Por otro lado, Acar y colaboradores, corroboraron que la mayoría de las HSC están más cercanas a los sinusoides que a otros vasos sanguíneos y en esta zona se encuentran tanto las células que están en división, como las que están quiescentes aunque las primeras se localizan más cercanas a la superficie ósea (34) .

La participación de otras células como megacariocitos, macrófagos y adipocitos se ha demostrado por la interacción de sus productos y la regulación en la proliferación, quiescencia, diferenciación, inhibición de la hematopoyesis y permanencia de las HSC en el nicho (43–47,47–49) .

Cuadro 4. Células del nicho hematopoyético en ratón y humano	
Ratón	Humano
Células CAR	BMSC CD271/NGFR
LepR	BMSC CD146+
Nes-GFP+	BMSC CD10+
Megacariocitos	Megacariocitos
Macrófagos	Adipocitos
Adipocitos	
Osteoblastos	

El nicho de las células troncales hematopoyéticas en humano.

En la población humana, las BMSC que expresan el receptor del factor de crecimiento neural (NGFR) o CD271, que son capaces de diferenciarse hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico además de participar en el soporte de la hematopoyesis ya que alrededor del 80% de células CD34+ colocalizan con las BMSC CD271+ además junto con la expresión de CD146 se identificaron subpoblaciones que se localizan principalmente en zonas perivascularles (CD271+ CD146+) y zonas peritrabeculares (CD271+ CD146^{-low}) de la médula ósea (58–62) . Otro marcador con el que se han identificado las BMSC en humanos es CD10, esta población se encontró en estrecha cercanía en todos las etapas de desarrollo de células de linaje B, lo cual sugiere que esta puede ser una subpoblación de BMSC que participan en el nicho de esta población en particular (63) Cuadro 4.

A pesar de los múltiples aportes para la identificación de las HSC y células del nicho mediante técnicas de imagen ya sea identificando biomarcadores o aplicando técnicas de simulación computacional los estudios histológicos han sido absolutamente primordiales en este progreso; además, la identificación *in situ* de las BMSC es fundamental para determinar posibles diferencias entre especies, ya

que por ahora, se desconoce si la variación de las BMSC entre el humano y el ratón está relacionada a marcadores de superficie, patrones de secreción de citocinas y moléculas inmunoreguladoras que podrían influir en la regulación de la hematopoyesis (64).

Antecedentes

Dentro de los mamíferos, el perro ha sido empleado como modelo para el estudio de enfermedades en humanos debido a que comparten muchos de los mecanismos y causas que llevan a estas. Algunas de ellas son el envejecimiento, enfermedades musculares, degenerativas, endocrinas y hematológicas entre otras (65–67) Cuadro 5.

Cuadro 5. Enfermedades similares en humanos y perros	
Enfermedad	Mecanismo asociado al desarrollo de la enfermedad en humanos y perro.
Hemofilia A*	Inversión factor VIII (68)
Diabetes mellitus tipo 1	Locis DRB y DQA asociados (69)
Enfermedad de Duchenne	Pérdida de distrofina (67)
Osteosarcoma	Crecimiento acelerado y género (70)
Leucemias, linfomas	(71)
Osteoartritis	(72)

Esta similitud con el humano, ha sido aprovechada para que, desde hace varias décadas el perro se emplee como modelo de la hematopoyesis humana, desde los primeros ensayos de trasplante de médula ósea (73). Dentro de las neoplasias hematopoyéticas que el perro desarrolla de manera espontánea como el humano se encuentra la leucemia mieloide aguda la cual se ha demostrado que es sostenida por una célula troncal leucémica tal como se ha descrito en humanos (74) . Breen y cols. (2008), demostraron mediante análisis citogenético que perros

con leucemia mielocítica crónica y leucemia linfocítica crónica, presentaban algunas de las mismas aberraciones cromosómicas que los humanos (65) . El perro también se ha postulado como un modelo animal de linfoma tipo no Hodgkin en humanos (75) y como modelo preclínico en la evaluación de fármacos para el tratamiento de la leucemia (76).

Sin embargo, la hematopoyesis en el perro no ha sido tan explorada a diferencia del ratón y humano y los componentes esenciales de la regulación del sistema hematopoyético aún se desconocen,

Hematopoyesis en perros

La hematopoyesis en perros comienza en la etapa embrionaria en el saco vitelino y durante la etapa fetal se restringe a órganos como el hígado, el bazo y finalmente la médula ósea; en el periodo post natal el único órgano hematopoyético es la médula ósea al igual que en humanos (77,78). Se han reportado que los huesos del esqueleto axial (cráneo, esternón, columna vertebral) contienen la más alta densidad de células hematopoyéticas. Se ha demostrado que la celularidad en médula ósea va cambiando conforme el animal envejece, el claro ejemplo es la presencia de adipocitos los cuales son escasos en animales jóvenes y conforme avanza la edad llegan a representar hasta el 75 % de las células mientras que, de manera inversa, van disminuyendo las células hematopoyéticas (78). En un estudio realizado en perros donde se evaluaron diferentes sitios para la obtención de médula ósea se encontró que el húmero y el fémur poseen muy poca actividad hematopoyética (11). El resto de los componentes de la médula ósea como el componente vascular y estromal es similar que en otros mamíferos como el humano y ratón (79) .

Células troncales hematopoyéticas del perro

A partir de la médula ósea del perro se han aislado e identificado el fenotipo de las células troncales hematopoyéticas mediante algunos de los marcadores que se emplean en humanos (Lin-, CD34+, c-Kit+, CD90+); esta población tiene la

capacidad de repoblar la médula ósea de ratones irradiados y de formar colonias en cultivos a largo plazo lo que demuestra su capacidad de autorenovación, proliferación y diferenciación (80–82).

Justificación.

A diferencia de lo reportado en ratón y humanos, en el perro se desconoce la participación de las BMSC en la hematopoyesis, no obstante, en un estudio se demostró la función de células “tipo fibroblastos” de médula ósea, encontrando que, ya sea por contacto célula-célula o por la producción de factores solubles, estas células ejercen un efecto negativo en la formación de colonias de origen mieloide y monocítico a nivel fetal, posiblemente esta población “tipo fibroblasto” corresponde a las BMSC (83) . Hasta ahora las BMSC no se han identificado *in situ* en la médula ósea de perro por lo que no se sabe si hacen contacto directo con las HSC debido a que no se han validado marcadores de estas poblaciones *in situ*. Sin embargo, mediante la separación por columnas magnéticas a partir de biopsias de médula ósea de perro se aisló una población que expresa al igual que en humanos, el antígeno CD271, la cual posee la capacidad de formar colonias y de diferenciarse hacia los linajes adipogénico, osteoblástico y condrogénico (84) . Como se ha reportado en humanos, una alteración en las células del nicho hematopoyético puede llevar al desarrollo de neoplasias hematopoyéticas, sin embargo en perros, esto no ha sido estudiado.

Por lo que el estudio del nicho hematopoyético en médula ósea de perro nos permitiría conocer más sobre la biología de la hematopoyesis normal en esta especie, mientras que por el lado de las enfermedades hematológicas nos puede ayudar a identificar las interacciones entre las células del nicho y, sus posibles implicaciones en el tratamiento y desarrollo de nuevos fármacos como en la contraparte humana.

Hipótesis

En la médula ósea de perro existe al menos una población *in situ* de células estromales mesenquimales la cual es similar al humano en cuanto a morfología, expresión de marcadores, frecuencia y funcionalidad.

Objetivo General

Estudiar morfológica y funcionalmente el nicho reticular en médula ósea de perros sanos.

Objetivos Particulares

1. Evaluar de manera cualitativa los componentes del microambiente hematopoyético (celularidad, número de megacariocíticos y relación M:E) en la médula ósea de perro y determinar la similitud que presente con humanos y ratones.
- 2.- Determinar si el envejecimiento induce cambios en el microambiente de la médula ósea de perro y compararlo con humanos y ratones.
- 3.- Identificar los marcadores NGFR y CD10 *in situ* de BMSC en médula ósea de perro y reconocer si existen subpoblaciones
4. Evaluar la frecuencia, localización y asociación con células hematopoyéticas de las BMSC en perros.
5. Estudiar la funcionalidad (capacidad de formación de colonias, caracterización, capacidad de diferenciación y proliferación) de las BMSC del perro.
6. Comparar la localización, frecuencia y funcionalidad de las BMSC entre el perro, humano, ratón.

Materiales y métodos

Muestras de biopsias de médula ósea

Humano

Muestras pediátricas. Se obtuvieron muestras de médula ósea (n=3) del archivo de patología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Las muestras se obtuvieron de la cresta ilíaca de pacientes oncológicos menores de 16 años que no tenían involucrada a la médula en sus padecimientos (HIM/2013/034).

Muestras de adulto. Se obtuvieron muestras de médula ósea de adultos (n=9) en un intervalo de edad de 53 a 92 años sin alteraciones hematológicas en las pruebas de laboratorio y que fueron sometidos a cirugía de remplazo de cadera en el Hospital de traumatología y ortopedia Lomas verdes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) cuyas causas por las que se llevó a cabo la cirugía incluían artrosis y fracturas. Los individuos aceptaron de manera verbal su participación en el proyecto (R-2012-785-092) (anexo 1).

Ratón

Muestras de ratón. Se obtuvo el esternón de ratones de las cepas C57BL6 y SCID. De la cepa C57BL6 se obtuvieron los bloques de 5 muestras de ratones de 6 semanas de edad (pediátricos) y 4 muestras de ratones de 24 meses de edad (gerontes) las cuales fueron donadas por la Dra. Vivienne Rebel de UT Health San Antonio, USA, mientras que los ratones SCID fueron proporcionados por el Dr. John Dick de la University Health Network, Toronto, Canadá de los cuales se obtuvieron 5 bloques de muestras de ratones de 15 semanas de edad (adultos).

Perro

Muestras de perro. Se obtuvieron muestras de médula ósea de perros mestizos (n=8), raza Husky Siberiano (n=1) y raza Pomeranian (n=1) en un intervalo de 3 meses a 8 años de edad. Las muestras se obtuvieron de diferentes hospitales

privados de la ciudad de México y fueron obtenidas a partir de animales sometidos a escisión de la cabeza femoral cortando a nivel del cuello generando una línea recta de trocánter mayor a trocánter menor. Todos los protocolos experimentales para el uso de las muestras de perro fueron revisados y aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado de los Animales en Experimentación (SICUAE) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (anexo 2)

A continuación se mencionan los criterios de inclusión y exclusión empleados en perros y humanos.

Criterios de inclusión

- Contar con parámetro hematológicos en sangre periférica dentro de intervalos de referencia.
- Sin antecedentes de enfermedad hematopoyética
- Pacientes con consentimiento verbal (humanos) y por el tutor (perros)

Criterios de exclusión.

- Historia clínica con datos de alteración hematológica previa

Procesamiento Histológico

En las muestras de perro y humano se llevó a cabo el mismo procedimiento histológico.

Fijación del tejido

Una vez retirada la cabeza femoral, el tejido se colocó en un recipiente con solución de formol al 10% en una relación de 10 partes de solución por una de tejido y se dejó fijar al menos durante 24 horas, posteriormente las cabezas fueron cortadas por la mitad con una sierra eléctrica y se dejaron fijar por 24 horas más.

Descalcificación

Para la descalcificación del tejido las cabezas se colocaron en casetes especializados para el procesamiento histológico y se depositaron en un recipiente con solución de EDTA (Sigma) al 12% pH 8; se mantuvieron a temperatura ambiente y se realizó cambio de solución descalcificadora diariamente hasta que los huesos estuvieron lo suficientemente suaves al tacto para la obtención de cortes histológicos, proceso que tomó alrededor de dos semanas; finalmente, los huesos se enjuagaron en agua corriente durante 30 minutos.

Inclusión en parafina

Para la inclusión en parafina, los tejidos fueron deshidratados a partir de una solución de alcohol al 70% y mediante el procesador automático de tejidos KOS/Milestone se obtuvieron los tejidos incluidos en parafina. Posteriormente en el casete, el tejido se colocó de acuerdo a la orientación de corte deseada con ayuda de parafina y se dejó solidificar a temperatura ambiente para su posterior corte y tinción con la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).

Evaluación histológica

Las muestras histológicas fueron evaluadas por tres hematopatólogos independientes. Para confirmar la normalidad de los sitios hematopoyéticos activos, se examinaron los espacios intertrabeculares de médula ósea lejanos de la superficie articular y no manifestaron cambios histológicos asociados a enfermedades articulares degenerativas como la degeneración quística y/o defectos superpuestos del cartílago. La celularidad se evaluó utilizando el porcentaje de células hematopoyéticas en relación al porcentaje de adipocitos maduros en cada espacio intertrabecular. La relación mielocítica: eritrocítica (M: E) se estimó en los espacios intertrabeculares alejados del hueso cortical. El número de megacariocitos se cuantificó en un área de 1 mm², equivalente a dos espacios intertrabeculares (85).

Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se realizó en cortes de tejido de médula ósea de 4 μm los cuales se colocaron en laminillas electrocargadas, se desparafinaron durante toda la noche en estufa a 60°C y posteriormente en dos pases de 8 minutos cada uno en solución Ottix plus (Diapath), los tejidos se hidrataron en solución Ottix shaper (Diapath) 2 pases de 5 minutos cada uno y finalmente en agua corriente durante 10 minutos. Se hizo desenmascaramiento de antígeno con solución de citrato de sodio (Sigma) en olla de presión en microondas (KOS, Milestone). Se bloqueó la peroxidasa endógena durante 20 minutos (Vector) seguido de un bloqueo con suero normal de caballo al 2.5% (Vector). Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: CD271/NGFR, conejo EP1039Y 1:50 (Biogenex); CD10, ratón, 1:25 en humanos y perros y 1:100 en ratones (Abcam), LepR, cabra policlonal, 1:250 (R&D System). La incubación con el anticuerpo primario se dejó toda la noche en refrigeración a 4°C; como anticuerpo secundario se usó un polímero HRP reagent KIT específico para la especie (Vector anti-ratón, Vector anti-conejo, Vector anti-cabra) durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente la reacción se evidenció con diaminobencidina (Vector).

Adquisición y análisis de imagen.

Las laminillas fueron escaneadas utilizando el equipo Aperio CS2 (Leica Biosystems) con el objetivo 20X y mediante el software Aperio ImageScope (V12.3.2.8013) se adquirieron las imágenes. El análisis de imagen se llevó a cabo utilizando el software CellProfiler 2.1.1 y se cuantificó el área ocupada por la población de células estromales en las imágenes de las tinciones de inmunohistoquímica de las secciones completas de tejido de cada una de las especies.

Procesamiento de médula ósea

Humano

Se obtuvieron 58 muestras de raspado de médula ósea obtenidas de la cabeza femoral así como de fémur proximal durante la cirugía de reemplazo de cadera. El material se depositó en tubos cónicos (Falcon) de 50 ml los cuales contenían medio de cultivo RPMI (HyClone) adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone) y antibiótico (penicilina/estreptomicina) 1 μ L/ml (Gibco). La muestra se homogeneizó con el medio de cultivo que la contenía, con una pipeta de 10 ml se pasó por un filtro de 100 micras (Corning) y se depositó en un tubo nuevo estéril. Se centrifugaron los tubos a 1200 g durante 8 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 ml de medio de cultivo RPMI (HyClone) adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone) y antibiótico (penicilina/estreptomicina) 1 μ L/ml. Se realizó un conteo celular con solución de Turk (Golden Bell) y evaluación de viabilidad celular con tinción de azul de tripano (Gibco) en hemocitómetro.

Perro

Se obtuvieron 30 muestras de médula ósea obtenidas bajo punción y aspirado de la cresta iliaca de perros bajo anestesia sometidos a algún procedimiento quirúrgico. La muestra se obtuvo en una jeringa de 10 mL la cual contenía 1 mL de heparina de 1000 UI/mL. Se homogeneizó para mezclar con el anticoagulante y se mantuvo así hasta su procesamiento en el laboratorio en donde se pasó la muestra a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugó a 1200 g por 8 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionó 1mL de medio de cultivo, se realizó conteo y viabilidad celular en hemocitómetro.

Obtención de células mononucleares

En un tubo cónico de 15mL que contenía 3mL de Ficoll (GE Healthcare) se adicionó el paquete celular suspendido en 4mL de medio de cultivo por cada 200×10^6 células totales, se centrifugaron a 400g durante 30 minutos a 1 de desaceleración. Como resultado se obtuvieron 3 capas que contenían diferentes tipos celulares, se descartó la capa superior que corresponde al plasma y se recuperó la capa intermedia donde se encuentran las células mononucleares y se colocó en un tubo cónico de 15mL estéril; para retirar el exceso de ficoll se adicionaron 10mL de PBS estéril 1X (HyClone) y se centrifugaron a 1200 g por 8 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB y antibiótico (penicilina/estreptomicina) $1\mu\text{L}/\text{mL}$, se realizó conteo celular con solución de Turk y evaluación de la viabilidad celular con colorante de azul de tripano.

