



00346  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"EL PAPEL DEL MICROAMBIENTE  
HEMATOPOYÉTICO EN LA FISIOPATOLOGÍA  
DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**(BIOLOGÍA CELULAR)**

**P R E S E N T A:**

**EUGENIA FLORES FIGUEROA**

Director: Dr. Héctor Mayani Viveros



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# AGRADECIMIENTOS

A Dios,

A mis padres Humberto y Josefina por todo su amor, su inmenso apoyo y su confianza en mí,

A mis hermanos Román, Norma, Carlos y Pancho por todo su cariño, su apoyo y su ejemplo,

A Vicente por estar siempre a mi lado, por comprender y apoyar mi carrera y sobre todo por todo su amor,

A mi asesor Dr. Héctor Mayani por guiarme en cada paso de este largo camino de la investigación, por creer en mí y por todo el apoyo que siempre me brindó,

A todos los miembros de mi comité tutorial por sus comentarios y sugerencias,

A Juan José Montesinos por toda la ayuda que me brindó en la realización de este trabajo, por nuestras discusiones científicas y no científicas y muy especialmente por su amistad,

A Patricia Flores (paty) y a Guadalupe Martínez (lupita) por su grandísima ayuda en el laboratorio, especialmente cada vez que estaba en San Francisco (lo cual fue muy frecuente), por su apoyo y su amistad,

A Ignacio Valencia (nachito) por su inmenso apoyo técnico y Fernando Luna por todos estos años en el laboratorio compartiendo muchas vivencias,

A Margarita Gutiérrez, Alejandra Huerta, Laura Espinosa y Elizabeth Sánchez por haber compartido conmigo su experiencia, sus conocimientos y su amistad,

A los doctores Guillermo Gutiérrez, Enrique Gómez y Elizabeth Sánchez por proporcionarme las muestras de pacientes y de médula ósea normal y porque sin ustedes no hubiera sido posible realizar este trabajo,

Muy especialmente a mis amigos, Mónica Madrigal, Alfredo Hidalgo, Iván Martínez, Ricardo López, Luis Calderilla y Alejandra deVila,

A todos los integrantes de la unidad de investigación en enfermedades oncológicas del Hospital de Oncología, CMN Siglo XXI, IMSS.

Muy especialmente dedico mi tesis a todos los pacientes con Síndrome Mielodisplásico que a través de este trabajo menciono como "muestras" y cuyas iniciales aparecen en la tabla 1. No me olvido que son personas de carne y hueso, que tienen una familia, y una enfermedad a la que lamentablemente la medicina actual no puede ofrecerles muchas alternativas. Es por ello que espero que este trabajo sirva para interesar a más estudiantes en el estudio de esta enfermedad, porque creo firmemente que su estudio básico llevara a la creación de nuevas y mejores terapias.

# INDICE

<b>Introducción</b> .....	1
I. Células sanguíneas .....	1
II. Hematopoyesis y órganos hematopoyéticos .....	3
III. Células hematopoyéticas .....	3
3.1 Organización estructural del sistema hematopoyético .....	3
3.2 Células seminales hematopoyéticas .....	5
3.3 Progenitores hematopoyéticos .....	6
3.4 Precursores reconocibles por su morfología .....	7
IV. Microambiente Hematopoyético .....	8
4.1. Componentes del microambiente hematopoyético .....	10
4.2 Componente celular .....	10
4.2.1 Células del estroma .....	10
4.2.2 Células accesorias .....	12
4.3 Componente protéico .....	12
4.3.1 Citocinas .....	12
4.3.2 Matriz Extracelular .....	22
V. Interacciones en el microambiente hematopoyético .....	25
5.1. Contacto entre células hematopoyéticas y células del estroma ....	25
5.2. Interacción entre células hematopoyéticas y las moléculas de la matriz extracelular .....	28
5.3. Producción y secreción de citocinas tanto solubles como unidas a células del estroma .....	29
VI. Apoptosis en el sistema hematopoyético .....	30
VII. Síndromes Mielodisplásicos .....	32
7.1. Historia .....	32
7.2 Clasificación .....	32
7.3. Características clínicas y diagnóstico .....	33
7.4. Factores pronósticos .....	35
7.5. Historia natural y complicaciones clínicas .....	36
7.6. Tratamiento .....	36
7.7. Fisiopatología de los Síndromes Mielodisplásicos.....	37
<b>Antecedentes</b> .....	39
<b>Planteamiento del problema</b> .....	44
<b>Objetivo General</b> .....	44
<b>Objetivos Particulares</b> .....	44

<b>Metodología</b> .....	45
Obtención de muestras .....	48
Obtención de células mononucleadas .....	48
Conteo de células .....	48
Cuantificación de progenitores hematopoyéticos .....	49
Conteo de colonias .....	50
Cuantificación de progenitores de fibroblastos .....	51
Cultivo líquido de médula ósea a largo plazo .....	52
Separación de fibroblastos y macrófagos .....	53
Metodología para separar células CD34+ .....	54
Metodología para medir apoptosis por TUNEL .....	56
Metodología para medir proliferación celular por incorporación de Bromodeoxi-uridina .....	57
Técnica de inmunocitoquímica .....	59
Técnica para la detección de fosfatasa alcalina .....	61
Kit de ELISA para medir interleucina 6 .....	62
Kit de ELISA para medir el factor estimulador de células Seminales .....	63
Kit de ELISA para medir el factor de necrosis tumoral alfa .....	64
Estadística .....	65
 <b>Resultados y Discusión</b> .....	 66
I. Pacientes .....	66
II. Evaluación del microambiente hematopoyético estudiando la capa de estroma en cultivos líquidos a largo plazo tipo-Dexter .....	68
III. Evaluación del microambiente hematopoyético utilizando cultivos de subpoblaciones enriquecidas de fibroblastos y macrófagos...	82
 <b>Conclusiones</b> .....	 102
 <b>Perspectivas</b> .....	 104
 <b>Bibliografía</b> .....	 105

# ABREVIATURAS

(I): por sus siglas en inglés

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEC: actividad estimuladora de colonias

AR: anemia refractaria

ARS: anemia refractaria con sideroblastos

AREB: anemia refractaria con exceso de blastos

AREB-t: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

ARN: ácido ribonucleico

BFU-E: (I) unidad formadora de brote eritroide

BMT: (I) trasplante de médula ósea

CFU: (I) unidad formadora de colonias

CFU-E: (I) unidad formadora de colonias eritroides

CFU-F: (I) unidad formadora de colonias de fibroblastos

CFU-G: (I) unidad formadora de colonias de granulocitos

CFU-M: (I) unidad formadora de colonias de macrófagos

CFU-MIX: (I) unidad formadora de colonias mixtas

CFU-S: (I) unidad formadora de colonias en el bazo

CH: células hematopoyéticas

CMN: células mononucleares

CMV: citomegalovirus

CSH: células seminales hematopoyéticas

DAB: diaminobenzidina

DD: (I) dominio de muerte

DED: (I) dominio efector de muerte

EGRF: (I) receptor del factor de crecimiento epidermal

Epo: (I) eritropoyetina

Fb: fibroblastos

FBS: (I) suero fetal bovino

GAG: glicosaminoglicanos

G-CSF: (I) factor estimulador de colonias de granulocitos

GM-CSF: (I) factor estimulador de colonias de granulo-monocitos

HPP-CFC: (I) célula formadora de colonias de alto potencial

HS: (I) suero de caballo

ICH: inmunocitoquímica

IFN- $\alpha$ : (I) interferón alfa

IFN- $\gamma$ : (I) interferón gama

IL-1: interleucina uno

IL-1  $\beta$ : interleucina uno beta

IL-2: interleucina dos

IL-3: interleucina tres

IL-4: interleucina cuatro

IL-5: interleucina cinco

IL-6: interleucina seis

IL-8: interleucina ocho

IL-10: interleucina diez

IMDM: (I) medio de Dulbecco modificado por Iscove

IPSS: (I) sistema internacional de pronóstico y clasificación

LIF: (I) factor inhibidor de leucemia  
Lin: linaje  
LMA: leucemia mieloide aguda  
LMC: leucemia mieloide crónica  
LMMC: leucemia mielomonocítica crónica  
LPS: lipopolisacáridos  
LTC-IC: (I) células iniciadoras de cultivos a largo plazo  
LTMC: (I) cultivo a largo plazo tipo Dexter  
MC: medio condicionado  
MEC: matriz extracelular  
MH: microambiente hematopoyético  
MHC: (I) complejo mayor de histocompatibilidad  
MIP: (I) proteína inflamatoria de macrófagos  
MO: médula ósea  
MON: médula ósea normal  
mQ: macrófagos  
PBS: (I) buffer salino de fosfatos  
PCR: (I) reacción en cadena de la polimerasa  
PFC: progenitores formadores de colonias  
RT-PCR: (I) retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa  
SCF: (I) factor estimulador de células seminales  
SDS: síndrome de diamond-schachmand  
SMD: síndromes mielodisplásicos  
SP: sangre periférica  
SRC: (I) células repobladoras de ratones SCID  
TdT: (I) transferasa terminal  
TGF- $\beta$ : (I) factor de crecimiento transformante beta  
TNF- $\alpha$ : (I) factor de necrosis tumoral alfa

## RESUMEN

Los Síndromes Mielodisplásicos se definen como alteraciones primarias neoplásicas de las células seminales hematopoyéticas que en una elevada proporción de los casos se transforman a leucemia mieloide aguda. Se caracterizan por citopenias en sangre periférica y cambios displásicos en la médula ósea. Los Síndromes Mielodisplásicos son uno de los padecimientos hematológicos que más retos han presentado para el hematólogo debido a su difícil diagnóstico y terapia.