Ensayo de colonias de progenitores hematopoyéticos

A partir de células mononucleares, se realizó el cálculo para sembrar 20,000 células las cuales estaban mezcladas en 200 μL de medio de cultivo. Se adicionaron las células correspondientes en un vial que contenía 2mL de metilcelulosa (Stem Cell Technologies) previamente suplementado con 20 μL de factor de células troncales canino (canine Stem cell factor {cSCF}) y 20 μL de factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas canino (cGM-CSF), se homogeneizó el vial mediante vórtex, y después de 3 a 5 minutos, con una micropipeta de 1000 μL se tomó la metilcelulosa y se fue colocando cuidadosamente con movimientos circulares en una caja de cultivo de 35mm estéril, evitando la formación de burbujas. El ensayo se realizó por duplicado, y se colocó en la incubadora a 37°C con 5% de CO_2 , Se dejaron durante 14 días y se realizó el conteo de colonias, identificando los diferentes progenitores hematopoyéticos de acuerdo a sus características morfológicas:

CFU-G: unidades formadoras de colonias de granulocitos. Colonias formadas por células redondas, pequeñas, de morfología compacta y color generalmente más oscuro que las colonias de monocitos.

CFU-M unidades formadoras de colonias de monocitos. Colonias formadas por células redondeadas pero irregulares, células más distantes unas de las otras, un color más claro, formado usualmente por un menor número de células que las de granulocitos.

CFU-GM: unidades formadoras de colonias de granulocitos y monocitos. Colonias usualmente de mayor tamaño, formado tanto por células granulocíticas como monocíticas que pueden encontrarse una de cada lado de la colonia o tener un centro granulocítico y por fuera de la colonia ser monocítico.

CFU-E: unidad formadora de colonias de eritrocitos. Colonias formadas por células muy pequeñas, generalmente es difícil distinguir células individuales, colonias muy pequeñas. Las colonias son de color rojo pálido, lo cual es más perceptible si se apaga la luz del microscopio.

BFU-E: unidad formadora de "ráfagas" de eritrocitos. Colonias formadas por células muy pequeñas, las colonias son mucho más grandes que las CFU-E y usualmente son lobulares. Las colonias son de rojo más intenso.

CFU-GME: unidad formadora de colonias mixtas. Colonias formadas tanto por células mieloides como eritroides, usualmente son de mayor tamaño.

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

Para establecer la frecuencia de progenitores de células estromales de médula ósea (BMSC) en muestras de aspirado y raspado de médula ósea se llevó a cabo el ensayo de CFU-F el cual consistió en sembrar 250,000 y 500,000 células en cajas de cultivo estériles de 35mm (Corning) contenidas en medio de cultivo DMEM bajo en glucosa (HyClone) suplementado con 10% de SFB y 1% de

antibiótico (penicilina/estreptomicina). Se mantuvieron en incubadora a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 14 días realizando cambio de medio al séptimo día. Una vez transcurridos los 14 días se retiró el medio de cultivo y se lavó la caja con 1 mL de PBS 1x no estéril, se dejaron secar a temperatura ambiente durante una noche y al día siguiente se realizó la tinción de Wright colocando 2 mL de colorante durante 2 minutos, posteriormente se agregó solución amortiguadora de fosfatos y se dejaron incubar durante 4 minutos, después se decantó el colorante y se enjuagó la caja con agua corriente y nuevamente se dejan secar para su cuantificación. Se consideró como colonia a un conjunto de células que agrupadas medían igual o más de 1mm² y crecieron hacía una misma dirección con un centro definido y como grupo a un agregado de células de menos de 1 mm² y mayor a 10 células con un centro definido. Se contó el total de número de colonias obtenidas en aumento 4X

Evaluación de la frecuencia de células hematopoyéticas y BMSC por citometría de flujo

Para la evaluación de la frecuencia de las poblaciones HSCP y BMSC de médula ósea de perro las células mononucleares se lavaron con PBS estéril y centrifugadas a 1200 g durante 8 minutos. Posteriormente fueron suspendidas en buffer de citometría (PBS 1x, EDTA 1mM y 2% SFB) e incubadas durante 20 minutos a 4°C en oscuridad con un panel establecido para esta especie (Cuadro 6). Se emplearon 1x10⁶ células mononucleares por tubo. Posteriormente las células fueron fijadas con 250 µL de solución de lisis (BD) al 10% en agua inyectable estéril durante 10 minutos a 4°C en oscuridad. Se lavaron las células con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µL de buffer de citometría. La lectura de las células se realizó utilizando el citómetro BD Canto II.

Cuadro 6. Panel para la identificación de la población HSCP y BMSC en células mononucleares de perro.

HSCP	LIN ⁻ CD34 ⁺ C-kit ⁺ CD90 ⁺
BMSC	CD45 ⁻ CD271 ⁺

Cuadro 7. Anticuerpos empleados en la evaluación de HSCP y BMSC por citometría de flujo

Anticuerpo	Marca	Dilución
CD45 APC	Genetex	1:50
CD34 PE	BD	1:50
c-Kit PerCP Cy5.5	Invitrogen	1:100
CD90 APC	Bioscience	1:100
CD271 PE	BD	1:100
LIN Pacific Blue	BioLegend	1:50

Obtención de células estromales de médula ósea (BMSC)

Para la obtención y expansión de BMSC se realizaron cultivos a partir de células mononucleares en placas de 100 mm (Corning) a una densidad de $10-50 \times 10^6$ células en medio DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% de SFB, 1 μ L/mL de antibiótico y 1% de glutamina (Gibco). Al día siguiente se realizó cambio de medio para eliminar a las células no adherentes y posteriormente se realizó cambio de medio semanalmente hasta alcanzar confluencia mayor al 80% de la caja de cultivo. De las células obtenidas se hacía una resiembra para purificar la población y expandir la población para otros ensayos. El resto de células se mantuvieron en criopreservación para generar un banco de BMSC de perro.

Identificación de BMSC mediante la técnica de citometría de flujo

Para la caracterización de las BMSC en cultivo se empleó la técnica de citometría de flujo en una segunda resiembra que garantizara la pureza de las células. Se estableció un panel de anticuerpos de acuerdo a marcadores previamente reportados en perros tales como CD45, CD29, CD44 y CD90.

Tripsinización.

En una placa de cultivo en resiembra 2 con más del 80% de confluencia se adicionaron 5 mL de tripsina (HyClone) y se dejó incubando durante 7 minutos a 37°C, 5%CO₂, posteriormente se adicionaron 500 µL de SFB para detener la reacción de la tripsina. La suspensión obtenida se colocó en un tubo cónico de 15 mL y se aforó a 14 mL con PBS 1X estéril, se centrifugó a 1200 g durante 8 minutos con desaceleración 3. Se decantó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de medio DMEM, se realizó conteo celular con azul de tripano en hemocitómetro.

Tinción de células

Para este ensayo se emplearon 1×10^5 células por cada tubo suspendidas en buffer de citometría (PBS 1X/EDTA 1mM/ 2%SFB) los cuales se incubaron con los anticuerpos CD45 APC, CD29 APCCy7, CD44 FITC, CD90 APC a temperatura ambiente durante 20 minutos en oscuridad (Cuadro 8), posteriormente se adicionaron 250 µL de solución de lisis al 10% (BD) y se incubaron durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de PBS 1X no estéril y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 50 µL de PBS 1X no estéril, se cubrieron los tubos con papel aluminio y se conservaron a 4°C hasta su análisis en el citómetro de flujo BD canto II del centro de instrumentos del hospital de especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS.

Cuadro 8. Anticuerpos empleados en la evaluación del fenotipo de las BMSC en cultivo por citometría de flujo

Anticuerpo	Marca	Dilución
CD45 APC	Genetex	1:100
CD29 APCCy7	Genetex	1:100
CD44 FITC	Genetex	1:100
CD90 APC	Bioscience	1:100

Evaluación de la capacidad de diferenciación a otros linajes celulares

Diferenciación adipogénica

Para determinar la capacidad de las BMSC para diferenciarse a adipocitos se emplearon 10,000 células obtenidas de la primer resiembra (R1), las cuales se sembraron en placas de cultivo de 48 mm en medio DMEM suplementado con SFB, antibiótico y glutamina. Se realizó cambio de medio al siguiente día y al llegar al 80% de confluencia se cambió el medio por medio de diferenciación adipogénico para perro (Cell Applications) durante 21 días con dos cambios de medio por semana. El ensayo se realizó por duplicado, el control se mantuvo con DMEM suplementado.

La diferenciación se evaluó por la presencia de vacuolas lipídicas que fueron observadas mediante la tinción de rojo oleoso. Después de 21 días se retiró el medio de cultivo y se agregaron 300 µL de formaldehído al 4% por 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 300 µL de propilenglicol absoluto durante 10 minutos, se decantó el medio y se adicionaron 300 µL de colorante de rojo oleoso y se mantuvo en incubación a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente se retiró el colorante y se adicionaron 300 µL de propilenglicol al 85% durante 3 minutos; finalmente se realizó un lavado con agua destilada. Para observar los

núcleos de las células se realizó una tinción con hematoxilina de Harris durante 10 minutos y finalmente se realizó un lavado con agua destilada y se agregó medio de montaje acuoso (Super Mount, Biogenex). Se hizo la evaluación cualitativa en un microscopio invertido (Olympus) considerando positiva la reacción si se observaban células con vacuolas teñidas con rojo oleoso.

Diferenciación osteogénica

Para determinar la capacidad de las BMSC para diferenciarse a osteocitos se emplearon 5,000 células de R1 sembradas en placas de cultivo de 48 mm en medio DMEM suplementado con SFB, antibiótico y glutamina. Se realizó cambio de medio al siguiente día y al llegar al 80% de confluencia se cambió el medio por medio de diferenciación osteogénico (DMEM bajo en glucosa suplementado con 10% SFB, 1% glutamina, 50 μ M Ascorbato-2-fosfato, 10 mM β glicerofosfato, 0.1 μ M dexametasona) y se mantuvieron en esas condiciones durante 14 días con dos cambios de medio por semana. La osteogénesis se demostró por la acumulación de fosfato de calcio mineralizado con la tinción de Von Kossa. Para la tinción se hizo un lavado previo de la placa de cultivo con agua destilada, posteriormente se adicionaron 300 μ L de solución de nitrato de plata y se dejó incubar durante 20 minutos bajo exposición a luz seguido de hipoclorito de sodio al 0.01% durante 5 minutos: se lavó la placa de cultivo con agua destilada y se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Harris, se enjuagó la placa y se adicionó medio de montaje acuoso. Se hizo el análisis cualitativo en un microscopio invertido observando los precipitados argentafines (evidencia de plata metálica) en las células diferenciadas.

Diferenciación condrogénica

En un tubo cónico de 15 ml se depositan 2.5×10^5 células obtenidas de R0, se centrifugan a 1000 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se adicionan 500 μ L de medio de diferenciación condrogénico (DMEM bajo en glucosa suplementado con 100 nM de dexametasona, 50 μ M ácido ascórbico, 1 mM

piruvato de sodio y 0.05 μ l de TGF- β 3), se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos, se dejaron incubar a 37°C, 5% CO₂ durante 28 días con dos cambios de medio por semana, cada ensayo se realizó por duplicado con un control negativo tratado únicamente con DMEM suplementado con 10% SFB, 1% de glutamina y antibiótico. Al final se formaron pequeñas micromasas las cuales se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% durante 2 horas, posteriormente se deshidrataron en gradientes de alcoholes del 70, 96% y finalmente alcohol absoluto durante 2 horas cada uno, posteriormente se dejaron durante 60 minutos en xilol y transcurrido ese tiempo se agregó parafina líquida (Paraplast) durante 1 hora, se hizo un cambio de parafina y posteriormente se incluyeron las micromasas en un casete de histología para obtener cortes y realizar la tinción Tricrómica de Masson (Hycel)

Ensayos de proliferación celular

Se obtuvieron BMSC a partir de la primera siembra (R0) las cuales se sembraron a una densidad de 1×10^5 células en cajas de 100mm en medio DMEM suplementado, cuando alcanzaron el 80% de confluencia se tripsinizaron y realizó resiembra (R1) a una densidad de 1×10^5 células en placas de 100 mm, después de 10 días las BMSC fueron tripsinizadas, contabilizadas y resembradas y se llevó a cabo el mismo proceso a los 10 días.

La capacidad de proliferación se evaluó mediante la evaluación del número de doblajes poblacionales (NPD) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{NPD} = \text{Log}^{10}(\text{N}/\text{N}_0) \times 3.33$$

Dónde:

N_0 = Población inicial

N = Población final

Una vez que el NPD obtenido fue de 0, y este se mantuvo durante tres lecturas y las células presentaron morfología senescente se detuvo el experimento.

Estadística

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA), para la comparación de grupos con distribución no normal se emplearon las pruebas de Kruskal-Wallis (comparación entre humano, ratón y perro) y Mann-Whitney (para comparación entre dos grupos). Las pruebas de correlación se llevaron a cabo con la prueba de correlación de Spearman. Los datos se presentan como medianas y rango intercuartil.

Resultados

Muestras de médula ósea

Se estudiaron muestras histológicas de médula ósea de perro, humano y ratón las cuales fueron evaluadas y seleccionadas por 3 patólogos para asegurarse de que presentaran tejido hematopoyético inmerso en el hueso trabecular y tejido adiposo, que las células hematopoyéticas presentaran las características normales para el linaje, así como adecuada secuencia de maduración y localización dentro del tejido y no hubiera evidencia de alguna otra alteración como fibrosis o necrosis.

En el caso de las muestras de humano, aquellas que se obtuvieron durante el procedimiento de reemplazo de cadera fueron de individuos adultos (intervalo de 53 a 92 años) y de 58 muestras obtenidas se seleccionaron 9 que cumplieron con los criterios establecidos por los patólogos. Las tres muestras de individuos pediátricos (intervalo de 8 a 16 años) se seleccionaron a partir de 9 muestras evaluadas y que cumplieran con los criterios antes establecidos.

Las biopsias de hueso completo de ratón C57BL6 fueron obtenidas de animales jóvenes (6 semanas) y gerontes (24 meses); mientras que las muestras de ratones SCID fueron obtenidas de animales adultos (15 semanas) que cumplieron con los criterios establecidos.

En el caso de los perros se recolectaron 30 muestras de cabeza femoral de perros de diferentes razas y edades, sin embargo, solo 10 de ellas cumplieron con dichos criterios para su evaluación y correspondieron a 8 perros de raza única, 1 de la raza Husky Siberiano y uno de la raza Pomerania en un intervalo de edad de 3 meses a 8 años.

Cuadro 9. Características de las muestras de biopsia de médula ósea de perro.			
Raza	Edad en años	Edad en años humano	Clasificación etaria
Mestizo	0.3	6	Pediatrico
Mestizo	1	12	Pediatrico
Mestizo	2	24	Pediatrico
Mestizo	2	24	Pediatrico
Mestizo	1.5	24	Pediatrico
Pomerania	3	30	Adulto
Husky siberiano	4	35	Adulto
Mestizo	4	35	Adulto
Mestizo	6	45	Adulto
Mestizo	8	60	Adulto

Evaluación histológica de médula ósea de perros y su comparación con humano y ratón.

Una vez que las muestras fueron seleccionadas se les hizo una evaluación cualitativa la cual incluyó el porcentaje de celularidad, la relación M:E y el número de megacariocitos por mm². La médula ósea de ratón presentó la celularidad más

alta (100 %) para ambas cepas evaluadas (Figuras 5 B y C). El alto porcentaje de la celularidad en la médula ósea de ratón se correlaciona con la ausencia de adipocitos. Tanto la médula ósea humana (Figura 5A) como la de perro (Figura 5D) tuvieron un porcentaje de celularidad significativamente menor que la médula ósea de ratón (mediana [MED]=45%, rango intercuartil (IQR)=27.5% y MED=70%, IQR=56.2% respectivamente ($p < 0.0001$) (Figura 5E). La variabilidad en el porcentaje de la celularidad en los grupos de humano y perro fue alta, mientras que no se observó en los ratones de ambas cepas (Figura 5E).

El contenido de megacariocitos fue mayor en ratones SCID (MED=83/mm² IQR=33/mm²) que en ratones C57BL/6 (MED=29/mm², IQR=24/mm²) ($p=0.0079$) (Figuras 6 B, C y E). Ambas cepas de ratones presentaron un mayor contenido de megacariocitos que la médula ósea humana y de perro (MED=6.75/mm², IQR=3.5/mm² y MED=7.0/mm², IQR=4.2/mm² respectivamente) ($p<0.0001$) (Figura 6 A, D y E). Al comparar por grupos etarios no hubo diferencia entre humanos y perros; sin embargo, el contenido de megacariocitos fue mayor en los ratones C57BL/6 de 6 semanas que en los de 24 meses ($p=0.0159$) (Figura 7 panel superior).