Reportes previos han demostrado que en el microambiente hematopoyético de estos pacientes existe una sobreproducción de citocinas inhibitorias, una disminución en la secreción de citocinas estimuladoras y un incremento en la apoptosis. Estos estudios, sin embargo se han realizado utilizando capas de estroma totales, por lo que no ha sido posible distinguir qué elemento(s) del microambiente se encuentra(n) alterados.

Por lo anterior en el presente estudio se trabajó con subpoblaciones aisladas de células del estroma: fibroblastos y macrófagos. Se evaluó la funcionalidad de estas células del estroma tanto de forma cuantitativa (proliferación y apoptosis) como cualitativa (niveles de tres citocinas: factor estimulador de células seminales, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina seis; y el efecto de su medio condicionado).

Gracias al diseño experimental del presente estudio, podemos concluir que existe una producción alterada de citocinas por parte de las capas enriquecidas de fibroblastos de pacientes con síndrome mielodisplásico. Es posible que esta alteración en las células del estroma puede contribuir al desarrollo y progresión de la enfermedad, confiriendo una ventaja en el crecimiento de las células transformadas; lo que conlleva a la transformación leucémica.



# INTRODUCCION

## I. CÉLULAS SANGUINEAS

La sangre contiene una gran variedad de células, las cuales realizan diversas funciones. Las células de la sangre pueden ser clasificadas en tres grupos: las células rojas, las células blancas y las plaquetas (Beutler<sup>a,b</sup> 1995).

Las células rojas o **eritrocitos** intervienen en los mecanismos de intercambio de gases, transportando oxígeno a los tejidos y bióxido de carbono de los tejidos a los pulmones. Son las células más abundantes en la sangre y tienen una vida media de ~120 días (Beutler<sup>a,b</sup> 1995).

Dentro del grupo de las células blancas o **leucocitos** encontramos una amplia gama tanto de células como de funciones. Los cinco tipos de leucocitos representan dos familias. El carácter distintivo de una familia es el citoplasma granuloso; el de la otra, el citoplasma no granuloso. Existen tres tipos de granulocitos o leucocitos granulosos: los eosinófilos, los basófilos y los neutrófilos (Beutler<sup>a,b</sup> 1995).

Los eosinófilos constituyen del 1 al 3% de los leucocitos totales y son capaces de llevar a cabo la fagocitosis, son células importantes en las reacciones alérgicas y en la respuesta inmune contra parásitos. Los basófilos constituyen el 0.5% de leucocitos en sangre y secretan histamina, la cual interviene en las reacciones alérgicas. Los neutrófilos o polimorfonucleares, constituyen entre el 60 y 70% del total de leucocitos, siendo los más abundantes en la sangre, su principal función es la defensa contra agentes infecciosos (Beutler<sup>a,b</sup> 1995).

Dentro de los leucocitos no granulosos encontramos a los linfocitos y a los monocitos. Los linfocitos, después de los neutrófilos, son los leucocitos más abundantes de la sangre. Los linfocitos cooperan con los fagocitos en la defensa del organismo contra infecciones y contra invasión externa, dándole especificidad a la respuesta inmune. Pueden clasificarse en T y en B. Ambos llevan a cabo funciones especializadas en la respuesta inmunológica.

Los linfocitos T son procesados en el timo y comprenden entre el 65-80% de la población de linfocitos circulantes, mientras que los linfocitos B maduran en la médula ósea y comprenden entre el 5-15% de los linfocitos circulantes (Beutler<sup>a,b</sup> 1995).

Los monocitos constituyen del 3 al 8% de los leucocitos en sangre, tienen una gran capacidad de movimiento y migración. En los tejidos los monocitos se diferencian en macrófagos, cuya principal función es intervenir en la defensa contra agentes infecciosos, fagocitando y produciendo citocinas (Beutler<sup>a,b</sup> 1995).

Finalmente las **plaquetas** o **trombocitos**, los cuales son fragmentos de los megacariocitos. Los megacariocitos son células poliploides que se localizan en la médula ósea y que dentro de su citoplasma producen a las plaquetas (Zucker-Franklin, Petursson; Hyde, Zucker-Franklin 1987) y las liberan a la circulación. Las plaquetas forman parte del mecanismo de coagulación.

Los valores normales de células sanguíneas se muestran en el siguiente cuadro:

### Valores Normales de las Células Sanguíneas

	Hombre	Ambos Sexos	Mujer
<b>Células blancas</b> $\times 10^3 / \mu\text{l}$ de sangre		7.8(4.4-11.3)	
<b>Células rojas</b> $\times 10^6 / \mu\text{l}$ de sangre	5.21 (4.52-5.90)		4.60(4.10-5.10)
<b>Hemoglobina</b> g/dl de sangre	15.7(14.0-17.5)		13.8(12.3-15.3)
<b>Cuenta plaquetaria</b> $\times 10^3 / \mu\text{l}$ de sangre		311(172-450)	

Beutler<sup>ab</sup> 1995.

## II. HEMATOPOYESIS Y ORGANOS HEMATOPOYETICOS

La producción de toda esta variedad de células se lleva a cabo gracias a un proceso denominado Hematopoyesis. En los humanos, la hematopoyesis se inicia a partir de la tercera semana del desarrollo prenatal en el saco vitelino, específicamente en los islotes hematopoyéticos, los cuales derivan de las células mesenquimales. Las células mesenquimales se diferencian en racimos o colonias con células endoteliales en la periferia y células hematopoyéticas al centro, algunas de las cuales se diferencian rápidamente a la línea eritroide (Tavassoli 1991). Con la fusión de los islotes hematopoyéticos y el establecimiento de los vasos sanguíneos y la circulación, las células hematopoyéticas migran del saco vitelino al hígado fetal, probablemente por la circulación (Lansdorp 1995). La expansión de la hematopoyesis en el hígado fetal está asociada con la declinación de la misma en el saco vitelino.

La hematopoyesis hepática se inicia con la aparición de células blásticas indiferenciadas, las cuales se van diferenciando hacia la línea eritroide, granulocítica y megacariocítica. Esto ocurre a partir del tercer mes de gestación, durante este periodo el bazo también actúa como órgano hematopoyético. Desde el sexto mes de desarrollo y durante toda la etapa pos-natal, hasta la muerte del organismo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético, capaz de llevar a cabo la eritropoyesis, mielopoyesis y linfopoyesis (Tavassoli 1991). Dentro de la médula ósea encontramos fundamentalmente dos compartimentos constituidos por: las células hematopoyéticas (CH) y el microambiente hematopoyético (MH).

## III. CELULAS HEMATOPOYETICAS

### 3.1 Organización estructural del sistema hematopoyético

Gracias a los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que se han realizado durante las últimas tres décadas, se ha desarrollado un modelo de la organización estructural del sistema hematopoyético en los mamíferos, el cual está constituido por cuatro compartimentos (Metcalf et al 1971, Mayani <sup>a</sup>). El primer compartimento está formado por las *células seminales hematopoyéticas (CSH)*, también denominadas células madre o células tallo; las cuales dan origen a *progenitores hematopoyéticos*, que constituyen el segundo compartimento, los progenitores hematopoyéticos dan lugar a *precursores reconocibles por su morfología* y estos al madurar dan origen a las *células sanguíneas circulantes*, las cuales conforman el último compartimento hematopoyético (**FIGURA 1**) (Mayani <sup>a</sup>, Golde 1991, Mayani <sup>c</sup> 1992).

## II. HEMATOPOYESIS Y ORGANOS HEMATOPOYETICOS

La producción de toda esta variedad de células se lleva a cabo gracias a un proceso denominado Hematopoyesis. En los humanos, la hematopoyesis se inicia a partir de la tercera semana del desarrollo prenatal en el saco vitelino, específicamente en los islotes hematopoyéticos, los cuales derivan de las células mesenquimales. Las células mesenquimales se diferencian en racimos o colonias con células endoteliales en la periferia y células hematopoyéticas al centro, algunas de las cuales se diferencian rápidamente a la línea eritroide (Tavassoli 1991). Con la fusión de los islotes hematopoyéticos y el establecimiento de los vasos sanguíneos y la circulación, las células hematopoyéticas migran del saco vitelino al hígado fetal, probablemente por la circulación (Lansdorp 1995). La expansión de la hematopoyesis en el hígado fetal está asociada con la declinación de la misma en el saco vitelino.

La hematopoyesis hepática se inicia con la aparición de células blásticas indiferenciadas, las cuales se van diferenciando hacia la línea eritroide, granulocítica y megacariocítica. Esto ocurre a partir del tercer mes de gestación, durante este periodo el bazo también actúa como órgano hematopoyético. Desde el sexto mes de desarrollo y durante toda la etapa pos-natal, hasta la muerte del organismo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético, capaz de llevar a cabo la eritropoyesis, mielopoyesis y linfopoyesis (Tavassoli 1991). Dentro de la médula ósea encontramos fundamentalmente dos compartimentos constituidos por: las células hematopoyéticas (CH) y el microambiente hematopoyético (MH).

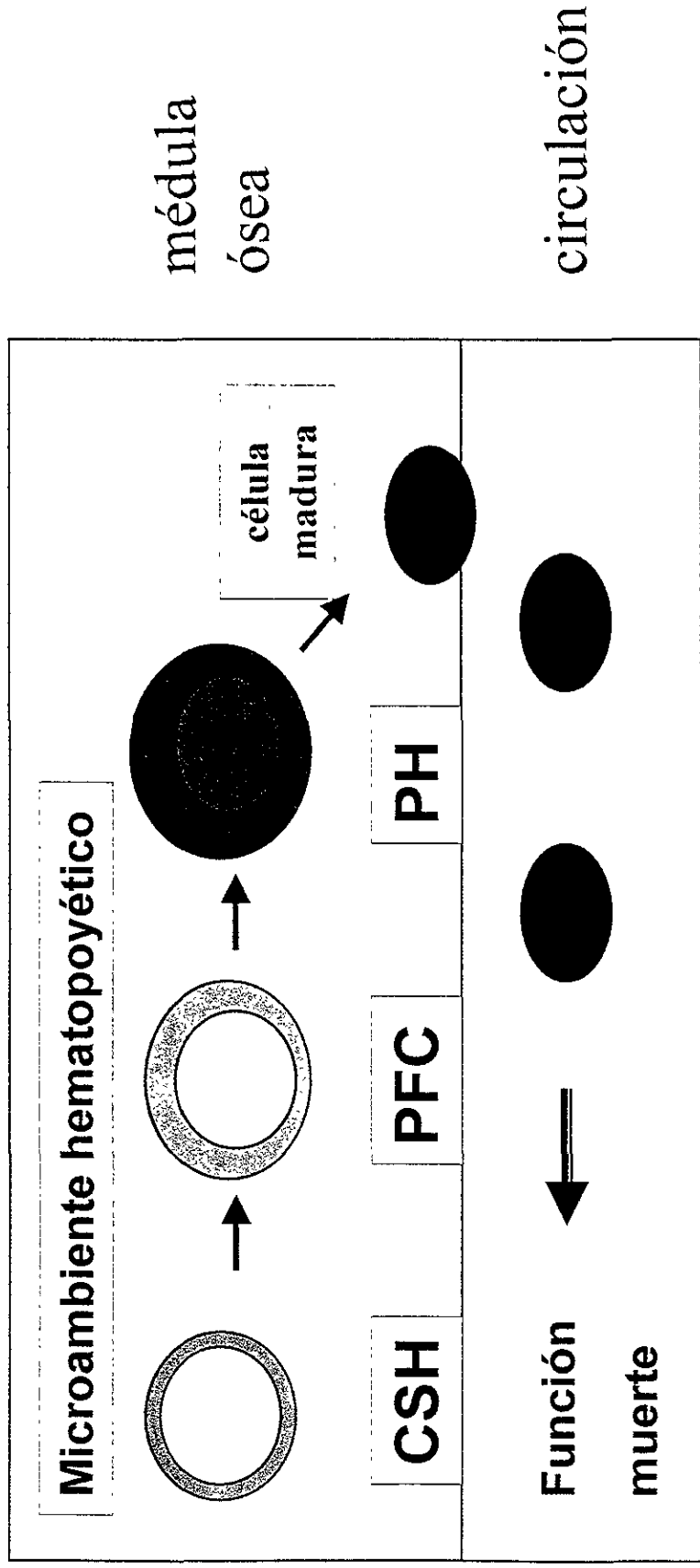
## III. CELULAS HEMATOPOYETICAS

### 3.1 Organización estructural del sistema hematopoyético

Gracias a los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que se han realizado durante las últimas tres décadas, se ha desarrollado un modelo de la organización estructural del sistema hematopoyético en los mamíferos, el cual está constituido por cuatro compartimentos (Metcalf et al 1971, Mayani <sup>a</sup>). El primer compartimento está formado por las *células seminales hematopoyéticas (CSH)*, también denominadas células madre o células tallo; las cuales dan origen a *progenitores hematopoyéticos*, que constituyen el segundo compartimento, los progenitores hematopoyéticos dan lugar a *precursores reconocibles por su morfología* y estos al madurar dan origen a las *células sanguíneas circulantes*, las cuales conforman el último compartimento hematopoyético (**FIGURA 1**) (Mayani <sup>a</sup>, Golde 1991, Mayani <sup>e</sup> 1992).

Figura 1

Mecanismo de hematopoyesis



CSH: Célula seminal hematopoyética, PFC: progenitor formador de colonias en cultivo. PH: precursor hematopoyético

### 3.2. Células Seminales Hematopoyéticas. CSH.

Las CSH constituyen una población celular muy heterogénea y hasta la fecha es difícil describirla. Funcionalmente se dice que una CSH es capaz de autorrenovarse y tiene la capacidad de regenerar permanentemente el sistema hematopoyético de un organismo cuyo sistema hematopoyético ha sido previamente nulificado (Visser et al 1990, Berardi et al 1995, Orlic et al 1994). La CSH por tanto, debe de poseer capacidad multipotencial, es decir, debe de ser capaz de originar a todas las células hematopoyéticas maduras tanto de linaje mieloide como linfoide.

Las CSH no pueden distinguirse por su morfología, pero poseen características únicas que las diferencian de las células maduras. Más del 95% de las CSH están en estado quiescente, es decir en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, por lo que son resistentes a los efectos del 5-fluorouracilo (Hodgson 1979). Estas células además, tienen la capacidad de retener bajos niveles de rodamina, y no se adhieren al plástico (Visser 1990).

Las CSH también pueden distinguirse por su inmunofenotipo. Hasta hace pocos años se consideraba que las CSH expresaban el antígeno CD34, el cual subdividía a las células hematopoyéticas en un grupo que incluía tanto a las CSH como a los progenitores hematopoyéticos. Sin embargo, diversos grupos, dentro de los que destacan el grupo de Bathia y John Dick (Bathia et al 1998) y el de Zanjani y Ogawa (Zanjani et al 1998) han demostrado que las células más primitivas encontradas hasta la fecha no expresan el antígeno CD34. Dicho descubrimiento ha sido muy controversial debido a que se consideraba al antígeno CD34 como marcador de las CSH más inmaduras. Las CSH no expresan ningún marcador de células maduras como CD2, CD3, CD4, CD14, CD16, CD19, CD20, CD33, CD41, CD56 ni la glicoforina A (para englobar todos los marcadores de células maduras se utilizan las siglas "lin") (Baum et al 1992, Berardi et al 1995). A pesar de que se conoce que la subpoblación de células CD34<sup>-</sup> lin<sup>-</sup> contiene a células más primitivas que las CD34<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> la mayoría de los estudios sigue utilizando a células CD34<sup>+</sup> con diferentes paneles de otros antígenos para realizar estudios de células seminales hematopoyéticas. Esto se debe a que aún los datos experimentales con respecto a la caracterización de las células CD34<sup>-</sup> lin<sup>-</sup> son pocos y a que esta subpoblación es sumamente escasa dentro de las células de la médula ósea. Diferentes grupos de investigación han utilizado células CD34<sup>+</sup> junto con uno o varios marcadores de membrana para aislar a las CSH, dentro de los más utilizados se encuentran el CD38, CD33, Thy-1, HLA-DR (Craig et al 1993, Humphries et al 1981, Ogawa 1993, Bock et al 1997, Bathia et al 1998) y más recientemente el AC133 (Wynter EA et al. 1998). Englobando estos trabajos el inmunofenotipo de la CSH podría definirse como: **CD34<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> Thy-1<sup>lo/+</sup> CD38<sup>-</sup> CD33<sup>-</sup> HLA-DR<sup>-</sup> AC133<sup>+</sup>**.

Las CSH también pueden identificarse mediante estudios *in vitro*. A diferencia de los progenitores hematopoyéticos, las CSH no producen colonias en cultivos semisólidos, pero cuando son cultivadas en capas de estroma pre-formadas, dan origen a progenitores más maduros capaces de producir colonias en cultivos semisólidos (a lo que se denomina como actividad de células iniciadoras de cultivos líquidos a largo plazo o **LTC-IC** por sus siglas en inglés) (Southerland et al 1990, Szilvassy et al 1989). Una de las características de las CSH es que al ser cultivadas sobre capas de estroma pre-formadas, éstas migran hacia la parte inferior y se localizan entre y por debajo de las células estromales (por un mecanismo que no se conoce claramente en la actualidad) y comienzan a proliferar en forma de racimos o empedrado en áreas compactas y bien definidas. Esta propiedad se utiliza para cuantificar a las CSH y se considera que cada racimo o empedrado de células se originó a partir de una CSH, a esta actividad se le conoce como formación de “áreas de empedrado” o “cobblestone areas” (en inglés). Si las células se co-cultivan en condiciones de dilución limitante se puede calcular la frecuencia de CSH en una determinada población celular, además de que el número de áreas de empedrado correlaciona directamente con la actividad repobladora de las CSH en modelos murinos (Ploemacher et al 1989).