Respecto a la relación M:E hubo una diferencia significativa entre las especies evaluadas ($p=0.0138$). Los ratones SCID presentaron la relación M:E más baja (Figura 8 C y E). Las muestras de ratones C57BL/6 de 6 semanas tenían una relación M:E más baja en comparación con los ratones de 24 meses ($p=0.0179$) (Figura 7 centro panel inferior y Figura 8B). No hay impacto de la edad en muestras de humano y perro en la relación M:E (Figura 7 panel inferior izquierda y derecha, Figura 8 A, D y E).

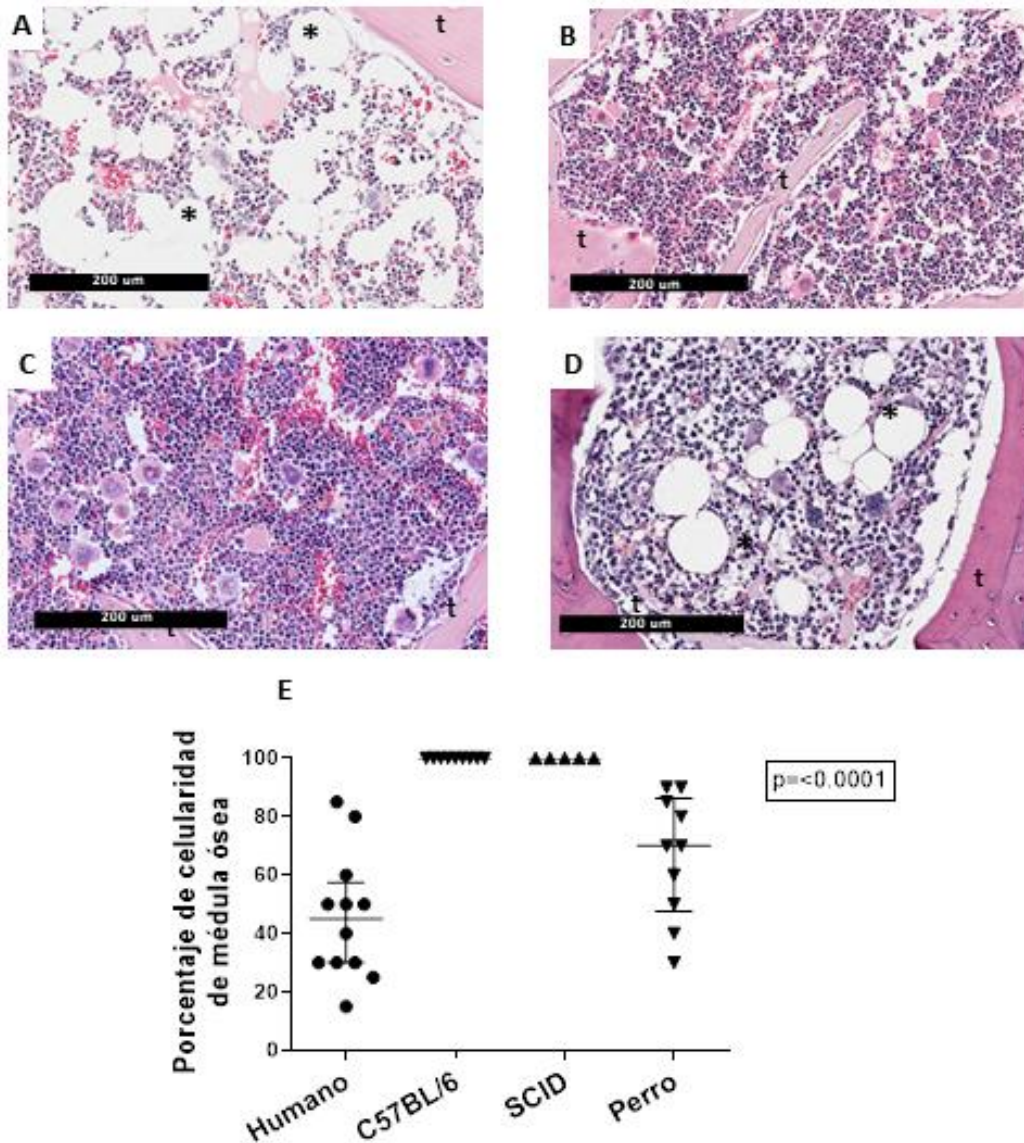


Figura 5. Fotomicrografías de médula ósea de humano (A), ratón C57BL6 (B), ratón SCID (C) y perro (D) teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) donde se muestra la celularidad para cada especie. Los asteriscos resaltan los adipocitos y el hueso trabecular está marcado con una letra t, barra=200 mm, E. Representación gráfica del porcentaje de celularidad en muestras de médula ósea, $p < 0.0001$, Prueba de Kruskal-Wallis.

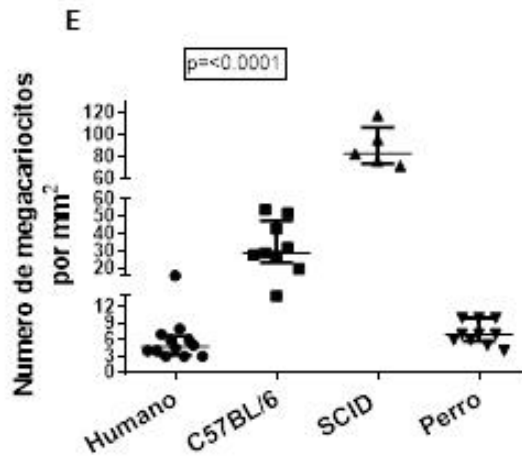
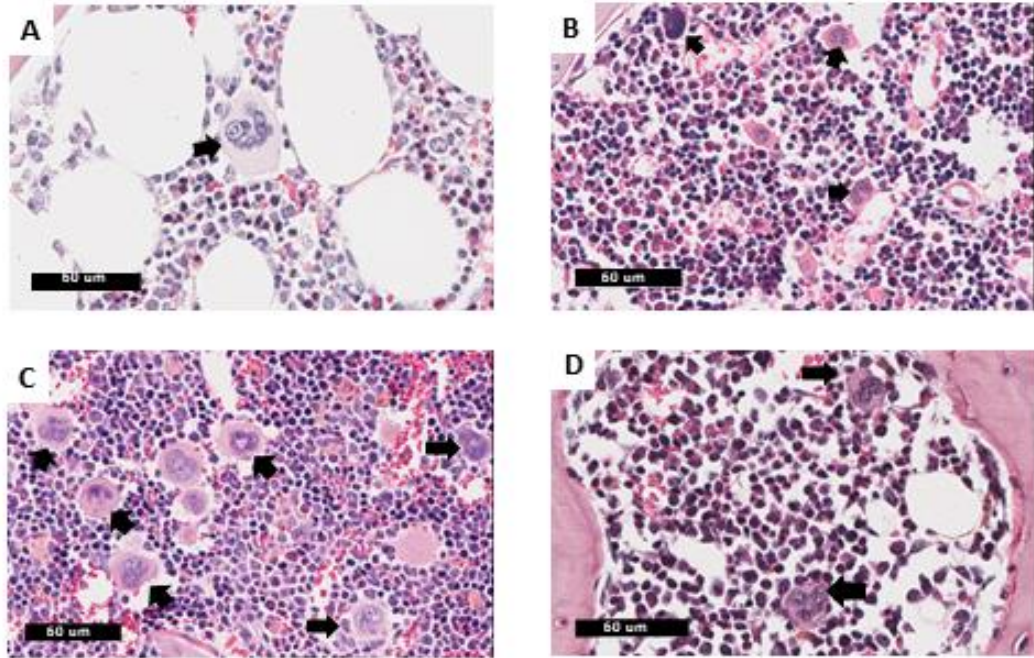


Figura 6. Fotomicrográficas de médula ósea de humano (A), ratón C57BL6 (B), ratón SCID (C) y perro (D) teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) donde se muestra la presencia de megacariocitos en cada una de las especies evaluadas (flechas negras). Barra=60 mm. E. Representación gráfica de la frecuencia de megacariocitos en muestras de médula ósea donde los ratones de ambas cepas presentaron un número significativamente mayor en comparación a humanos y perros, $p < 0.0001$, Prueba de Kruskal-Wallis.

Efecto del envejecimiento en la composición de la médula ósea en perros, humano y ratón.

Para evaluar si el envejecimiento induce cambios en el microambiente de la médula ósea en las diferentes especies y si existen similitudes, correlacionamos la edad y la celularidad de la médula, la relación M:E y el número de megacariocitos en la médula ósea humana, de perro y de ratón (C57BL/6). En el caso de los perros se hizo la conversión de la edad de perro a edad en años-humano (86) y en el caso de los ratones se manejó la edad en meses. Encontramos que la médula ósea humana y la médula ósea de perro experimentan cambios similares relacionados con la edad, que incluyen una disminución en la celularidad de la médula ósea con el envejecimiento y ningún cambio en el contenido de megacariocitos. Por el contrario, la médula ósea de ratón no tenía correlación con la edad y la celularidad, pero tenía una fuerte correlación negativa con el número de megacariocitos. La relación M:E tuvo una fuerte correlación positiva con la edad en ratones y una menor correlación en humanos y perros (Figura 9).

Expresión de marcadores *in situ* de células estromales en médula ósea (BMSC)

Dada la participación de las BMSC en la regulación de la hematopoyesis en humanos y ratones, buscamos si la población de las BMSC de médula ósea de perros podía identificarse a partir de los mismos marcadores que en humanos y ratones y si su distribución es similar a esas especies.

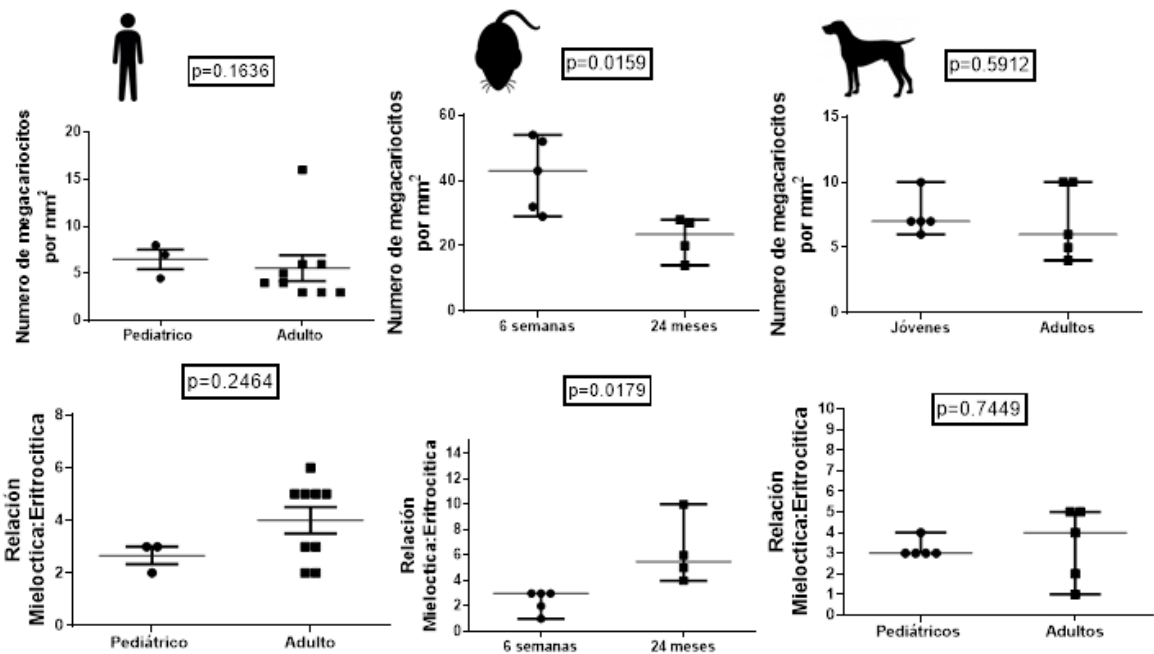


Figura 7. Representación gráfica de la evaluación de la frecuencia de megacariocitos (panel superior) por etapa etaria en humanos (Izq), ratones C57BL6 (Centro) y perros (Der). En humanos y perros no hubo diferencia significativa, pero los ratones de 6 semanas presentaron una frecuencia mayor que los gerontes $p=0.0159$. Efecto de la edad en la relación M:E (panel inferior), no hubo diferencia significativa en humano (Izq) y perro (Der) pero los ratones de 24 meses (Centro) tuvieron una diferencia estadística $p=0.0179$. Prueba de Mann Whitney.

Determinación de la población BMSC CD271+ en médula ósea de perro.

En la médula ósea humana, el anticuerpo CD271 reconoció células ramificadas, delicadas, con morfología reticular compatible con la morfología de células estromales mesenquimales de la médula ósea *in situ*. En el caso de los perros el mismo marcador se expresó en una población de células ramificadas morfológicamente similares a la población CD271+ (Figura 10). En ambas especies, las células hematopoyéticas fueron negativas para CD271.

Las BMSC CD271+ se distribuyeron escasamente dentro del parénquima hematopoyético, formando delicadas ramas simples que se extendían entre las células hematopoyéticas (Figura 10A, B). BMSC CD271+ también se pueden encontrar muy cerca del hueso trabecular (Figura 10C, D). En los sitios

perivasculares, se observó que formaban capas de células delgadas que delineaban las células endoteliales sinusoidales (Figura 10E, F) y adyacentes a los megacariocitos (Figura 10G, H). Se identificó regularmente una capa celular gruesa y ramificada de BMSC CD271⁺ para delinear periféricamente las arteriolas (Figura 10I, J). Dado el marcado predominio del área de superficie vascular sinusoidal sobre la vasculatura arteriolar y el área de superficie de hueso trabecular en el espacio medular, la presencia de BMSC CD271⁺ fue mucho más extensa en las ubicaciones perisinusoidales que en las periarteriolas o peritrabeculares. Sin embargo, la morfología de las BMSC alrededor de las arteriolas estuvo marcada por su densidad y arborización prominente, en comparación con el revestimiento de la capa de una sola célula y la arborización menos prominente alrededor de los sinusoides de la médula

Determinación de la población BMSC LepR⁺ en médula ósea de ratón.

Las células receptor de leptina⁺ (LepR⁺) en la médula ósea de ratón se asemejan en morfología y distribución a las células CD271⁺ en la médula ósea humana y de perro. La morfología reticular fue más evidente en las BMSC LepR⁺ en ratones SCID que en las de ratones C57BL/6 (Figura 11A, B). En la médula ósea de ratón, en las cepas C57BL/6 y SCID, las células LepR⁺ también tienen una distribución similar. Al igual que las BMSC CD271⁺ en la médula ósea de humanos y perros, las BMSC LepR⁺ se identificaron circundantes a sinusoides (Figura 11E,F) y algunos megacariocitos perisinusoidales (Figura 11G,H). Las BMSC LepR⁺ en ambas cepas de ratón presentan la distribución de ramificación multicapa característica de las BMSC periarteriolas (Figura 11I, J) observada en especímenes de perros y humanos. Además, las BMSC LepR⁺ murinas también se distribuyeron adyacentes al hueso y exhibieron arborización en el parénquima hematopoyético (Figura 11A-D).