### 3.3. Progenitores hematopoyéticos.

Los progenitores hematopoyéticos se derivan de las células seminales hematopoyéticas. Estos progenitores tienen la capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos por lo que se conocen también como células formadoras de colonias en cultivo (**PFC** o **CFU** por sus siglas en inglés). Cuando los progenitores provienen de un progenitor mieloide inmaduro, estos progenitores formaran colonias eritroides, granulocíticas, monocíticas y megacariocíticas. Por su parte, los progenitores linfoides inmaduros dan lugar a colonias linfoides tanto B como T. Las CFU poseen una alta capacidad de proliferación, sin embargo no son capaces de mantener la hematopoyesis *in vitro* ni *in vivo* a largo plazo (Mayani <sup>a</sup>). Los progenitores que dan origen a las colonias en cultivo pueden ser multipotenciales, bipotenciales y monopotenciales. Los progenitores multipotenciales, como es el caso de las unidades formadoras de colonias mixtas (**CFU-MIX** o **CFU-GEMM**), forman colonias que contienen células tanto mieloides como eritroides.

Los progenitores bipotenciales tienen la capacidad de originar colonias de dos tipos celulares como las unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas (**CFU-GM**), las cuales originan colonias compuestas por granulocitos y por monocitos.

Los progenitores monopotenciales son progenitores que tienen la capacidad de generar únicamente un tipo celular. Dentro del linaje mieloide encontramos las unidades formadoras de colonias de granulocitos (CFU-G) y de monocitos (CFU-M); y dentro de la línea eritroide encontramos progenitores monopotenciales inmaduros como las unidades formadoras de brote eritroide (BFU-E) y progenitores más maduros como las unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E).

Los progenitores formadores de colonias en cultivo, también pueden ser reconocidos por su inmunofenotipo. Los progenitores multipotenciales presentan el siguiente inmunofenotipo CD34<sup>+</sup> CD45RA<sup>lo</sup> CD71<sup>lo</sup>; los progenitores mieloides expresan los antígenos CD34 y CD45RA y no expresan el antígeno CD71; y los progenitores eritroides inmaduros (BFU-E) expresan los antígenos CD34 y CD71 y no expresan el CD45RA (Mayani<sup>i</sup> 1993).

### **3.4. Precursores reconocibles por su morfología.**

Los precursores reconocibles por su morfología, reciben ese nombre ya que bajo microscopía óptica pueden ser identificados. Incluyen los distintos tipos de blastos de todas las líneas hematopoyéticas. Estos precursores dan origen a las células sanguíneas maduras (Mayani<sup>a</sup>).

En términos generales, las células más inmaduras o jóvenes suelen ser grandes y se vuelven progresivamente más pequeñas al adquirir la madurez (con excepción del megacariocito). Los núcleos de células más jóvenes en la secuencia de maduración son grandes y voluminosos con relación al citoplasma. Al madurar las células, el núcleo disminuye de tamaño. El citoplasma de las células primitivas es esencialmente azul y contiene grandes cantidades de ARN (ácido ribonucleico), que tiene afinidad para el colorante azul de metileno.

Al madurar la célula va adquiriendo una tonalidad rojiza en su citoplasma. Los filamentos de cromatina nuclear de células jóvenes contienen ADN (ácido desoxirribonucleico) que tiene afinidad para el colorante ácido eosinófilo. Al madurar el núcleo se tiñe más intensamente y su color cambia del rojo pálido al azul oscuro.

En células no diferenciadas o blastos, los filamentos de cromatina nuclear son visibles. La cromatina es de tinte y consistencia uniforme. Una de las características de inmadurez es la presencia de nucleólos en el núcleo (Beutler<sup>b</sup> 1995, Hoffbrand 1994).

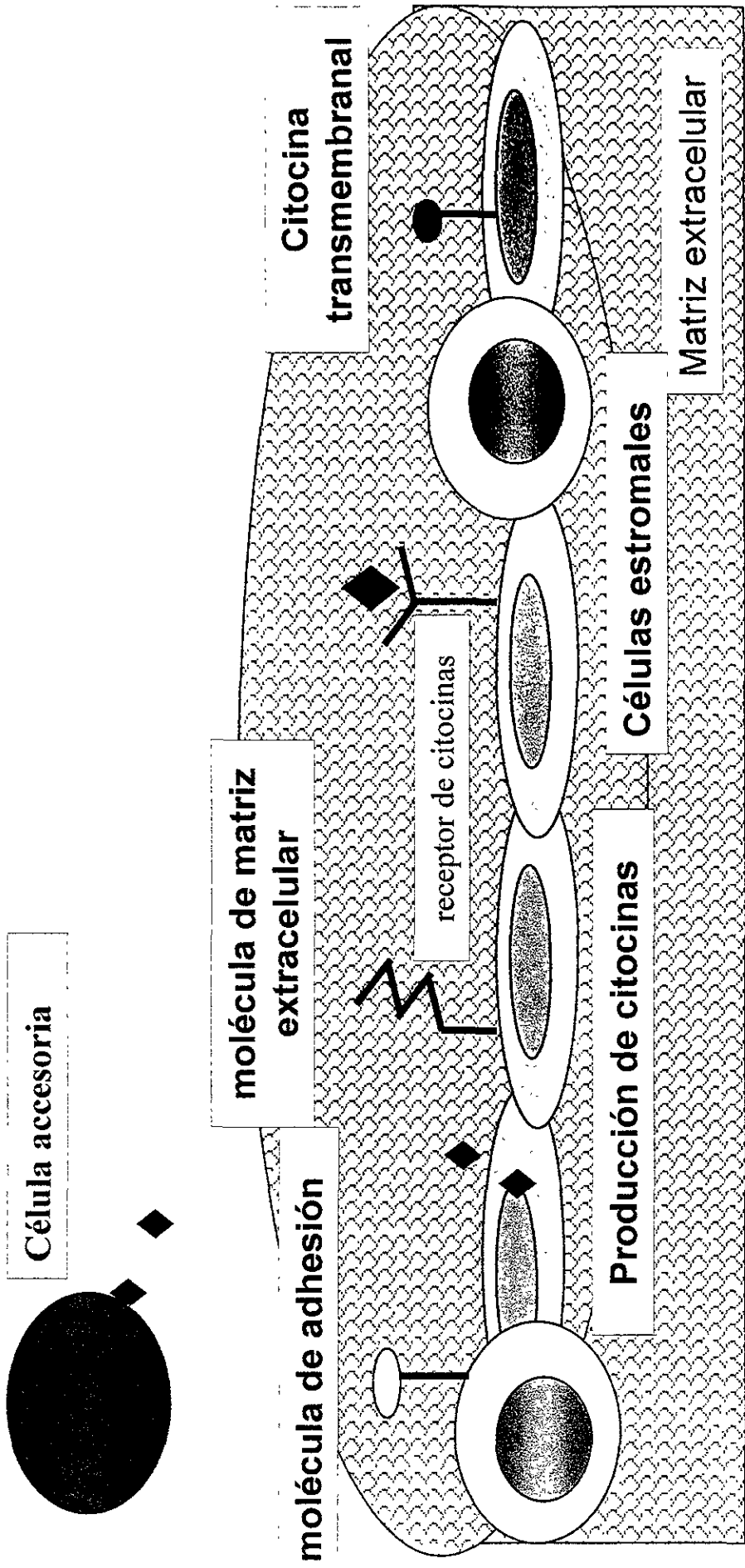


#### IV. MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

La hematopoyesis es un proceso finamente regulado que se lleva a cabo únicamente en ciertos órganos, denominados órganos hematopoyéticos (saco vitelino, bazo, hígado, médula ósea). En ellos las células hematopoyéticas se desarrollan en un ambiente específico denominado Microambiente Hematopoyético (Mayani H<sup>d</sup> 1992, Long, Wicha 1993). El MH de la médula ósea es una estructura tridimensional compleja altamente organizada que regula la localización y fisiología de las células hematopoyéticas y consiste en una red local de **células del estroma, células accesorias** y sus productos (**matriz extracelular y citocinas**) (FIGURA 2) (Mayani<sup>d</sup> 1992, Perkins, Feishman 1988).

El MH ha sido estudiado tanto *in vivo* con modelos murinos principalmente, como *in vitro* trabajando con células tanto murinas como humanas. *In vitro* el principal método de estudio ha sido los cultivos a largo plazo tipo dexter (LTMC por sus siglas en inglés). Este tipo de cultivos permite el desarrollo de una capa de estroma, la cual se adhiere a la superficie de la caja de cultivo. Las células de esta capa producen y secretan tanto moléculas de matriz extracelular (MEC) como citocinas y es capaz de sostener la hematopoyesis por varias semanas sin la adición de citocinas exógenas (Eaves 1991, Mayani<sup>d</sup> 1992, Perkins, Feishman 1998). Diversos estudios han demostrado la presencia de elementos del estroma en los LTMC similares a los encontrados *in vivo*. Las capas de estroma que crecen *in vitro* han sido transplantadas a ratones y se ha visto que permiten el desarrollo de colonias hematopoyéticas; por lo que se considera a los LTMC como un modelo para la caracterización del MH *in vitro* (Deryugina, Müller-Sieburg 1993). Dentro de las células estromales encontramos a las que derivan de la fracción hematopoyética y las que derivan de la fracción no-hematopoyética. Los macrófagos forman parte de la fracción hematopoyética del estroma, debido a que derivan de la CSH. El origen de las otras células estromales es muy controversial. Diversos estudios sugieren que todos los otros elementos derivan de la fracción no hematopoyética; así lo indican estudios realizados con modelos murinos en donde se realizan transplantes de médula ósea y se observa que los elementos del estroma (células endoteliales, adipocitos, células reticulares) provienen del hospedero (Perkins, Feishman 1988). El único estudio en donde se sugiere que algunos elementos del estroma pueden provenir de células hematopoyéticas es el realizado por Huang S y Terstappen (1992), en donde muestran que a partir de subpoblaciones aisladas de células hematopoyéticas (CD34+ CD38- HLA-DR-) provenientes de médula ósea fetal se pueden generar tanto elementos precursores hematopoyéticos como estromales, lo que sugiere que exista un progenitor común. Sin embargo este estudio fue muy controversial y no se han podido repetir dichos resultados por otros grupos de investigación. Incluso estos autores se retractaron dos años después (Huang, Terstappen 1994).

Figura 2  
Microambiente Hematopoyético



## 4.1. Componentes del microambiente hematopoyético medular

El MH está compuesto por 4 elementos en los que se incluyen 2 componentes, el celular y el proteico. El componente celular está formado por las células del estroma y por las células accesorias, ambas presentes en la médula ósea, unas de forma permanente (células del estroma) y las últimas de forma transitoria. La fracción proteica está compuesta por la matriz extracelular y por las citocinas, ambas producidas y secretadas por el componente celular del MH (Mayani <sup>d</sup> 1992, Perkins, Feishman 1988).

## 4.2. Componente celular

### 4.2.1. Células del Estroma

La palabra estroma deriva del griego que quiere decir "cama" ya que de acuerdo con la definición más antigua, estas células proveen un soporte físico para las células hematopoyéticas (Deryugina, Müller-Sieburg 1993). El término célula del estroma se utiliza para describir una gran variedad de células, que tienen la capacidad de adherirse *in vitro* y expresan el antígeno de histocompatibilidad tipo I (Deryugina, Müller-Sieburg 1993) y no expresan el antígeno CD45. Estas células son residentes permanentes de la médula ósea, las cuales además de ser un soporte físico, sintetizan y secretan citocinas y moléculas que forman parte de la matriz extracelular; necesarias para regular la autorenovación, diferenciación, maduración y migración de las células hematopoyéticas (Dorshkind 1990, Mayani <sup>d</sup> 1992).

Las células del estroma incluyen: células reticulares, macrófagos, células endoteliales, adipocitos (Mayani <sup>d</sup> 1992) y osteoblastos (Russell 1996).

1.- **Células reticulares:** representan el componente más abundante del MH tanto *in vivo* como *in vitro*. Existen dos tipos de células reticulares, las adventicias y las fibroblásticas. Las células reticulares adventicias están localizadas *in vivo* alrededor de los sinusoides venosos. Estudios morfológicos indican que uno de sus papeles principales es el de regular la migración de las células sanguíneas maduras de la médula a la circulación. Las células reticulares fibroblásticas se localizan dentro de la médula ósea y generalmente se encuentran en contacto directo con las células granulocíticas inmaduras. Los fibroblastos son el componente más abundante en los LTMC. El primer intento exitoso de crecer a las células estromales *in vitro* fue la formación de colonias adherentes conocidas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Castro-Malaspina et al 1980). Los fibroblastos producen tanto citocinas como el factor estimulador de

colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulador de células seminales (SCF), la interleucina 1 (IL-1) y la interleucina 6 (IL-6) entre otros; como moléculas de la matriz extracelular como la colágena tipo I y tipo III y fibronectina (Dorshkind 1990, Mayani 1992, Deryugina, Müller-Sieburg 1993).

2.- **Macrófagos:** son el segundo componente del estroma más abundante de la médula ósea y de los LTMC. Dentro de la médula ósea se localizan en diferentes sitios: como macrófagos centrales en las islas eritroblásticas, en el endotelio y dispersos entre las células hematopoyéticas. Estas células llevan a cabo diferentes y muy importantes funciones, regulando la hematopoyesis tanto por interacciones célula - célula como por la secreción de citocinas tanto estimuladoras como inhibidoras. Dentro de la variedad de citocinas producidas por los macrófagos encontramos el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), el G-CSF, el GM-CSF, la interleucina 3 (IL-3), la IL-1, la IL-6, la interleucina 8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP), entre otros (Dorshkind 1990, Mayani 1992, Deryugina, Müller-Sieburg 1993, Thomson 1994).

3.- **Células endoteliales:** son el principal tipo celular encargado de formar los vasos sanguíneos de la médula. Dentro de la médula las células endoteliales se localizan en una cercana asociación con otros tipos celulares como los fibroblastos, los adipocitos, los megacariocitos maduros, las células plasmáticas y las células hematopoyéticas; formando una interface entre la circulación y el compartimento hematopoyético. Esto sugiere que las células endoteliales controlan los últimos estadios de la hematopoyesis mediante interacciones celulares directas, regulando la entrada de células maduras a la circulación periférica. Las células endoteliales también pueden regular la hematopoyesis a través de la secreción de diversas citocinas como el GM-CSF, el G-CSF, el M-CSF y la IL-6 y a través de la producción de moléculas de la matriz extracelular como la colágena tipo IV y laminina (Rafii 1994, Dorshkind 1990, Mayani 1992).

4.- **Adipocitos.**- ocupan el mayor espacio de la médula ósea de los mamíferos adultos (médula amarilla). Su papel en la hematopoyesis no es muy claro, sin embargo se piensa que produzcan factores inhibidores de la hematopoyesis. En los cultivos a largo plazo aparecen cuando los cultivos son viejos y la hematopoyesis declina (Rafii 1995, Dorshkind 1990, Mayani <sup>d</sup> 1992).

5.- **Osteoblastos.**- dentro del hueso pueden ser identificados varios tipos celulares, incluyendo los osteoblastos que secretan activamente la matriz del hueso y los osteocitos que se encuentran embebidos en la matriz clasificada. Se ha sugerido que ambos tipos celulares provengan de un progenitor común llamado pre-osteoblasto, y estos a su vez provengan de un progenitor común a las otras células estromales. Estudios

recientes han sugerido que los osteoblastos pertenecen al microambiente hematopoyético, ya que *in vivo* se ha demostrado que las células hematopoyéticas primitivas dentro de la cavidad medular, se localizan en regiones cercanas a los osteoblastos. Los osteoblastos secretan activamente varias proteínas algunas de la matriz extracelular como la colágena tipo I, proteínas como: la osteopontina, osteocalcina y proteoglicanos entre otras; así como también producen citocinas como el G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6, el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y TNF $\alpha$  (Rafii 1994, Dorshkind 1990, Mayani <sup>d</sup> 1992).

#### 4.2.2. CÉLULAS ACCESORIAS

El término célula accesoria se utiliza para describir a células que se encuentran en la cavidad medular de manera transitoria, pero que regulan la hematopoyesis a través de la producción y secreción de citocinas. Dentro de las células accesorias encontramos a los monocitos, linfocitos y células NK (natural killer, por sus siglas en inglés). Estas células producen citocinas tanto inhibitoras como estimuladoras de la hematopoyesis; las cuales son liberadas dentro de la médula ósea, e interaccionan tanto con otros componentes celulares del microambiente hematopoyético (células del estroma) como con las células hematopoyéticas (Mayani H 1992). Los monocitos producen M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-1 y TNF $\alpha$  entre otras, mientras que los linfocitos producen: interleucina 10 (IL-10), interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 3 (IL-3) e interleucina 5 (IL-5) principalmente (Long 1993).

### 4.3. Componente protéico

#### 4.3.1. CITOCINAS

En el sistema hematopoyético de los mamíferos, en condiciones normales, la mayoría de las células seminales se encuentran en un estado de quiescencia –no proliferativo-. Sin embargo, estas células pueden entrar en ciclo rápidamente al estar en contacto con una señal positiva del medio. El estado celular, por lo tanto, dependerá del equilibrio entre las señales positivas (estimuladoras) y negativas (inhibitorias) que reciba la célula, las cuales son proporcionadas en parte por las citocinas (Thomson 1994).

Debido a que el campo de estudio de las citocinas envuelve distintas disciplinas, la unificación de la nomenclatura de dichas moléculas no ha sido fácil y se les ha nombrado con diversos términos (linfocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, interferones). El primer término con el que se las definió fue el de linfocinas, que se utilizaba para designar a las proteínas que afectaban el crecimiento y las funciones de muchos tipos celulares. En 1974 Cohen propuso el término de citocinas y en 1979 los participantes del

segundo congreso internacional de las linfocinas propusieron el termino de interleucina, con la finalidad de desarrollar un sistema de nomenclatura. Dicho termino se propuso basado en la capacidad de estas proteínas para actuar como señales de comunicación entre diferentes poblaciones de leucocitos (Thomson 1994).