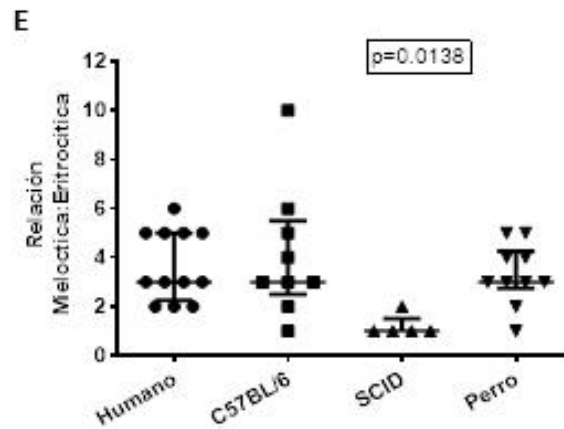
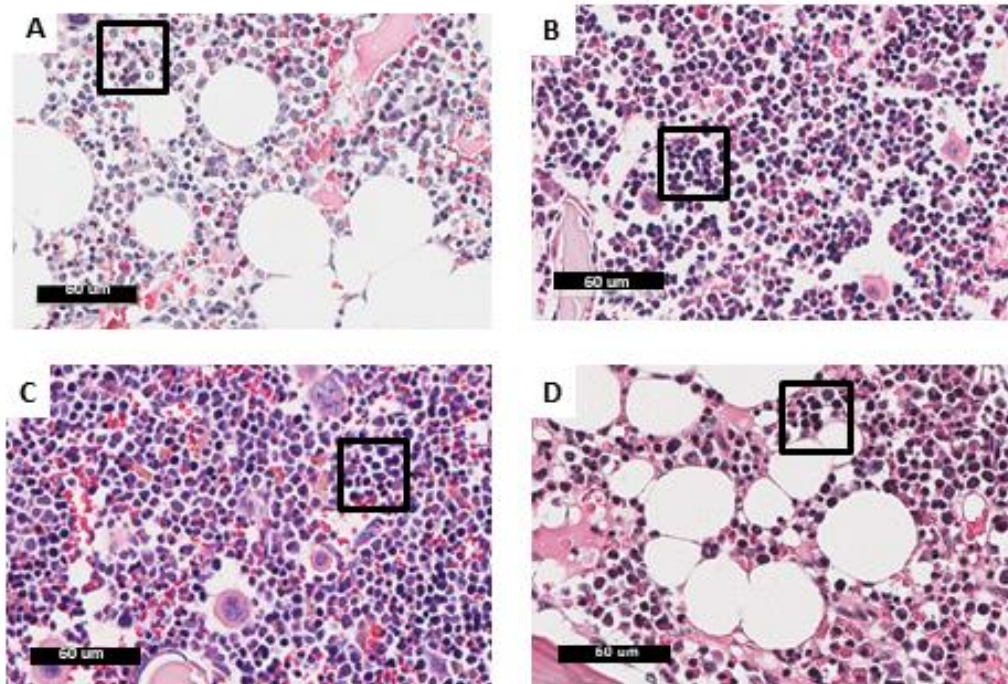


Figura 8. Fotomicrografías de médula ósea de humano (A), ratón C57BL6 (B), ratón SCID (C) y perro (D) teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) donde se muestra en el recuadro la población eritrocítica (islas eritrocíticas) las cuales son reconocibles debido a sus núcleos redondos teñidos intensamente. Barra de escala 60 µm. E. Representación gráfica de la relación M:E, la cepa SCID presentó menor la menor relación. Kruskal-Wallis.

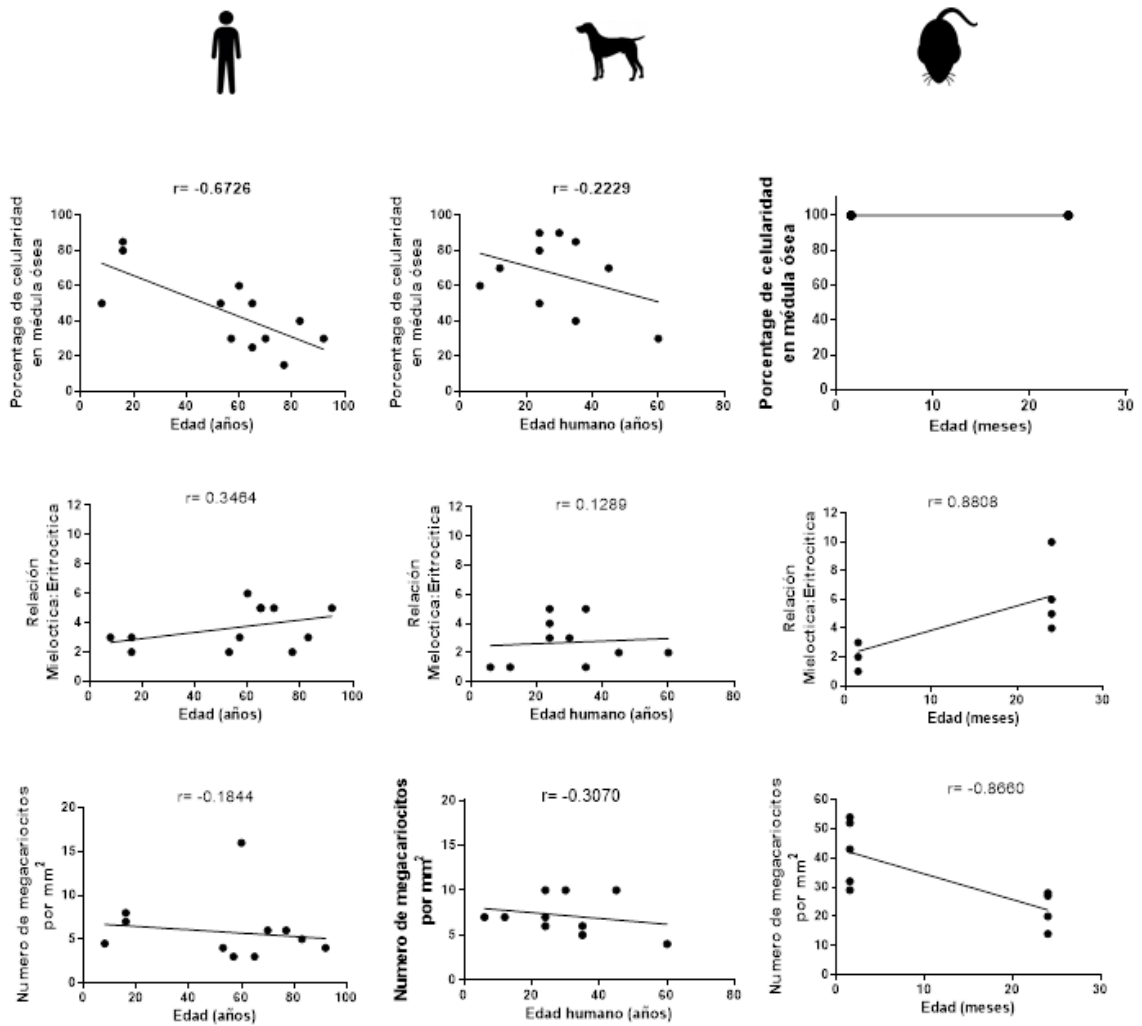


Figura 9. Representación gráfica de correlaciones de celularidad (panel superior), relación M:E (panel central) y número de megacariocitos (panel inferior) en médula ósea de acuerdo a la edad en las 3 especies. Se encontró similitud entre el humano y perro los cuales presentaron correlación negativo con la edad y la celularidad en médula ósea sin cambios significativos en el número de megacariocitos y la relación M:E; mientras que en el ratón se encontró una correlación positiva entre la edad y la relación M:E y una correlación negativa en el número de megacariocitos. Correlación de Spearman.

Determinación de la población BMSC CD10⁺ en médula ósea

Previamente la expresión del marcador CD10 había sido reportado como una subpoblación de BMSC en humanos, por lo que evaluamos si esta población se expresaba en las tres especies y si se pudiera emplear como un marcador general de las BMSC. En las muestras evaluadas de humanos, la expresión de CD10 se encontró en células hematopoyéticas, principalmente neutrófilos y posiblemente algunas hematogonias (precursoras de células B), solo algunas muestras expresaron CD10 en células alargadas, delgadas, de aparente morfología reticular compatibles con las BMSC (Figura 12 izquierda). En la médula ósea de ratones, CD10 se expresó en células alargadas, delgadas, de apariencia reticular, compatibles con BMSC las cuales se distribuyen principalmente rodeando sinusoides y capilares sanguíneos además de que presenta ramificaciones dentro del parénquima de manera focal y parcialmente hacia trabéculas (Figura 12 centro). En perros, la expresión de CD10 fue muy variable ya que se presentó en diferentes tipos de células como osteoblastos, osteocitos y condrocitos; ocasionalmente, se expresó en células estromales ramificadas o bipolares principalmente en la zona perivascular (Figura 12 derecha) No hubo expresión en células hematopoyéticas.

A pesar de que CD10 se encontró en las 3 especies y en algunas muestras fue en células que podrían corresponder a la población de BMSC, el no ser marcador exclusivo de BMSC no permite utilizarlo para identificar esta población celular, por lo que se descartó para futuros análisis.

Frecuencia de BMSC en humanos, ratones y perros.

Una vez establecidos los marcadores que identifican a la población de BMSC en las 3 especies evaluamos si la frecuencia de esta población celular era similar a pesar de no compartir los mismos marcadores. Mediante el empleo del software de análisis de imagen CellProfiler establecimos la frecuencia de la población de

las BMSC de acuerdo al porcentaje de toda el área evaluada (Figura 13A). La médula ósea humana y de perro presentaron densidades similares de BMSC CD271⁺ (MED=22.52, IQR=9.51 y MED=18.48, IQR=7.17, respectivamente; p=0.8567). Las BMSC LepR⁺ de médula ósea de ratón, de ambas cepas C57BL/6 y SCID (MED=16.78, IQR=3.11 y MED=16.53, IQR=5.96, respectivamente; p=0.6993), también tuvieron una frecuencia similar a las BMSC CD271⁺ de humanos y perros. Al hacer el análisis entre las 3 especies tampoco hubo diferencia significativa p=0.2809 (Figura 13B).

Para determinar si el envejecimiento tenía un efecto en la frecuencia de las BMSC en médula ósea determinamos si existía correlación entre la frecuencia de las BMSC y la edad de los individuos evaluados y no encontramos significancia en humanos, ratones y perros (Figura 13C).

La frecuencia *in situ* de precursores hematopoyéticos en perros no pudo establecerse debido a la falta de un anticuerpo específico para dicha población celular en tejido.

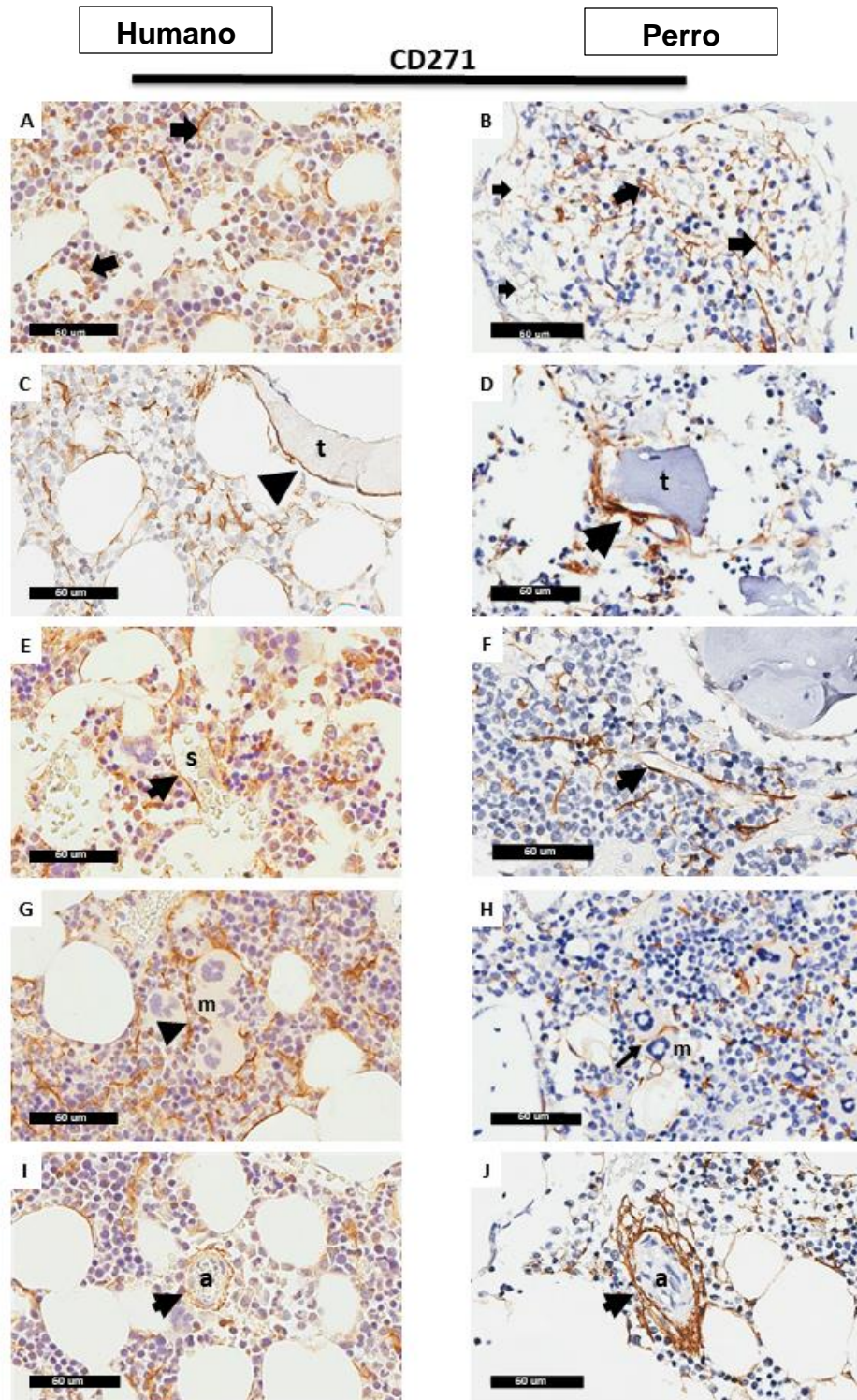


Figura 10. Comparación de la expresión y distribución de células estromales mesenquimales de médula ósea (BMSC) CD271+ en médula ósea de humano y perro.

A-J. Fotomicrografías representativas de la tinción inmunohistoquímica del marcador CD271 de BMSC. Las puntas de flecha muestran las BMSC delicadamente arborizadas en humanos (A) y perros (B) distribuidas dentro del parénquima. Las BMSC que recubren el hueso trabecular (t) son predominantemente no arborizantes (C-D). La distribución de las BMSC en humanos, perros y médula ósea es predominantemente perisinusoidal; las sinusoides están marcadas con "s" (E, F). Se indica la adyacencia de las BMSC a ambos megacariocitos marcados con 'm' (G, H). Se indica (I, J) la capa más gruesa e intensamente arborizada de BMSC alrededor de las arteriolas marcada con "a". Barra de escala 60 μm .

LepR

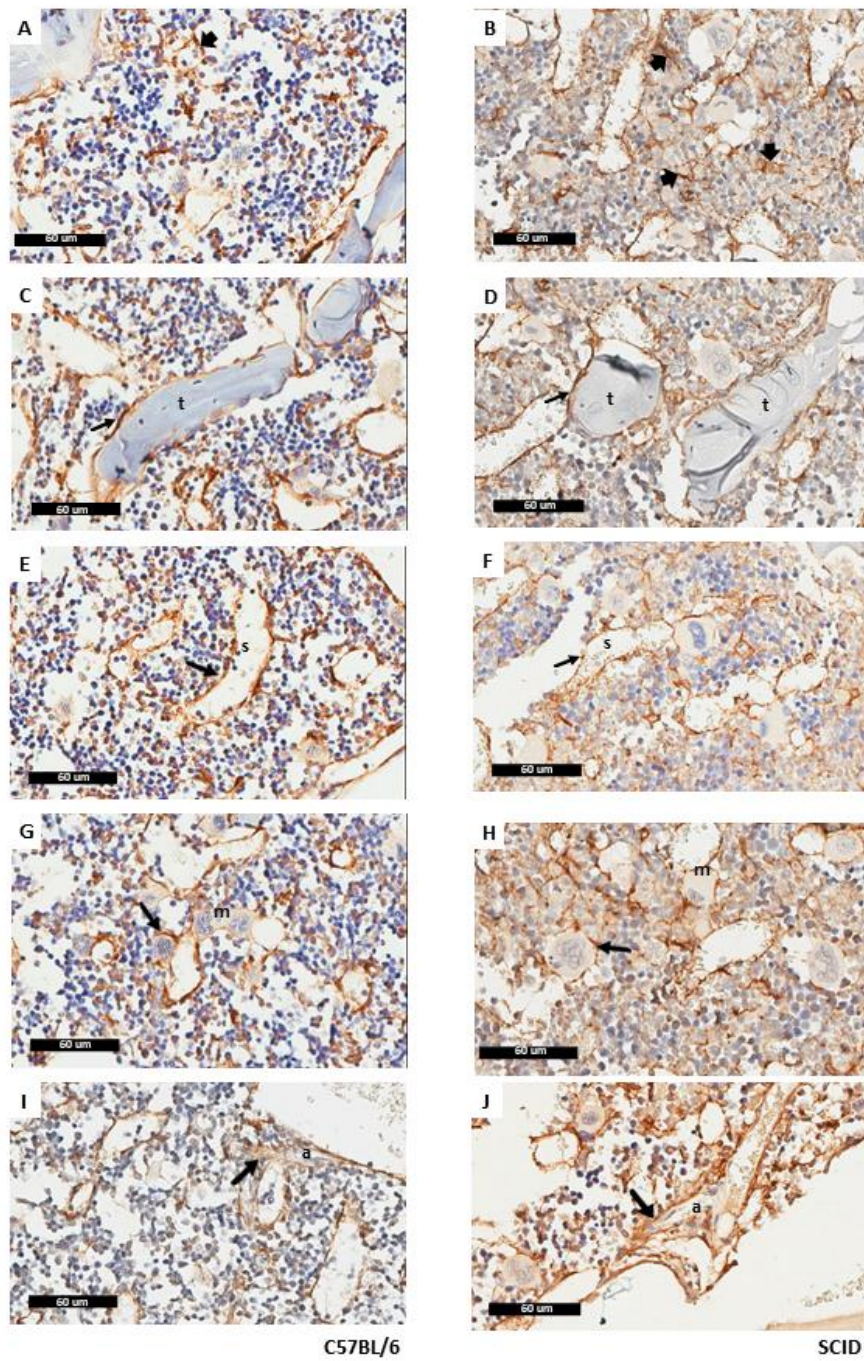


Figura 11. Comparación de la distribución de LepR+ BMSC en médula ósea de ratón en dos cepas diferentes.