La definición de interleucina se ha ampliado ya que varias de ellas son producidas por una variedad de células no hematopoyéticas y actúan sobre diversas células somáticas (Thomson 1994). Las citocinas hematopoyéticas son glicoproteínas cuya producción es regulada por estímulos inducibles que actúan al nivel de traducción o transcripción. La producción de citocinas es transitoria, es decir, no son producidas constitutivamente (salvo excepciones). Su radio de acción usualmente es corto, por lo que generalmente su acción es autócrina o parácrina (a excepción de la eritropoyetina (Epo) cuya acción es endócrina). La mayoría de las citocinas posee funciones pleiotrópicas, es decir, su efecto dependerá del tipo celular y del estadio celular y de diferenciación de su célula blanco. Estas moléculas actúan uniéndose a receptores de membrana de gran afinidad, la mayor parte de ellas altera la expresión génica de sus células blanco, modificando: (1) la tasa de proliferación celular, (2) el estadio de diferenciación celular, (3) la viabilidad y (4) la muerte celular (apoptosis) (Thomson 1994). Las citocinas tienen la capacidad de interactuar con otros factores hematopoyéticos y producir acciones tanto sinérgicas como antagonísticas; estimulando o inhibiendo la producción de otras citocinas (Thomson 1994).

## **Factores Estimuladores**

Los factores estimuladores o factores de crecimiento hematopoyéticos regulan positivamente la producción de las células sanguíneas de manera tanto directa como indirecta (Clark, Kamen 1987, Mayani <sup>o</sup> 1990). Estos factores han sido objeto de estudio desde hace varios años debido a su importancia en la investigación básica - ya que nos permiten entender los mecanismos de proliferación y diferenciación celular- así como en la investigación clínica - por la importancia de su uso terapéutico. Los factores estimuladores han sido piezas fundamentales para el tratamiento de diversas citopenias como la anemia y la neutropenia relacionadas o no a un proceso maligno, en el trasplante de médula ósea para disminuir el tiempo del injerto y como tratamiento adicional a la quimioterapia. Existen diversos mecanismos a través de los cuales los factores de crecimiento estimulan la hematopoyesis, entre los que se encuentran: la reducción del tiempo del ciclo celular de sus células blanco, el aumento del número de divisiones celulares, una combinación de las dos, o la prevención de la muerte prematura de las células por apoptosis (Clark, Kamen 1987, Mayani <sup>o</sup> 1990, Alberts 1994). Debido a que estas proteínas fueron identificadas inicialmente por su capacidad de permitir el crecimiento de diversas colonias en cultivos semisólidos, algunas fueron nombradas como factores

estimuladores de colonias (FEC en sus siglas en español o CSF en inglés) (Clark, Kamen 1987, Mayani 1990, Alberts 1994).

Gracias al desarrollo de los cultivos semisólidos fue posible identificar que la división y diferenciación celular son dependientes de una continua fuente de factores proteicos, que actúan como reguladores de la hematopoyesis y que actúan en diversos linajes y en distintas etapas de maduración. Se observó por ejemplo que existían factores que permitían el crecimiento de una sola línea hematopoyética como la eritropoyetina (**Epo**), la cual permitía solo el crecimiento de colonias eritroides y como el G-CSF, el cual permitía el crecimiento únicamente de colonias de granulocitos. Por otra parte encontraron citocinas que permitían el crecimiento de varias líneas hematopoyéticas (tanto mieloides como eritroides) como la IL-3 (Clark, Kamen 1987, Mayani 1990, Alberts 1994).

También existen otras citocinas estimuladoras que actúan al nivel de progenitores muy inmaduros como el SCF y otras citocinas con acciones pleiotrópicas que actúan en varios niveles y tienen múltiples acciones como la IL-6 (Clark, Kamen 1987, Mayani 1990).

### **Eritropoyetina (Epo)**

La Epo fue el primer factor hematopoyético descubierto. En 1906 Carnot y Deflandre describieron por primera vez lo que ellos denominaron como hemopoyetina, y años más tarde fue denominada como eritropoyetina. En 1953, Allan Erslev en Filadelfia demostró su presencia en el plasma de conejos con anemia inducida por sangrado, pero no fue sino hasta 1977 cuando un grupo de investigadores en Chicago purificó la proteína a partir de orina humana de pacientes con anemia aplásica.

La Epo se produce principalmente en el riñón por las células intersticiales (Goldwasser 1984, Thomson 1994). La Epo es una de las citocinas más importantes en la regulación de la eritropoyesis tanto *in vivo* como *in vitro*. En cultivos semisólidos la Epo es necesaria para la formación de colonias eritroides, mientras que en el organismo es responsable de la producción de eritrocitos, estimulando la maduración de los progenitores eritroides y la liberación de reticulocitos hacia la circulación (Goldwasser 1984, Thomson 1994).

Diversos estudios han mostrado que el modo de acción de la Epo no es disminuyendo el número de ciclos celulares ni aumentando el número de divisiones celulares; sino previniendo la apoptosis dentro de la línea eritroide en las células CFU-E y en los precursores eritroides tardíos. Por lo tanto se le considera una citocina de supervivencia en este tipo celular (Koury 1990, Nijhoff 1995).

## **Interleucina 6 (IL-6)**

La IL-6 fue primero descrita como interferón beta 2 (IFN $\beta$ 2), proteína 26kD inducible por IL-1 y como un factor que inducía la diferenciación de las células B. La interleucina 6 es una citocina típica pleiotrópica multifuncional que actúa en varios tipos celulares: induce la diferenciación de las células B en células plasmáticas, interviene en los procesos de diferenciación y crecimiento de las células T, induce la diferenciación de líneas celulares leucémicas mieloides en macrófagos, permite la maduración de los megacariocitos y el desarrollo de los osteoclastos. La IL-6 actúa como un factor de crecimiento para varias líneas tumorales y células como en el sarcoma de Kaposi, el carcinoma renal y en células de mieloma. En el sistema hematopoyético la IL-6 promueve a las células seminales hematopoyéticas para que entren en ciclo, y junto con IL-3 promueve su crecimiento. También actúa sobre células más diferenciadas como en los megacariocitos en donde estimula su maduración y proliferación y en las CFU-GM. La IL-6 también actúa como factor inhibitor del crecimiento de algunas líneas celulares de leucemia mieloide aguda y de ciertos tipos de carcinoma. Es una citocina producida tanto por células linfoides como por no linfoides dentro de las que encontramos a los linfocitos T, monocitos, megacariocitos y fibroblastos; así como por una gran cantidad de células tumorales en las que se incluyen líneas celulares de adipocitos, células de mieloma y de cáncer de mama (Thomson 1994, Hibi T 1996, Crichton 1996). La producción de IL-6 es regulada por varios estímulos. En los linfocitos T es estimulada por el encuentro con el antígeno. Se ha observado que el TNF $\alpha$  y la IL-1 incrementan la producción de IL-6 mediante la activación de la proteína nuclear NF $\kappa$ B. Algunos virus como el citomegalovirus también pueden incrementar la producción de IL-6. Cariquist et al (1999), Geis y Dai (1996) y Taichman<sup>a,b</sup> et al (1997) demostraron que el citomegalovirus (CMV) es capaz de inducir la producción de IL-6 en fibroblastos, en monocitos y en células estromales de médula ósea humana en una forma dosis-dependiente.

## **Interleucina 3 (IL-3)**

La IL-3 o multi-CSF es producida por los linfocitos T, células NK y células cebadas. En el humano el gen de la IL-3 se localiza en el brazo largo del cromosoma 5, muy cercano al gen del GM-CSF, del M-CSF, y de su receptor (**c-fms**). La importancia biológica de la cercanía de estos genes se desconoce sin embargo se piensa que pueda estar relacionada con su regulación, ya que aparentemente estos genes no presentan ninguna homología en su secuencia. La delección del brazo largo del cromosoma 5 (5q-) es observada muy frecuentemente en pacientes con síndrome mielodisplásico y con leucemia aguda no linfocítica secundaria al tratamiento tóxico. Estudios *in vitro* han demostrado que la IL-3 permite la proliferación de los progenitores mieloides multipotenciales inmaduros (CFU-MIX) permitiendo el desarrollo de células eritroides, mielo-



monocíticas y megacariocíticas. La IL-3 previene a las células de morir por apoptosis y promueve su supervivencia en el cultivo. Como algunos otros factores hematopoyéticos, la IL-3 no actúa solamente sobre progenitores hematopoyéticos inmaduros, sino también actúa al nivel de células más maduras. Por ejemplo, la IL-3 regula la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en las células cebadas, induce la división de macrófagos y promueve la diferenciación de los megacariocitos murinos, puede activar a los basófilos humanos y estimula la supervivencia de los eosinófilos humanos. Tanto en los humanos como en el sistema murino se ha observado que la IL-3 sinergiza con múltiples citocinas como el G-CSF y el M-CSF para producir neutrófilos y macrófagos y con la IL-1 para estimular el crecimiento de los progenitores inmaduros (Clark S 1987, Mayani H 1990, Smith 1990, Thomson 1994).