A-J. Fotomicrográficas representativas de la tinción inmunohistoquímica del marcador LepR de BMSC. Las BMSC se indican mediante puntas de flecha en el ratón C57BL/6 (A) y el ratón SCID (B) que se distribuyen dentro del parénquima. Hueso trabecular (t) con BMSC que son predominantemente no arborizantes (C-D). La distribución de LepR+ BMSC es predominantemente perisinusoidal (s) (E-F). Las BMSC LepR+ se ubican junto a los megacariocitos (marcados con una "m") y se indican los sinusoides (G, H). Las arteriolas (a) están rodeadas por una gruesa e intensa capa arborescente de LepR+ BMSC (I,J). Barra de escala 60 μ m.

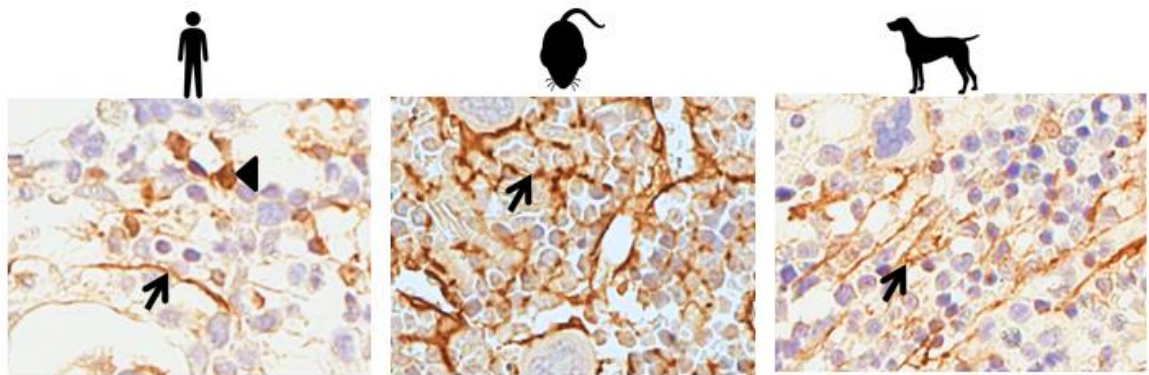


Figura 12. Expresión del marcador CD10 en médula ósea de humano, ratón y perro. Fotomicrográficas representativas de la tinción inmunohistoquímica del marcador CD10 de BMSC. La población de BMSC se marca con una flecha son células alargadas, delgadas y de apariencia reticular; mientras que en el caso de humanos (izquierda) también hay expresión en células hematopoyéticas (punta de flecha). 1000X

Determinación de la frecuencia de células progenitores/troncales hematopoyéticas y BMSC en médula ósea de perro.

A partir de células mononucleares obtenidas a partir de aspirado de médula ósea se hizo un panel de tinción para obtener la frecuencia de la población de células troncales hematopoyéticas buscando la población LIN- CD34+ C-Kit+ CD90+ que es el panel previamente reportado en perros y de la población de BMSC con fenotipo CD45- CD271/NGFR+. Existe una limitante en la disponibilidad de anticuerpos específicos para el perro por lo que la estrategia para identificar la población LIN- empleamos anticuerpo anti humano y anti ratón que presentaron reacción cruzada con las células de perro sin embargo los resultados no fueron consistentes con la población esperada por lo que la frecuencia se obtuvo solo de la población CD34+ que corresponde a los progenitores y células troncales hematopoyéticas y a las poblaciones CD34+ CD90+ y CD34+ CD90+ c-kit+. En la Figura 14-A se presentan los gráficos representativos de la estrategia empleada para la identificación de dichas poblaciones. La frecuencia de la población HSPCs CD34+ fue de 2.08 ± 0.45 , la población CD34+ CD90+ fue de 1.057 ± 0.25 y la población CD34+ CD90+ c-kit+ 0.30 ± 0.29 (n=3) lo que demuestra que entre más antígenos se incluyan en el panel se purifica la población como en el caso de humanos y ratones. La población BMSC CD45- CD271/NGFR+ presentó una frecuencia de 0.259 ± 0.383 (n=3), la estrategia para su selección se muestra en la Figura 14-B.

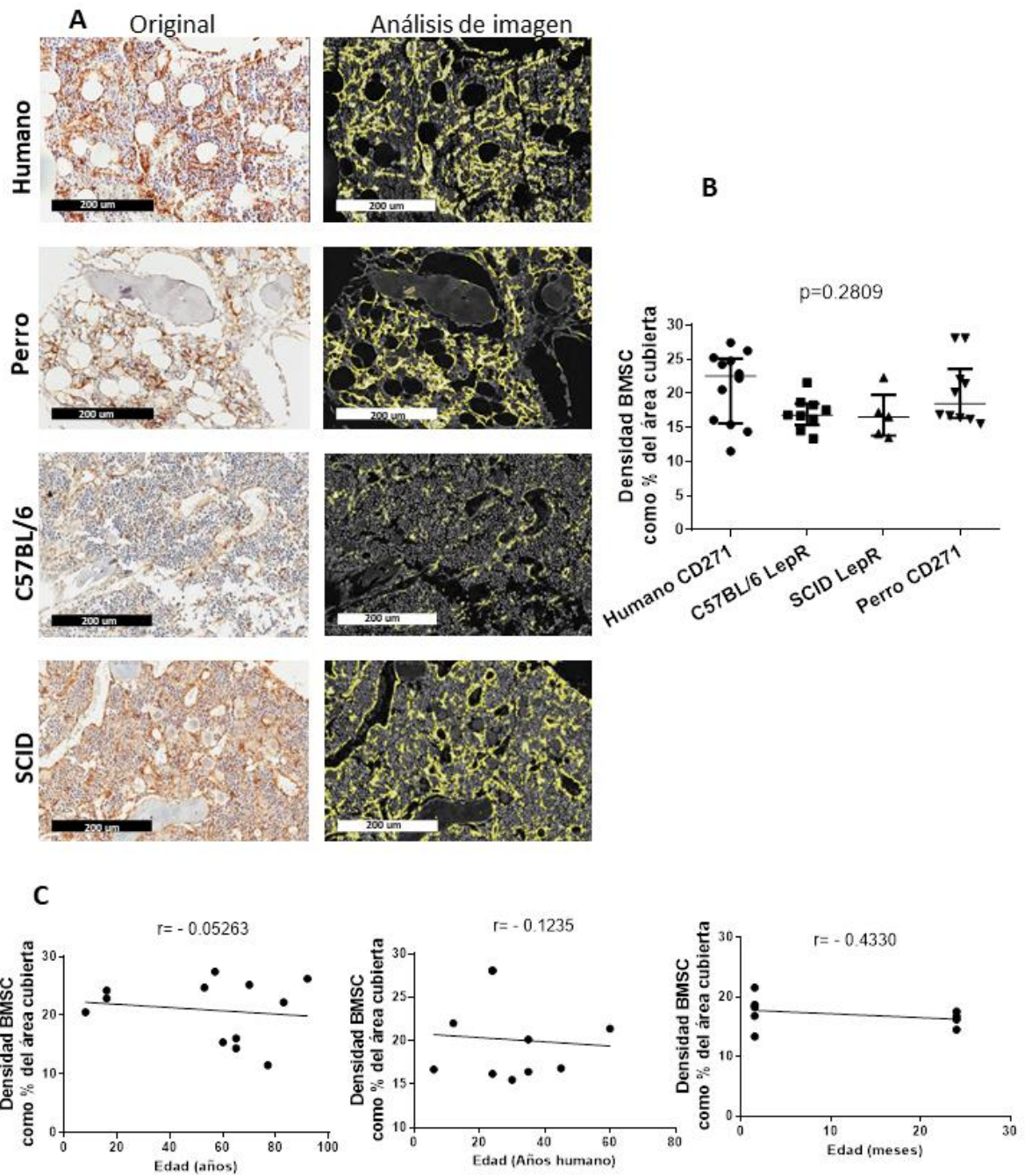


Figura 13. Frecuencia de la población BMSC en humano, ratón y perro obtenida por análisis de imagen a través del software CellProfiler

A. Fotomicrografías representativas de imágenes originales digitalizadas (izquierda) y analizadas (derecha). En la imagen original la marca de BMSC está resaltada en cromógeno marrón, mientras que en la imagen analizada se observa el contorno superpuesto del objeto generado por el software Cell Profiler (amarillo). Barra de escala 200µm. B. Representación gráfica de la frecuencia de BMSC en humanos (n = 12), perros (n = 10), ratones C57BL/6 (n = 9) y ratones SCID (n = 5) BM, $p = 0.2809$, prueba de

Kruskal-Wallis. C. Representación gráfica de la correlación de la edad con la frecuencia de BMSC en humanos, ratones y perros donde no se encontró significancia. Correlación de Spearman.

Frecuencia de progenitores hematopoyéticos mediante ensayos de formación de colonias *in vitro*.

Dado que en el caso del perro no encontramos disponible un marcador ideal para utilizar en tejido y evaluar la frecuencia de progenitores hematopoyéticos *in situ*, empleamos el ensayo de formación de colonias que además de ayudarnos a identificar la frecuencia nos permite evaluar la funcionalidad de esta población celular. Se contabilizaron las colonias totales por cada 100,000 células mononucleares (CMN) y se evaluó si la edad de los perros podía influir en su frecuencia por lo que las muestras se dividieron en dos grupos etarios, animales jóvenes de 0 a 2 años y animales adultos de 6 a 8 años. La morfología de las colonias se presenta en la Figura 15A.

La frecuencia para las unidades formadoras de colonias de granulocitos (CFU-G) fue de 180.22 ± 72.77 ; de las unidades de colonias de monocitos (CFU-M) fue de 30.60 ± 20.70 ; de las unidades formadoras de colonias granulocitos-monocitos (CFU-GM) fue de 14.20 ± 7.21 ; de las unidades formadoras de colonias de eritrocitos (CFU-E) fue de 10.20 ± 15.25 ; de las unidades formadoras de colonias de eritrocitos tempranos (BFU-E) fue de 13.70 ± 19.59 y finalmente la media de colonias mixtas fue de 15.75 ± 8.44 (Figura 15B). Cuando evaluamos la influencia de la edad en el número de colonias totales (Figura 15C), en los progenitores mielocíticos totales (Figura 15D), en los progenitores eritrocíticos totales (Figura 15E), en progenitores mixtos (Figura 15F), en progenitores de origen mielocítico (Figura 15G), en progenitores de monocitos (Figura 15H), en progenitores bipotentes granulomonocíticos (Figura 15I), en progenitores eritrocíticos tempranos (Figura 15J) y en progenitores eritrocíticos tardíos (Figura 15K), no encontramos ninguna diferencia significativa en ningún tipo de colonia.

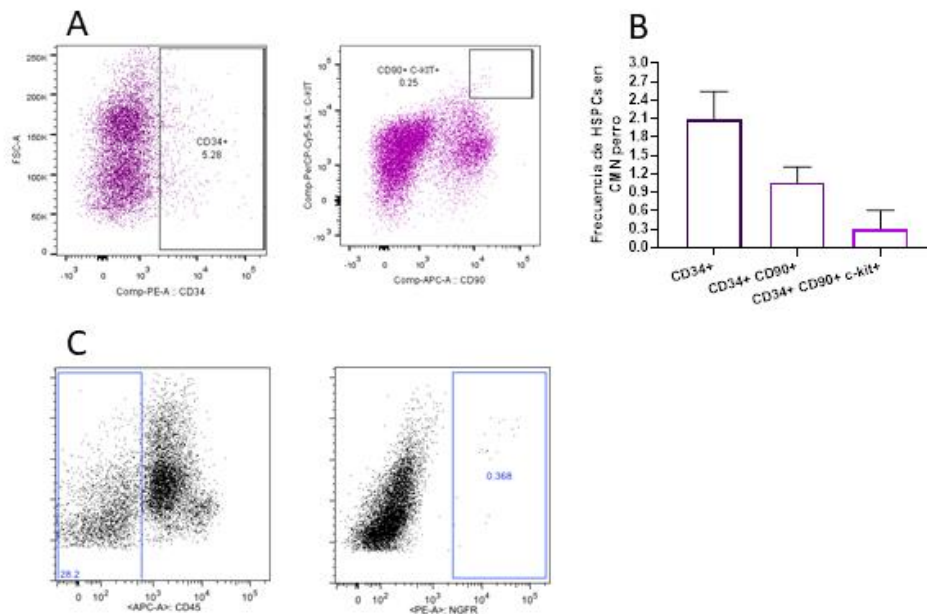


Figura 14. Frecuencia de progenitores hematopoyéticos y de la población BMSC en médula ósea de perro mediante citometría de flujo.

A. Estrategia para definir las poblaciones de progenitores hematopoyético CD34+, CD34+CD90+ y CD34+ CD90+ c-kit+ a partir de células mononucleares de perro. B. Representación gráfica de las poblaciones de progenitores hematopoyéticos definidos por citometría de flujo. C. Estrategia empleada para la identificación de la población BMSC CD45- NGFR+ (CD271) a partir de células mononucleares.

Frecuencia de células estromales mesenquimales (BMSC) mediante ensayos de formación de colonias *in vitro*.

Una vez que se determinó la frecuencia de las BMSC *in situ* en perros evaluamos la frecuencia en muestras obtenidas por aspirado de médula ósea a través de su capacidad clonogénica mediante el ensayo de CFU-F el cual nos evalúa la capacidad de formar colonias y así evaluar su frecuencia. El conteo se realizó de las colonias totales por cada 100,000 CMN. Encontramos una frecuencia de 5.55 ± 4.55 colonias/100,000CMN (n=15) y se encontró una disminución significativa del número de colonias respecto a la edad de los perros $p=0.0176$, (Figura 16A)

Considerando la similitud entre la frecuencia de BMSC entre perros y humanos *in situ*, comparamos la capacidad clonogénica mediante este método y encontramos una diferencia estadística significativa entre el humano y el perro $p=0.0094$ (Figura 16B); al evaluar si en ambas especies había correlación entre la edad y la frecuencia de las colonias, en el caso de los perros empleando la equivalencia con la edad en humanos, encontramos una correlación negativa en ambas especies $r=-0.6433$ y $r=-0.5601$ en humanos y perros respectivamente (Figura 16C, D).

Caracterización y evaluación de la funcionalidad de las BMSC de médula ósea de perro.

La caracterización de las BMSC en perros ha sido trasladada de los criterios mínimos establecidos para muestras humanas como son la adherencia al plástico, más del 95% de la población debe expresar CD90, CD73 y CD105; mientras que menos del 2% de la población expresa CD34, CD45, CD14, CD79 o HLA (87). Además tienen un potencial de diferenciación *in vitro* multilínea. Considerando estas características caracterizamos la población BMSC de médula ósea.

Determinación del fenotipo de las BMSC de perro mediante citometría de flujo

A partir de células mononucleares de médula ósea se observó una población de células adherentes al plato de cultivo las cuales fueron expandidas para poder llevar a cabo su caracterización (Figura 12E). Para determinar su inmunofenotipo empleamos los marcadores CD45, CD29, CD44 y CD90 previamente reportados en muestras de perro mediante la técnica de citometría de flujo. Cabe mencionar que la disponibilidad de anticuerpos específicos para perro unidos a una variedad de fluorocromos es baja, por lo que hicimos tinción en dos tubos para establecer el fenotipo. En el primer tubo empleamos los marcadores CD45 acoplado a APC, CD29 acoplado a APC Cy7 y CD44 acoplado a FITC (Figura 16F), mientras que en el segundo tubo empleamos CD90 acoplado a APC, CD29 acoplado a APC

Cy7 y CD44 acoplado a FITC (Figura 16G). El único anticuerpo no específico para su uso en perros fue el CD29. En el cuadro 10 se muestran los resultados.