### **Factor estimulador de células seminales (SCF)**

El factor estimulador de células seminales o SCF (por sus siglas en inglés) es producido por las células del estroma, incluyendo los fibroblastos. El SCF es producido tanto en forma soluble como membranal y es el ligando del receptor c-kit (Wheatton, Gordon 1996). Cuando en los cultivos semisólidos se agrega únicamente SCF se ha observado que este tiene muy poca capacidad estimuladora, sin embargo cuando se combina con otras citocinas tiene un alto potencial sinérgico. Por ejemplo, el SCF sinergiza con el GM-CSF, el G-CSF, el M-CSF y la IL-3 en cultivo tanto de células hematopoyéticas de ratón como de humano, incrementando el número de progenitores. El efecto estimulador del SCF se observa en un amplio rango de células hematopoyéticas, desde progenitores primitivos hasta progenitores más maduros. Cuando se agrega SCF en combinación con otras citocinas se observan colonias de mayor tamaño conteniendo un mayor número de células, pero no se observa que afecte su diferenciación, por lo que se piensa que el SCF no tiene un efecto en la diferenciación, sino en la proliferación únicamente (Wheatton, Gordon 1996).

El mecanismo de acción del SCF no se conoce con claridad. Algunos investigadores han propuesto que el efecto del SCF es el promover la expresión de otros receptores de citocinas, sin embargo esto no ha sido observado experimentalmente, por lo que se piensa que el SCF requiere de la activación de otras rutas de señalización de otras citocinas y que ambas rutas actúen en combinación. Diversos estudios han demostrado la capacidad del SCF para actuar sinérgicamente con otras citocinas y expandir el número de células maduras, progenitores maduros y progenitores inmaduros. En cultivos líquidos de médula ósea de ratón, se ha observado que el SCF más la IL-6 estimulan la generación de progenitores primitivos, mientras que la combinación de SCF más IL-3 estimula la generación de células progenitoras más maduras. SCF más Epo aumenta el número y el tamaño de las colonias BFU-E (Wheatton, Gordon 1996).

## Factor estimulador de colonias de granulocitos (FEC-G o G-CSF)

El G-CSF es una glicoproteína que posee una gran homología con otras citocinas como la IL-6 y LIF (factor inhibidor de leucemia). En el humano el gen del G-CSF se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21-22) (Thomson 1994).

El G-CSF es producido por células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, células epiteliales y neutrófilos. Durante el proceso inflamatorio, las endotoxinas estimulan al macrófago a producir G-CSF, TNF $\alpha$  e IL-1, estas dos últimas estimulan a su vez a los fibroblastos y células endoteliales a producir G-CSF, por lo que este mecanismo es el responsable del aumento de la granulopoyesis que se observa acompañado del proceso inflamatorio. También se ha observado que células malignas son capaces de producir grandes cantidades de G-CSF como la línea 5637 de carcinoma de vejiga y la LD-2 de melanoma, entre otras (Clark S 1987, Mayani H 1990, Smith 1990, Thomson 1994). El receptor para G-CSF se encuentra principalmente en neutrófilos, y es miembro de la familia de receptores de factores de crecimiento hematopoyéticos que incluyen al receptor para IL-2, IL-3, GM-CSF, IL-6 entre otros. Un dominio en la región extracelular de aproximadamente 200aa está altamente conservado dentro de esta familia. El receptor para G-CSF traduce señales tanto de proliferación como de diferenciación, al parecer por dos vías distintas pero parecidas a las utilizadas por IL-3. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que es necesaria la dimerización del receptor para que se traduzca su señal (Thomson 1994).

EL G-CSF es una citocina linaje específica, ya que su efecto *in vitro* está restringido casi exclusivamente a los progenitores de granulocitos (CFU-G), estimulando la producción de neutrófilos. El G-CSF recombinante también ejerce su actividad sobre neutrófilos maduros, incrementando su capacidad para producir aniones superóxido, su capacidad fagocítica y citotóxica. Además el G-CSF aparentemente promueve la diferenciación de algunas células leucémicas. El G-CSF puede actuar también en combinación con la IL-3 y la IL-6 para estimular a las CSH (Clark S 1987, Mayani H 1990, Smith 1990, Thomson 1994). El efecto *in vivo* del G-CSF ha sido estudiado en diversos modelos animales principalmente en ratones y en monos. En ambos sistemas se ha observado que la inyección de G-CSF recombinante incrementa rápidamente el número de neutrófilos circulantes de una manera dosis-dependiente tanto en animales sanos como en animales neutropénicos. Actualmente el G-CSF se utiliza también en humanos en el tratamiento de la neutropenia en pacientes que han recibido quimioterapia, trasplante de médula ósea o tratamiento inmunosupresor (Smith 1990, Thomson 1994)

## FACTORES INHIBIDORES

El término inhibidor implica la capacidad de una molécula para regular negativamente la síntesis de DNA, la proliferación y/o diferenciación y la viabilidad celular. El estudio de los factores inhibidores fue primeramente abordado con los experimentos de ensayos de colonias en cultivos semisólidos. Si un regulador negativo es completamente efectivo en detener la proliferación celular, debería de esperarse una marcada reducción en el número de colonias. Sin embargo en este tipo de estudios no puede distinguirse entre el efecto inhibitorio entre un efecto tóxico no específico. Otra de las herramientas para este tipo de estudios es el cultivo líquido a largo plazo, el cual permite analizar y manipular *in vitro* las señales que afectan no solo a las CH sino al MH. Dentro de los factores inhibidores de la hematopoyesis encontramos a las citocinas, interferones y otras moléculas represoras; las cuales actúan sobre una gran variedad de células. Dependiendo del estado de diferenciación y estirpe celular, los factores inhibidores pueden ejercer diferentes efectos (Axelrad 1990, Anagnostou 1991 Thomson 1994). Algunos ejemplos de factores inhibidores son los siguientes:

### **Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ )**

El TGF $\beta$  fue el primer regulador negativo en tener su gen clonado y secuenciado, lo que permitió detectar el mRNA en células de mamífero. A pesar de que el TGF $\beta$  tiene funciones pleiotrópicas, una de sus características es la de inhibir el crecimiento de la mayoría de los tipos celulares. Los efectos biológicos del TGF $\beta$  dependen del tipo celular, de las condiciones extracelulares, la presencia de otros factores de crecimiento y las condiciones intracelulares. Los efectos inducidos por el TGF $\beta$  pueden agruparse en varias categorías. Un grupo de actividades se refiere a su potente efecto como regulador del crecimiento, actuando como estimulador o agente anti-proliferativo dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, en cultivo el TGF $\beta$  induce la proliferación de fibroblastos y osteoblastos; y en presencia de GM-CSF en cultivos líquidos de médula ósea es capaz de aumentar el número total de células viables e incrementar el número de neutrófilos y disminuir el número de monocitos/macrófagos (Thomson 1994, Axelrad 1990, Anagnostou 1991).

Por otra parte, se ha encontrado que el TGF $\beta$  es un inhibidor endógeno de las células seminales hematopoyéticas tanto humanas como murinas, ya que es capaz de inhibir a las células formadoras de colonias de alto potencial (HPP-CFC) en una forma dosis dependiente.

En cultivos semisólidos suplementados con GM-CSF, el TGF $\beta$  es capaz de inhibir a los progenitores multipotenciales y bipotenciales, mientras que no tiene efecto en progenitores monopotenciales. Se ha reportado que el TGF $\beta$  es un potente inhibidor de la megacariopoyesis tanto murina como humana. Los mecanismos bioquímicos por los cuales el TGF $\beta$  ejerce su función inhibitoria en el sistema hematopoyético se deben en parte a su capacidad para disminuir la expresión de receptores de alta afinidad de moléculas estimuladoras. En las células hematopoyéticas reduce el número de receptores para IL-1, IL-3, G-CSF y GM-CSF. En algunos sistemas experimentales en donde no se ha observado una disminución en la expresión de receptores de citocinas, se ha encontrado que el TGF $\beta$  actúa mediante la disminución en la expresión de c-myc (células de origen epitelial y endotelial) (Thomson 1994, Axelrad 1990, Anagnostou 1991).

Otro tipo de actividades incluye la capacidad del TGF $\beta$  para inducir la síntesis de moléculas de la matriz extracelular y de inducir la síntesis y expresión de varias integrinas. Estas interacciones median no solamente la adhesión celular sino la señalización intracelular vía integrinas; la cual afecta la expresión génica y la diferenciación celular. El TGF $\beta$  también es capaz de regular la síntesis y secreción de diversas proteasas e inhibidores de proteasas, lo que permite la regulación de las moléculas de la matriz extracelular. Finalmente, el TGF $\beta$  es un agente quimiotáctico para muchos tipos celulares, como los macrófagos y fibroblastos (Thomson 1994, Axelrad 1990, Anagnostou 1991).