Cuadro 10. Resultados de la fenotipificación de BMSC de perro	
Fenotipo	Fenotipo
CD45- CD29-CD44+	CD90+ CD29+ CD44+
98.45 ± 2.11	98.98 ± 0.78

Evaluación de la capacidad de diferenciación in vitro de las BMSC de perro hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos.

Para evaluar el potencial de diferenciación a otras células como adipocitos, osteoblastos y condrocitos se cultivaron BMSC en medio específico para estimular la diferenciación. La evaluación se hizo de manera cualitativa, para el caso de células diferenciadas hacia adipocitos se empleó la tinción de rojo oleoso; hacia osteoblastos fueron evaluadas mediante la tinción de Von Kossa y para condrocitos se empleó la tinción Tricrómica de Masson. Se dio una reacción positiva de acuerdo de una escala de 1 a 3; categoría 1 si se observaba la presencia de vacuolas lipídicas (adipocitos), precipitados argénticos (osteoblastos) o se evidenciaba la presencia de fibras de colágeno tipo I (condrocitos) en menos del 20% de las BMSC; categoría de 2 si era entre 20 y 50% y categoría 3 si era mayor a 50%. Las muestras evaluadas (n=10) se diferenciaron hacia los 3 linajes observándose una mayor capacidad hacia los osteoblastos ($p < 0.0001$). En la Figura 16H, I se muestran las imágenes representativas.

Evaluación de la capacidad de proliferación in vitro en BMSC de perro

De acuerdo con estudios previos las BMSC de perro, a diferencia de las humanas, se mantienen muy poco tiempo en cultivo por lo cual evaluamos su capacidad proliferativa en cultivo a través de la técnica de doblaje poblacional (PD). Se alcanzó un tiempo en cultivo de 60 días alcanzando hasta 18 doblajes poblacionales (Figura 16J). Una vez que el doblaje poblacional fue de cero se detuvo el ensayo.

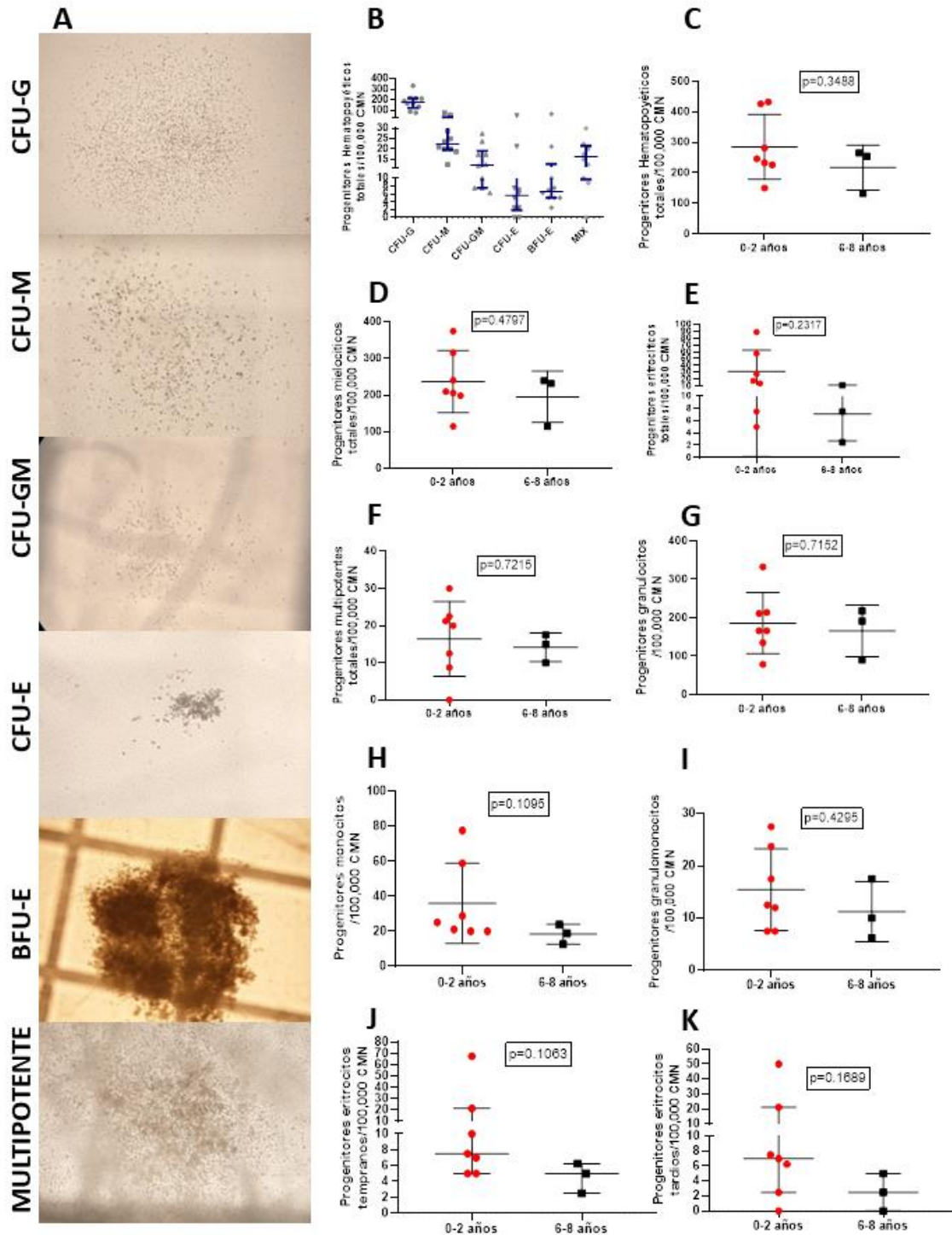


Figura 15. Identificación y evaluación de la frecuencia de progenitores hematopoyéticos mediante ensayos de formación de colonias en médula ósea de perro. A. Fotomicrografías de las colonias de progenitores en médula ósea de perro de arriba abajo CFU-G, CFU-M, CFU-GM, CFU-E, BFU-E y colonias multipotentes. B. Representación gráfica de la

comparación de la frecuencia de los progenitores hematopoyéticos totales ($p=0.34$) (C), progenitores mielocíticos totales($p=0.47$) (D), progenitores eritrocíticos totales ($p=0.23$) (E), progenitores mixtos ($p=0.72$) (F), progenitores de origen mielocítico ($p=0.71$) (G), progenitores de monocitos ($p=0.10$) (H), en progenitores bipotentes granulomonocíticos ($p=0.42$) (I), progenitores eritrocíticos tempranos ($p=0.10$) (J) y en progenitores eritrocíticos tardíos ($p=0.16$) (K). En todos los casos las es el número de colonias por cada 100,000 CMN. Prueba t no pareada.

Discusión

En este trabajo, comparamos la composición histológica, el número y distribución de las BMSC *in situ* en biopsias de médula ósea de humano, ratón y perro de diferentes grupos etarios. Fueron analizados los marcadores de BMSC de humano (CD271/NGFR) y ratón (LepR) en las tres especies. Se utilizó el software de análisis de imagen CellProfiler para determinar la frecuencia de la población de BMSC. Es importante mencionar que, en el caso de los perros este es el primer trabajo donde se reporta la población de BMSC *in situ* en médula ósea ya que no existen reportes previos.

Respecto a la composición histológica, comparamos los cambios de celularidad (médula ósea hematopoyética *versus* adiposa) entre las tres especies en diferentes etapas etarias. Se ha descrito en humanos (20), que la celularidad de la médula ósea sufre cambios conforme el individuo crece y envejece. Durante la primera década, el tejido hematopoyético representa alrededor del 80% de la celularidad, posteriormente hay una disminución en la tercera década alrededor del 50% y se mantiene así hasta la octava década donde nuevamente hay una disminución marcada. En este trabajo también encontramos que la celularidad tiene una relación inversa con la edad en humanos. En el caso de los ratones, el esternón y las costillas permanecen hematopoyéticamente activos independientemente de la edad del animal y del 70 al 80% de la médula ósea es tejido hematopoyético (18); observamos que el 100% de la médula ósea

corresponde a tejido hematopoyético desde ratones de 6 semanas hasta los de 24 meses de dos cepas diferentes. El perro es una de las principales especies de mamíferos utilizadas para la investigación biomédica como apoyo para el estudio de una variedad de enfermedades en humanos, incluyendo las hematológicas y también en ensayos clínicos de agentes quimioterapéuticos. La celularidad de la médula ósea de perro puede variar del 20% al 80% dependiendo del sitio anatómico y la edad (11). En este trabajo los cambios en celularidad observados en la médula ósea de perro fueron similares al humano.

Los cambios hematológicos que suceden con el envejecimiento han sido ampliamente reportados. A pesar de que el porcentaje de celularidad no cambia en ratones, la composición de las células si lo hace conforme el animal envejece. Se han descrito cambios en la composición de la médula ósea en ratones envejecidos, con la edad se observa un mayor número de HSC, y éstas tienden a diferenciarse hacia progenitores mielocíticos más que linfocíticos (88,89). En humanos, los cambios descritos al envejecimiento, además de la disminución de la celularidad, son el incremento en la frecuencia de HSCP CD34+ las cuales hacen mayor contacto con los adipocitos (90), disminución de la linfopoyesis e incremento de la mielopoyesis (21,91). Para comprar el efecto en el incremento de la población mieloide con la edad, se estudió la relación mieloide:eritroide (M:E) en las tres especies en diferentes grupos etarios. Observamos un incremento en el número de células de origen mielocítico en ratones gerontes; cabe señalar que en humanos y perros se observó una tendencia que no fue significativa. Sin embargo, podría deberse al número de muestras incluidas en el estudio. De acuerdo con lo reportado por Patronek (92) y Wang (86), la edad de los perros adultos incluidos en este estudio corresponde a un humano de sesenta años, edad en la que aún no se presentan cambios evidentes en la composición celular de la médula ósea, por lo que sería adecuado evaluar perros de mayor edad para verificar si en esta especie también predomina la mielopoyesis en el envejecimiento.

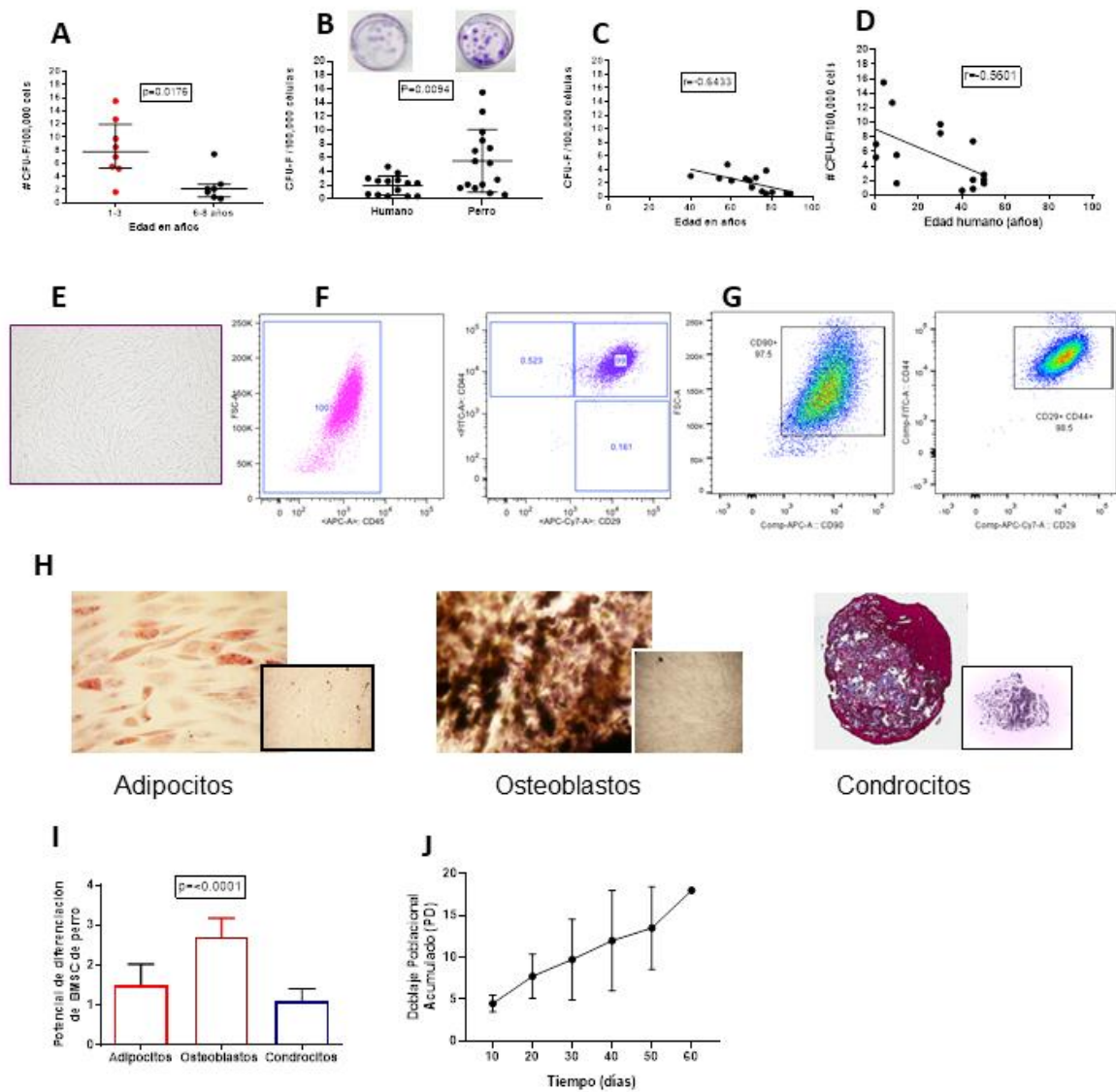


Figura 16. Frecuencia, caracterización y evaluación de la funcionalidad de las células estromales mesenquimales de médula ósea de perro.

A. Representación gráfica de la frecuencia de unidades formadoras de colonias tipo fibroblasto (CFU-F) en médula ósea, la edad mostró diferencia significativa en el número de colonias ($p=0.01$), prueba de Mann-Whitney. B. Comparación de la frecuencia de CFU-F en humanos y perros ($p=0.009$), prueba de t no pareada e imagen de las colonias en el plato de cultivo. Representación gráfica de la correlación de la edad y la frecuencia de CFU-F en humanos (C) y perros (D) que mostró una correlación negativa en ambas especies $r=-0.64$ y $r=-0.56$ respectivamente, correlación de Pearson. E. Fotomicrografía de la morfología de las BMSC en cultivo. F. Estrategia para la caracterización del fenotipo de las BMSC en cultivo con los marcadores CD45-, CD29+ y CD44+. G. Estrategia para la

caracterización del fenotipo de las BMSC en cultivo con los marcadores CD90+, CD29+ y CD44+. H. Fotomicrografías de la evaluación cualitativa del potencial de diferenciación hacia adipocitos (izq) evidenciada con rojo oleoso, osteoblastos (centro) evidenciada con tinción de Von Kossa y condrocitos (Der) evidenciada con tricrómica de Masson. I. Representación gráfica de la capacidad de diferenciación en escala con diferencia significativa hacia la diferenciación osteogénica ($p < 0.001$) Kruskal-Wallis. J. Gráfica que muestra la capacidad proliferativa de las BMSC de acuerdo a los doblajes poblacionales.

En el caso de los megacariocitos, Grover (93) reportó un incremento en el número de HSC en ratones viejos, que expresan altos niveles de genes específicos de linaje de plaquetas. Y en humanos Rundberg (94) observó que la frecuencia de la relación de progenitores megacariocito/eritrocito (MEP) incrementa con la edad, lo que podría estar relacionado también con patrones de expresión génica de las HSC. En este trabajo, el número de megacariocitos presentes por mm^2 en las biopsias de médula ósea de ratón fue significativamente mayor, respecto a los humanos y perros. Sin embargo, el número de megacariocitos en ratones viejos fue significativamente menor que en los ratones jóvenes. En las muestras de humano y perro, no encontramos cambios significativos en el número de megacariocitos con la edad. Nuestros hallazgos en ratón y humano no corresponden a lo reportado previamente (93,94); sin embargo, en nuestro trabajo la frecuencia de megacariocitos se determinó *in situ* mientras que las evidencias demuestran sobreexpresión de genes relacionados a activación de plaquetas y coagulación en las HSC envejecidas, así como un mayor número de progenitores de megacariocitos en ensayos de colonias, y no se reportó mayor celularidad en médula ósea ni secreción de trombopoyetina, el principal regulador de la trombopoyesis (93,94).

Las diferencias en el número de megacariocitos entre la médula ósea humana y la de ratón deben tenerse en cuenta al extrapolar los resultados de los modelos de ratón a los humanos ya que los megacariocitos actúan como factores extrínsecos

a las células que parecen influir en el comportamiento de las HSC y sus progenitores (45,95,96).

En el caso de los ratones, las BMSC se han identificado mediante el uso de ratones reporteros por la expresión del LepR, Nes o NG2 (33,42,53,57) Las BMSC LepR son la fuente principal de producción de SCF y CXCL12, además de ser la fuente principal de adipocitos y osteoblastos. En nuestro estudio empleando la técnica de inmunohistoquímica identificamos a la población de BMSC LepR⁺ *in situ* las cuales se distribuyen principalmente alrededor de los sinusoides. No evaluamos esta población en tejido humano y de perro ya que no contábamos con el anticuerpo específico para tales especies. Sin embargo, a nivel de evaluación de células individuales Tikhonova (55) reportó una fuerte correlación entre la firma genética de las BMSC CD271/NGFR⁺ en humanos y la población LepR en ratones.

En humanos, las BMSC expresan el NGFR o CD271 y son capaces de diferenciarse hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico, además de participar en el soporte de la hematopoyesis (59–61). En este trabajo nuestros hallazgos coinciden con lo reportado previamente en estos estudios, las BMSC de humano expresan CD271/NGFR y se encuentran cercanas a vasos sanguíneos como sinusoides y arteriolas.

La población de BMSC CD271/NGFR⁺ en el perro se ha aislado e identificado mediante separación magnética y ensayos funcionales donde se demostró su capacidad de formar colonias y diferenciarse hacia los linajes adipogénico, osteoblástico y condrogénico (84). Nuestro trabajo amplía el conocimiento sobre la población de BMSC CD271/NGFR⁺ en perro, ya que a pesar de que había sido aislada por citometría de flujo y evaluada su capacidad para diferenciarse en linajes mesenquimales (84), su morfología, distribución y frecuencia *in situ* no había sido reportada, por lo que a partir de estos datos podemos evaluar si esta población forma parte del nicho hematopoyético en perros y en condiciones patológicas evaluar los cambios en su frecuencia y distribución. La población de

BMSC CD271/NGFR+ en médula ósea de perros presenta una morfología reticular y se distribuye rodeando vasos sanguíneos como sinusoides y arteriolas; además de encontrarse en el parénquima, rodeando megacariocitos y en ocasiones rodeando trabéculas. Estos hallazgos coinciden con lo reportado en médula ósea humana, utilizando el mismo marcador (59,62,90).

Otro marcador con el que se han identificado las BMSC en humanos es CD10 también conocido como endopeptidasa neutral 24.11 (NEP24.11). Es una glucoproteína de superficie que se ha reconocido en la superficie de progenitores linfoides tempranos en la médula ósea, células B inmaduras en médula ósea, células B de los centros germinales del tejido linfoide, neutrófilos y células estromales (97). Torlakovic (2005), reportó una población de BMSCs CD10+ que se encontraban en estrecha cercanía con las células de linaje B, en todas las etapas de desarrollo; lo cual sugiere que esta puede ser una subpoblación de BMSC que participa en el nicho linfoide B (63). En el perro este marcador se ha reportado en otros tejidos como en glándula mamaria (98) y riñón (99) pero hasta ahora no había sido reportado *in situ* en médula ósea. En este trabajo reportamos la expresión de CD10 en células con características de células mesenquimales rodeando megacariocitos, algunas trabéculas, vasos sanguíneos y en parénquima, al igual que la población CD271/NGFR+. Sin embargo, también se expresó en el citoplasma de otras células como osteoblastos, por lo que no se consideró un marcador específico para la población de BMSC en esta especie, En nuestro trabajo encontramos que la expresión de CD10 tampoco es específica para las BMSC en las biopsias de humano, ya que también se expresó en células de origen hematopoyético. La expresión de CD10 en las BMSC de ratón fue muy similar a la expresión de LepR, por lo que sugiere que podría tratarse de la misma población celular o ser otra población de BMSC. CD10 no se consideró un marcador específico de la población mesenquimal en perros y humanos; sin embargo, en el caso de los ratones, se pueden llevar a cabo técnicas de doble marcaje CD10/LepR y realizar estudios funcionales de la población BMSC CD10+

para determinar sus funciones específicas y determinar la similitud con la población LepR+.

A pesar de que las BMSC en las tres especies pueden expresar distintos marcadores, la frecuencia de esta población no mostró diferencias significativas entre especies ni por grupo etario a pesar de que se ha reportado que, con la edad, la frecuencia de las BMSC puede disminuir (100). Se requieren estudios funcionales en las tres especies para descartarlo. Los estudios *in situ* como el que llevamos a cabo, tienen algunas ventajas sobre los estudios de citometría de flujo que requieren la disociación celular. Por ejemplo, la inmunomorfología que utiliza ensayos de inmunohistoquímica permite realizar análisis cualitativos y cuantitativos de la expresión de proteínas en relación con el tipo/morfología de la célula, los compartimentos subcelulares y la distribución general de diferentes tipos de células, incluidas las subpoblaciones menos frecuentes.

La *identificación in situ* de las BMSC es fundamental para determinar posibles diferencias entre especies, ya que por ahora se desconoce si la variación en los marcadores de identificación de las BMSC entre el humano y el ratón es solo de fenotipo, o si esas diferencias también radican en funcionalidad de las células como lo indican los nuevos estudios llevados a cabo en células individuales (single cells) que han permitido identificar una alta heterogeneidad en la población de BMSC (55,101). Con los resultados de este trabajo, donde demostramos que las BMSC CD271/NGFR+ de médula ósea de humanos y perros comparten la misma morfología, distribución y frecuencia, proponemos al perro como un modelo ideal para el estudio de la hematopoyesis en la especie humana.

Se ha informado que las lesiones de la médula ósea relacionadas con la osteoartritis asociadas con la degeneración quística o los defectos del cartílago suprayacente se asocian con un aumento de la densidad de células estromales de la médula CD271/NGFR+ y un perfil alterado de expresión génica de BMSC (102) y, de hecho, un subconjunto de BMSC CD271/NGFR+ parece participar en la formación de hueso nuevo en la osteoartritis avanzada (103). Las áreas de médula

ósea que evaluamos fueron, por el contrario, histológicamente normales. Sin embargo, es posible que los pacientes humanos o perros con osteoartritis puedan tener cambios sutiles en el microambiente de su médula ósea en sitios distantes de la afectación de la enfermedad.

En cuanto a la frecuencia de la población HSC, se ha reportado que estas incrementan como un cambio del efecto del envejecimiento en humanos y ratones y que en la médula ósea se favorece la mielopoyesis y disminuye la linfopoyesis (21,89). Hasta ahora no existen reportes previos en perros que demuestren tal comportamiento en las HSC de las cuales se ha definido el inmunofenotipo como Lin⁻ CD34⁺ c-kit⁺ CD90⁺ (80–82,104,105). Sin embargo hasta ahora, no se cuenta con la cantidad de anticuerpos específicos para su uso mediante citometría de flujo para el perro, por lo que en nuestro trabajo la frecuencia de la población CD34⁺ empleando un anticuerpo específico para el perro (105) mediante citometría de flujo fue menor en comparación a lo reportado por Niemeyer (81). En nuestro estudio, el número de muestras empleado podría estar teniendo influencia en la frecuencia por lo que se requiere un trabajo donde se incluyan perros de diferentes etapas etarias y determinar si al igual que en humanos y ratones la edad puede influir en la frecuencia de la población CD34.

Otra forma de determinar la frecuencia de progenitores hematopoyético es mediante los ensayos de formación de colonias. En humanos y ratones se ha descrito un compromiso hacia cierto linaje que va cambiado con la edad (21), sin embargo, no se han encontrado diferencias en cuanto a la frecuencia de progenitores en diferentes etapas etarias (90). En este trabajo determinamos la frecuencia de los progenitores a partir de células mononucleares cultivadas en metilcelulosa y suplementado con las citocinas requeridas como se ha descrito (80–82). Al hacer el análisis respecto a dos grupos etarios no encontramos diferencias en el número de colonias, lo cual es similar a lo reportado en humanos. Estos resultados sugieren que en el perro, la frecuencia de progenitores *in vitro* no cambia con la edad como se ha reportado en humanos.

La frecuencia de la población de BMSC en perros a partir de células mononucleares de médula ósea mediante citometría de flujo solo se ha reportado en un estudio donde se busca el uso de dicha población con fines terapéuticos y a partir de una población CD271/NGFR+ obtenida mediante separación de columnas magnéticas (84). Nuestro estudio es pionero en la determinación de la frecuencia de BMSC en células mononucleares a partir de aspirados de médula ósea y tomando en cuenta la población CD45-CD271/NGFR+ para determinar su participación en la regulación de la hematopoyesis en perros; sin embargo, el método de obtención podría influir en la frecuencia y el número de muestras empleadas es bajo, por lo que este trabajo podría complementarse con más muestras y determinar si la edad y posiblemente el método de muestreo tienen efecto en la frecuencia de dicha población.

En los últimos años, incluida la medicina veterinaria, se ha dado énfasis a la terapia regenerativa a partir de células mesenquimales obtenidas de diferentes fuentes como médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical y placenta. Sin embargo, su función en la regulación de la hematopoyesis ha sido menos explorada.

La sociedad internacional de terapia celular (ISCT) ha definido estándares para definir a las BMSC humanas como células que se adhieren al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar, el 95 % de la población de BMSC debe expresar CD105, CD73 y CD90 y carecer de la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA clase II, y finalmente, las BMSC deben diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos en condiciones estándar de diferenciación in vitro (87). En medicina veterinaria no se han definido tales criterios, pero se han tomado como referencia los descritos en humanos. En este trabajo a partir de células mononucleares de médula ósea identificamos la población de BMSC y mediante ensayos para evaluar su capacidad clonal encontramos que hay una disminución en la capacidad de formación de colonias en animales de mayor edad, lo que podría sugerir que si la frecuencia de estas

células no cambia con la edad, la función si podría estar alterada. Nuestros resultados no concuerdan con lo reportado por Bertolo (106), quien no encontró diferencias en la frecuencia de colonias donde incluyó 6 razas diferentes entre 4 y 7 años, lo que pudiera estar influido por las razas incluidas en dicho estudio y porque las edades de los perros incluidos en ese estudio corresponde únicamente al grupo de adultos de nuestro estudio y no hay animales en edad pediátrica. Datos en un estudio del mismo grupo donde se compararon las BMSC de humano y perro concuerdan con que el perro presenta un mayor número de colonias aunque en este estudio no se reportaron las edades de ambas especies (106).

Otra característica de las BMSC es su capacidad de diferenciación hacia otros linajes, en nuestra evaluación cualitativa encontramos que todas las muestras conservaron esta función. Sin embargo, en nuestro estudio no comparamos grupos etarios y solo fue una evaluación cualitativa, por lo que sería necesario evaluarlo en un mayor número de muestras y además determinarlo mediante un método cuantitativo o mediante expresión de genes asociados como se ha hecho en trabajos previos (107–110). La especie o la raza también pueden influir en la capacidad de diferenciación a ciertos linajes, como se ha descrito previamente (106), donde la capacidad osteogénica es más alta que la condrogénica o adipogénica entre 6 razas distintas.

En humanos, Aguilar–Navarro (90) no encontró diferencias en la capacidad de diferenciación en dos grupos etarios, sin embargo, este estudio no incluyo muestras pediátricas lo que podría tener un efecto en la capacidad de diferenciación en especies como la canina; en otro estudio, donde compararon ambas especies reportaron una menor capacidad condrogénica en los perros mediante evaluación cualitativa por una menor densidad de tinción con Azul alciano (106).

Uno de los principales obstáculos es la disponibilidad de anticuerpos específicos para el perro o que tengan reacción cruzada y la importancia de identificar esta población de manera adecuada debido a su uso cada vez mayor en áreas de

aplicación clínica. Los criterios de expresión de antígenos de superficie utilizados por el ISCT para identificar las BMSC humanas pueden no ser adecuados para caracterizar las BMSC en especies como la canina. En este trabajo empleando marcadores previamente empleados en perros determinamos su fenotipo.

Conclusiones

Existen diferencias significativas en la micro arquitectura de la médula ósea trabecular entre especies, siendo la médula ósea humana significativamente más parecida a la de un perro que a la de un ratón en términos de celularidad y contenido de megacariocitos y adipocitos (Figura 17). Este estudio también destaca que entre diferentes cepas de ratones puede haber diferencias en aspectos clave como el contenido de megacariocitos. Las diferencias en el contenido de adipocitos y megacariocitos en los ratones deben tenerse en cuenta y explorarse más a fondo. En general, nuestro estudio sugiere que la médula ósea del perro posee características similares a la humana en comparación a la médula ósea murina.

Nuestros hallazgos indican que en el perro existe un nicho reticular hematopoyético caracterizado por la presencia de BMSC identificadas por la expresión de CD271 y cuya densidad y distribución es similar al humano, por lo que esta población podría tener un papel relevante tanto en la homeostasis de la hematopoyesis en perros, como en el posible desarrollo o mantenimiento de neoplasias hematopoyéticas como se ha demostrado en humanos. Por lo que el perro podría ser empleado como modelo en el desarrollo, mantenimiento y tratamiento de neoplasias hematopoyéticas.

Perspectivas.

1. Realizar ensayos de co-cultivos de MSC con HSCP de muestras de médula ósea de perro para determinar la participación en el mantenimiento de la hematopoyesis por parte de las HSC.
2. Determinar la secreción de citocinas producidas por la población BMSC
3. Realizar ensayos funcionales de la población BMSC CD271⁺ en perros

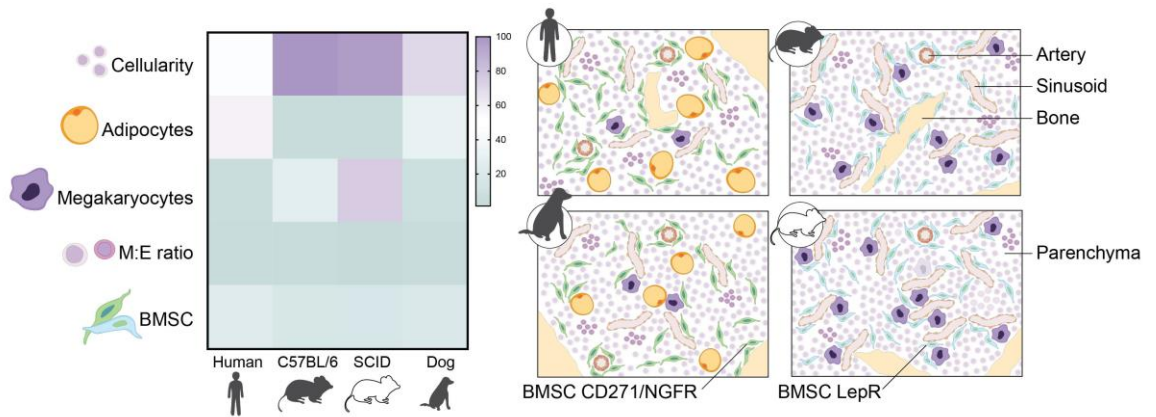


Figura 17. Modelo de médula ósea humana, de ratón (C57B/6 y SCID) y de perro. Representación esquemática de la frecuencia (panel izquierdo) y distribución (panel derecho) de células estromales de médula ósea (BMSC) en el parénquima, áreas trabeculares, vasculares y ubicación perimegacariocítica.

Referencias

1. Lording PM. Erythrocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2008 ;24(2):225-37.
2. Carrick JB, Begg AP. Peripheral Blood Leukocytes. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2008;24(2):239-59.
3. Malara A, Abbonante V, Di Buduo CA, Tozzi L, Currao M, Balduini A. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(8):1517-36. doi.org/10.1007/s00018-014-1813-y
4. Dzierzak E, Bigas A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell*. 2018;22(5):639-51.
5. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. septiembre de 2017;17(9):573-90.
6. Tavassoli M. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells*. 1991;17(2):269-81; 282-286.
7. Golub R, Cumano A. Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2013 ;51(4):226-31.
8. Frame JM, McGrath KE, Palis J. Erythro-myeloid progenitors: “Definitive” hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* .2013;51(4):220-5.
9. Al-Drees MA, Yeo JH, Boumelhem BB, Antas VI, Brigden KWL, Colonne CK, et al. Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny. *Stem Cells Int*. 2015;2015:571893.
10. Car BD, Eng VM. Special Considerations in the Evaluation of the Hematology and Hemostasis of Mutant Mice. *Vet Pathol*. 2001;38(1):20-30.
11. Defarges A, Abrams-Ogg A, Foster RA, Bienzle D. Comparison of sternal, iliac, and humeral bone marrow aspiration in Beagle dogs. *Veterinary Clinical Pathology*. 2013;42(2):170-6.
12. Abkowitz JL, Catlin SN, McCallie MT, Gutterop P. Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood*. 2002;100(7):2665-7.
13. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research*. 2003;34(6):461-75.
14. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-21.

15. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016 ;351(6269):aab2116.
16. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* 2012;10(2):120-36.
17. Iwasaki H, Akashi K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*. 2007;26(47):6687-96.
18. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):548-65.
19. Mouloupoulos LA, Koutoulidis V. Normal Bone Marrow: Anatomy, Function, Conversion, and Reconversion. En: Mouloupoulos LA, Koutoulidis V, editores. *Bone Marrow MRI: A Pattern-Based Approach*. 2015. p. 1-6.
20. Hartsock RJ, Smith EB, Petty CS. NORMAL VARIATIONS WITH AGING OF THE AMOUNT OF HEMATOPOIETIC TISSUE IN BONE MARROW FROM THE ANTERIOR ILIAC CREST. A STUDY MADE FROM 177 CASES OF SUDDEN DEATH EXAMINED BY NECROPSY. *Am J Clin Pathol*. abril de 1965;43:326-31.
21. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13 de diciembre de 2011;108(50):20012-7.
22. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9194-9.
23. Bolliger AP. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. *Veterinary Clinical Pathology* . 2004;33(2):58-67.
24. Layssol-Lamour CJ, Sarry JE, Braun JPD, Trumel C, Bourgès-Abella NH. Reference Values for Hematology, Plasma Biochemistry, Bone Marrow Cytology and Bone Histology of NOD scid Immunodeficient Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2021;60(1):4-17.
25. Mazzaccara C, Labruna G, Cito G, Scarfò M, De Felice M, Pastore L, et al. Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, Mouse Strains. *Blagosklonny MV*, editor. *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3772.
26. O'Connell KE, Mikkola AM, Stepanek AM, Vernet A, Hall CD, Sun CC, et al. Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research. *Comp Med* . 2015;65(2):96-113.
27. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.

28. Cuminetti V, Arranz L. Bone Marrow Adipocytes: The Enigmatic Components of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *J Clin Med*. 18 de mayo de 2019;8(5).
29. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-41.
30. Fazeli PK, Horowitz MC, MacDougald OA, Scheller EL, Rodeheffer MS, Rosen CJ, et al. Marrow Fat and Bone—New Perspectives. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013;98(3):935-45.
31. Gomariz A, Isringhausen S, Helbling PM, Nombela-Arrieta C. Imaging and spatial analysis of hematopoietic stem cell niches. *Ann N Y Acad Sci*. 2020;1466(1):5-16.
32. Tjin G, Flores-Figueroa E, Duarte D, Straszkowski L, Scott M, Khorshed RA, et al. Imaging methods used to study mouse and human HSC niches: Current and emerging technologies. *Bone*. 2019;119:19-35.
33. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 2013;502(7473):637-43.
34. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra CN, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015;526(7571):126-30.
35. Guezguez B, Campbell CJV, Boyd AL, Karanu F, Casado FL, Di Cresce C, et al. Regional Localization within the Bone Marrow Influences the Functional Capacity of Human HSCs. *Cell Stem Cell*. 2013;13(2):175-89.
36. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218-21.
37. Flores-Figueroa E, Gratzinger D. Beyond the Niche: Myelodysplastic Syndrome Topobiology in the Laboratory and in the Clinic. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(4):553.
38. Xie T, Spradling AC. A Niche Maintaining Germ Line Stem Cells in the Drosophila Ovary. *Science*. 2000;290(5490):328-30.
39. Greenbaum A, Hsu YMS, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013;495(7440):227-30.
40. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-99.

41. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):154-68.
42. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34.
43. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. 2014;20(11):1315-20.
44. Heazlewood SY, Neaves RJ, Williams B, Haylock DN, Adams TE, Nilsson SK. Megakaryocytes co-localise with hemopoietic stem cells and release cytokines that up-regulate stem cell proliferation. *Stem Cell Research*. 2013;11(2):782-92.
45. Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Fujioka M, Suda T. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454(2):353-7.
46. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal Tissue Macrophages Are Intercalated throughout Human and Mouse Bone Lining Tissues and Regulate Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *J Immunol* . 2008;181(2):1232-44.
47. Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(2):261-71.
48. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*. 2010;116(23):4815-28.
49. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-63.
50. Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. 2017;19(8):28.
51. van Pel M, Fibbe WE, Schepers K. The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? 2015;10.
52. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004;103(9):3258-64.

53. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457-62.
54. Dolgalev I, Tikhonova AN. Connecting the Dots: Resolving the Bone Marrow Niche Heterogeneity. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:622519.
55. Tikhonova AN, Dolgalev I, Hu H, Sivaraj KK, Hoxha E, Cuesta-Domínguez Á, et al. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature*. 2019;569(7755):222-8.
56. Tikhonova AN, Lasry A, Austin R, Aifantis I. Cell-by-Cell Deconstruction of Stem Cell Niches. *Cell Stem Cell*. 2020 ;27(1):19-34.
57. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231-5.
58. Corselli M, Chin CJ, Parekh C, Sahaghian A, Wang W, Ge S, et al. Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. 2013;121(15):2891-901.
59. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab Invest*. 2012;92(9):1330-41.
60. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental Hematology*. 2002;30(7):783-91.
61. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
62. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schütz B, Ehinger M, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*. 2011;117(19):5067-77.
63. Torlakovic E, Tenstad E, Funderud S, Rian E. CD10+ stromal cells form B-lymphocyte maturation niches in the human bone marrow. *J Pathol*. 2005;205(3):311-7.
64. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392-402.
65. Breen M, Modiano JF. Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans – man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Res*. 2008;16(1):145-54.
66. Hoffman JM, Creevy KE, Franks A, O’Neill DG, Promislow DEL. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell*. 2018;17(3):e12737.

67. Kornegay JN. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*. 2017;7(1):9.
68. Lozier JN, Dutra A, Pak E, Zhou N, Zheng Z, Nichols TC, et al. The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99(20):12991-6.
69. Catchpole B, Kennedy LJ, Davison LJ, Ollier WER. Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. *Journal of Small Animal Practice*. 2008;49(1):4-10.
70. Simpson S, Dunning MD, de Brot S, Grau-Roma L, Mongan NP, Rutland CS. Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2017;59(1):71.
71. Pawlak A, Obmińska-Mrukowicz B, Rapak A. [The dog as a model for comparative studies of lymphoma and leukemia in humans]. *Postepy Hig Med Dosw*. 2013;67:471-80.
72. McCoy AM. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol*. 2015;52(5):803-18.
73. Thomas ED, Ashley CA, Lochte HL, Jaretzki A, and ODS, Ferrebee JW. Homografts of Bone Marrow in Dogs After Lethal Total-Body Radiation. *Blood*. 1959;14(6):720-36.
74. Imren S, Zhang XB, Humphries RK, Kiem HP. Insights into leukemia-initiating cell frequency and self-renewal from a novel canine model of leukemia. *Experimental Hematology*. 2011;39(1):124-32.
75. Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: a review. *Hematological Oncology*. 2013;31(1):1-9.
76. Guzman ML, Rossi RM, Neelakantan S, Li X, Corbett CA, Hassane DC, et al. An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*. 2007;110(13):4427-35.
77. Baron MH. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. *Experimental Hematology*. 2003;31(12):1160-9.
78. Stacy NI, Harvey JW. Bone Marrow Aspirate Evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2017;47(1):31-52.
79. Raskin RE, Messick JB. Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications, Technique, and Evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2012;42(1):23-42.
80. Neuner E, Schumm M, Schneider EM, Guenther W, Ellwart J, Kremmer E, et al. Immune phenotype of canine hematopoietic progenitor cells. *Tissue Antigens*. 1997;50(5):466-74.

81. Niemeyer GP, Hudson J, Bridgman R, Spano J, Nash RA, Lothrop CD. Isolation and characterization of canine hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 2001;29(6):686-93.
82. Wijewardana V, Sugiura K, Shigeyama N, Moriguchi M, Tsunoda S, Ikehara S, et al. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor cells in canine bone marrow. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115(3-4):230-8.
83. Klein AK, Lynch JA, Dyck JA, Shimizu JA, Fox LA, Stitzel KA. The influence of fibroblast-like cells derived from canine fetal hematopoietic tissues on the regulation of lymphohematopoiesis. *Int J Cell Cloning.* 1984;2(1):20-33.
84. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Okada H, Wada-Maeda M, Nakamura A, et al. Long-term Engraftment of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells That Differentiate to Form Myogenic Cells in Dogs With Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy.* 2012;20(1):168-77.
85. Ortiz-Hidalgo C. Interpretación de la biopsia de médula ósea: el informe histopatológico básico, actualizado Correspondencia Bone marrow biopsy interpretation: The basic histopathological report, updated. *Patología Revista Latinoamericana. Revista latinoamericana de patología.* 2017;5555:52-7352.
86. Wang T, Ma J, Hogan AN, Fong S, Licon K, Tsui B, et al. Quantitative Translation of Dog-to-Human Aging by Conserved Remodeling of the DNA Methylome. *Cell Syst.* 2020;11(2):176-185.e6.
87. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
88. Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging Hematopoietic Stem Cells Decline in Function and Exhibit Epigenetic Dysregulation. Dillin A, editor. *PLoS Biol* 2007;5(8):e201.
89. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-Associated Characteristics of Murine Hematopoietic Stem Cells. *Journal of Experimental Medicine.* 2000;192(9):1273-80.
90. Aguilar-Navarro AG, Meza-León B, Gratzinger D, Juárez-Aguilar FG, Chang Q, Ornatsky O, et al. Human Aging Alters the Spatial Organization between CD34+ Hematopoietic Cells and Adipocytes in Bone Marrow. *Stem Cell Reports.* 2020;15(2):317-25.
91. Nilsson AR, Soneji S, Adolfsson S, Bryder D, Pronk CJ. Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. *PLOS ONE.* 2016;11(7):e0158369.
92. Patronek GJ, Waters DJ, Glickman LT. Comparative Longevity of Pet Dogs and Humans: Implications for Gerontology Research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences.* 1997;52A(3):B171-8.

93. Grover A, Sanjuan-Pla A, Thongjuea S, Carrelha J, Giustacchini A, Gambardella A, et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. *Nat Commun.* 2016;7(1):11075.
94. Rundberg Nilsson A, Soneji S, Adolfsson S, Bryder D, Pronk CJ. Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158369.
95. Gorelashvili MG, Angay O, Hemmen K, Klaus V, Stegner D, Heinze KG. Megakaryocyte volume modulates bone marrow niche properties and cell migration dynamics. *Haematologica.* 2020;105(4):895-904.
96. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2014;20(11):1321-6.
97. Kalled SL, Siva N, Stein H, Reinherz EL. The distribution of CD10 (NEP 24.11, CALLA) in humans and mice is similar in non-lymphoid organs but differs within the hematopoietic system: absence on murine T and B lymphoid progenitors. *European Journal of Immunology* 1995;25(3):677-87.
98. Sánchez-Céspedes R, Suárez-Bonnet A, Millán Y, Guil-Luna S, Reymundo C, Herráez P, et al. Use of CD10 as a marker of canine mammary myoepithelial cells. *The Veterinary Journal* . 2013;195(2):192-9.
99. Immunohistochemical Characterization of 13 Canine Renal Cell Carcinomas - R. M. Gil da Costa, J. P. Oliveira, A. L. Saraiva, F. Seixas, F. Faria, F. Gärtner, M. A. Pires, C. Lopes, 2011 .
100. Gorskaya YuF, Danilova TA, Nesterenko VG. Age-Associated Reduction of the Count and Functional Activity of Stromal Precursor Cells Can Be Caused by Both True Reduction (Exhaustion) of Cell Pool and Regulatory Effects of the Organism. *Bull Exp Biol Med.* 2011;151(2):210-4.
101. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, et al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell.* 2019;177(7):1915-1932.e16.
102. Campbell TM, Churchman SM, Gomez A, McGonagle D, Conaghan PG, Ponchel F, et al. Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology* . 2016;68(7):1648-59.
103. Ilas DC, Baboolal TG, Churchman SM, Jones WG, Giannoudis PV, Bühring HJ, et al. The osteogenic commitment of CD271+CD56+ bone marrow stromal cells (BMSCs) in osteoarthritic femoral head bone. *Sci Rep.* 2020;10(1):11145.

104. Abkowitz JL, Persik MT, Shelton GH, Ott RL, Kiklevich JV, Catlin SN, et al. Behavior of hematopoietic stem cells in a large animal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995;92(6):2031-5.
105. McSweeney PA, Rouleau KA, Wallace PM, Bruno B, Andrews RG, Krizanac-Bengez L, et al. Characterization of Monoclonal Antibodies That Recognize Canine CD34. *Blood*. 1998;91(6):1977-86.
106. Bertolo A, Steffen F, Malonzo-Marty C, Stoyanov J. Canine Mesenchymal Stem Cell Potential and the Importance of Dog Breed: Implication for Cell-Based Therapies. *Cell Transplant*. 2015;24(10):1969-80.
107. Filioli Uranio M, Valentini L, Lange-Consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'Abbate A, et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Molecular Reproduction and Development* 2011;78(5):361-73.
108. Screven R, Kenyon E, Myers MJ, Yancy HF, Skasko M, Boxer L, et al. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2014;161(1):21-31.
109. Takemitsu H, Zhao D, Yamamoto I, Harada Y, Michishita M, Arai T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*. 2012;8(1):150.
110. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. *Cell Transplant* 2010;19(3):279-89.

Anexos

Anexo 1. Consentimiento verbal humanos



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Coordinación de Investigación en Salud
Comisión Nacional de Investigación Científica
Comisión de Ética

Ejemplo de guión para solicitar consentimiento verbal para participar en el estudio de investigación titulado: : **Estudio comparativo del nicho hematopoyético reticular de la médula ósea murina y humana.**

Buenos días (tardes), mi nombre es _____ y quiero hacerle una invitación para participar en un proyecto de investigación que se está llevando a cabo en el laboratorio de nicho y microambiente en la unidad de investigación medica en enfermedades oncológicas de nuestra institución. El objetivo de este proyecto es conocer si la edad y el tipo de hueso influyen en la producción de las células de la sangre. Las células de la sangre son producidas dentro de sus huesos (médula ósea), ahí se desarrollan en un ambiente especial, el cual estamos interesados en saber si se ve afectado con la edad, o con el tipo de hueso. Al igual que a usted, se están invitando a 30 personas más a participar.

Si usted acepta, su participación consistirá en donar los fragmentos de cabeza de fémur ó rodilla que le son retirados durante su cirugía y realizarle un raspado superficial del hueso que se encuentra expuesto.

Su participación no implica riesgo alguno, ya que este estudio NO requiere ningún procedimiento adicional a su cirugía y se protegerá la confidencialidad de la muestra y usted no será contactado por los investigadores. Requerimos de su autorización para que una parte de su muestra sea enviada al Laboratorio del Dr. John Dick en Canadá, para realizar experimentos que no pueden ser realizados en nuestra institución por no contar con la infraestructura necesaria.

Es importante que sepa que usted no obtendrá beneficios directos por su participación en el estudio, pero es posible que los resultados de esta investigación contribuyan para conocer sobre la forma en que son producidas las células de la sangre.

La participación en este estudio es voluntaria, si usted acepta participar, toda la información que se obtenga de su persona será confidencial, y solamente será utilizada para los fines de la investigación.

Anexo 2

Consentimiento verbal perros



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Coordinación de investigación en salud
Comisión Nacional de Investigación Científica
Comisión de ética

Solicitud de consentimiento verbal

Buenos días (tardes), mi nombre es Asela Berenice Meza León y quiero hacerle una invitación para que el perro que está bajo su tutoría participe en un proyecto de investigación que se está llevando a cabo en el laboratorio de nicho y microambiente en la unidad de investigación médica en enfermedades oncológicas de esta institución. El objetivo de este proyecto es conocer si la edad, y la especie influyen en la producción de las células de la sangre. Las células de la sangre son producidas dentro de los huesos (médula ósea), ahí se desarrollan en un ambiente especial el cual estamos interesados en evaluar en esta especie. Al igual que usted se está invitando a 30 tutores más a participar.

Si usted acepta, la participación consistirá en donar los fragmentos de cabeza de fémur que se le retiraran a su perro durante la cirugía / obtener una muestra de médula ósea durante la cirugía.

La participación de su perro no implica riesgo alguno ya que este estudio NO requiere ningún procedimiento adicional a la cirugía y se protegerá la confidencialidad de la muestra.

También es importante que sepa que usted o su perro no obtendrán beneficios directos por su participación en el estudio, pero es posible que los resultados de esta investigación contribuyan para conocer sobre la forma en que son reguladas las células de la sangre en esta especie.

La participación es voluntaria, si usted acepta la participación de su perro, toda la información que se obtenga será confidencial y solamente será utilizada para los fines de la investigación.