## **INTERFERONES (IFNs)**

Los IFNs son una de las moléculas principales en la defensa anti-viral y en la modulación de las funciones de varios tipos celulares. Dentro del grupo de los IFNs podemos distinguir dos clases; la clase I que incluye: IFN- $\alpha$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\beta$  y al IFN- $\tau$ . Todos ellos provienen de un gen ancestral, por lo que presentan una alta homología y pueden actuar en el mismo receptor. Dentro de la clase II se encuentra el IFN-gama, el cual es una linfocina que no presenta una homología estructural con los IFN del grupo I, pero si comparten muchas actividades biológicas (Thomson 1994). La producción del IFN- $\alpha$  y del IFN- $\beta$  la pueden llevar a cabo una gran cantidad de células; algunas de ellas en forma constitutiva como: células del bazo, hígado, riñón y sangre periférica; y en algunas otras pueden ser inducidas por varias moléculas o estímulos. La IL-1 y el TNF $\alpha$ , inducen la producción de IFN- $\beta$  en fibroblastos humanos, incluso IFN-gama actúa como inductor de la producción de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . Contrariamente, la producción de IFN-gama se encuentra restringida a dos tipos celulares: los linfocitos T [citotóxicos y cooperadores (Th1)] y las células NK. Las infecciones virales son los mejores inductores de la síntesis de los IFNs (Thomson 1994, Plumb 1991).

Dentro de las principales actividades biológicas de los IFNs se encuentra su efecto anti-viral, la inducción del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II, la estimulación de la actividad fagocítica y anti-tumoral por parte de los macrófagos, la estimulación de la actividad de las células NK y su efecto en el retardamiento de la división y crecimiento celular. Sus efectos en el sistema hematopoyético incluyen la inhibición de la eritropoyesis (IFN- $\alpha$ ) y la inducción de la producción y liberación de TNF por parte de los macrófagos (IFN-gama). En las células tumorales, se ha demostrado que los IFNs tienen la capacidad regular la expresión de algunos oncogenes como c-myc (negativamente) y ras (Plumb 1991, Thomson 1994).

### **PROTEÍNA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGOS (MIP)**

Las proteínas MIP pertenecen a la familia de las quimiocinas, las cuales fueron caracterizadas por su capacidad de reclutar a las células del sistema inmune al sitio de infección (quimiotaxis). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que estas proteínas también modulan a las células progenitoras hematopoyéticas. A mediados de los 70s Lord, Wright y colaboradores, identificaron una actividad presente en extractos de médula ósea normal, la cual inhibía a las unidades formadoras de colonias de bazo (CFU-S), restringiendo su proliferación y manteniéndolas en la fase G<sub>1</sub>-S. Estudios posteriores realizados por dos grupos de investigadores, purificaron y caracterizaron a ésta molécula nombrándola MIP-1 $\alpha$  e Inhibidor de las Células Seminales (SCI), respectivamente. SCI/MIP-1 $\alpha$  es una proteína secretada por los macrófagos de médula ósea, es una molécula pequeña de 8kDa, y puede llegar a formar grandes agregados no-covalentes. Su localización en el mapa genómico humano se encuentra cercana a la región 17q11-q21 la cual se asocia con varias patologías. El mRNA de MIP-1 $\alpha$  se encuentra en bajas concentraciones en médula ósea normal; en macrófagos no estimulados es detectado a nivel basal (Thomson 1994).

La regulación de su expresión génica se lleva a cabo a varios niveles: transcripcional, post-transcripcional (estabilidad y procesamiento del mRNA) y transduccional. Al igual que muchas citocinas, dependerá del tipo y estadio celular en el cual actúen las proteínas MIP para que ejerza una actividad inhibitoria o estimuladora (Axelrad 1990, Thomson 1994). Se ha encontrado que las proteínas MIP-1 y MIP-2 murina, actuando sinérgicamente con GM-CSF y M-CSF pueden aumentar el número de colonias de granulocitos-macrófagos (Broxmeyer H 1990, Graham 1990, Axelrad 1990, Thomson 1994).

La proteína MIP-1 $\alpha$  puede inducir la diferenciación de los osteoclastos y tiene una actividad estimuladora en progenitores maduros principalmente de la línea mieloide (CFU-GM), ya que no tienen ningún efecto en progenitores eritroides (BFU-E) estimulados con eritropoyetina (Epo). La actividad estimuladora de las

proteínas MIP se presenta únicamente cuando éstas actúan junto con otras citocinas (sinergismo). hasta la fecha no se ha encontrado que una proteína MIP posea actividad estimuladora por sí misma. La actividad más conocida de MIP-1 $\alpha$  es su capacidad para regular negativamente la proliferación de las células seminales hematopoyéticas. A diferencia de otros inhibidores como el TGF- $\beta$ , la respuesta de las células seminales hematopoyéticas hacia el MIP-1 $\alpha$  es rápida. La administración exógena de MIP-1 $\alpha$  disminuye el número de progenitores mieloides y la tasa de ciclo celular en la médula ósea y bazo de ratones (Broxmeyer H 1990, Graham 1990, Thomson 1994).

### **FACTOR DE NECROSIS TUMORAL -ALPHA (TNF- $\alpha$ )**

El TNF $\alpha$  es una glicoproteína de 17 kDa producida principalmente por macrófagos y linfocitos. Fue descubierto por dos líneas de investigación, una de ellas basada en su propiedad anti-tumorígena: y la otra basada en su alta toxicidad, implicado como mediador letal en la infección crónica y aguda. El gen del TNF $\alpha$  se localiza en el cromosoma 6. (Thomson 1994). Las principales células productoras de TNF $\alpha$  son los monocitos/macrófagos. Sin embargo, ésta citocina también es producida por linfocitos, células cebadas, queratinocitos, algunas células tumorales de colon, mama y cerebro. Así como líneas celulares de fibroblastos (3T3) (Isumi 1999), fibroblastos de tejido cardíaco (Yokoyama 1999), fibroblastos de dermis (Avalos-Diaz 1999) y de tejido nervioso periférico (Murwuani 1999). El estimulador más potente para la producción de TNF $\alpha$  son los lipopolisacáridos (LPS), en menor proporción el mismo TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6 y GM-CSF (Thomson 1994, Nagata 1997).

La mayor parte de las funciones biológicas conocidas del TNF $\alpha$  están mediadas por el receptor TNF- $\alpha$  R1. El TNF $\alpha$  R1 tiene un peso molecular de 55-60 kDa y modula la respuesta inmunológica normal, y al parecer es el encargado de mediar la respuesta citotóxica. El TNF $\alpha$  R2 pesa entre 75-80 kDa y a pesar de que se conoce menos de este receptor, se ha observado que esta implicado con la respuesta proliferativa del TNF $\alpha$  (Nagata 1997, Yuan 1997, Ashkenazi 1998).

Una de las características del receptor TNF $\alpha$  R1 es su dominio citoplásmico que consta de 70 aminoácidos denominado "dominio de muerte (DD)", el cual es esencial para que se lleve a cabo la transducción de señales. La función más importante del receptor TNF $\alpha$ - R1 es su capacidad para inducir apoptosis y activar al factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Estas rutas de señalización son disparadas por la unión del ligando al receptor, lo que conlleva a su trimerización. El receptor puede disparar dos rutas de señalización. En la primera, el DD del receptor se asocia con TRADD y FADD, en un segundo paso, la forma pro-enzimática de

la caspasa 8 (conocida como FLICE, MACH y Mch5) se une al complejo interactuando con el dominio efector de muerte (DED) de FADD y la molécula de caspasa 8. Esta ruta puede ser bloqueada por FLIP pero no por Bcl-2 (Nagata 1997, Yuan 1997, Ashkenazi 1998). La segunda ruta, involucra a las proteínas TRADD y RIP, la unión de estas proteínas al receptor oligomerizado, puede llevar a la inducción de apoptosis vía cascada de caspasas o la formación de ceramida como segundo mensajero; o esta misma ruta puede llevar a la activación del factor de transcripción NFκB y la subsecuente expresión de factores de supervivencia a través de la unión de TRAF-2 (Nagata 1997, Yuan 1997, Ashkenazi 1998).

El TNFα ha sido implicado como causante de anemia en varias enfermedades. Inyecciones repetidas de TNFα causan una disminución en la masa de células rojas y el hematocrito, debido a que la hematopoyesis es inhibida. Una exposición prolongada de IL-1 induce la producción de TNFα y una consecuente inhibición de la hematopoyesis. Se ha observado que el TNFα puede inducir la proliferación de células inmaduras, mientras que induce la apoptosis en células maduras (Nagata 1997, Yuan 1997, Ashkenazi 1998).

Uno de los principales efectos biológicos del TNFα es la inducción de la producción de otras citocinas que se encargan de amplificar su efecto. Una vez iniciada la cascada, como respuesta a una invasión, daño o infección, ésta persiste por varias horas o días. El TNFα es un factor esencial para la respuesta inmune contra bacterias gram-negativas, ya que induce la expresión de IL-1 e IL-6 (Nagata 1997, Yuan 1997, Ashkenazi 1998).

#### 4.3.2. MATRÍZ EXTRACELULAR (MEC)

La matriz extracelular es una estructura altamente organizada, compuesta de glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos que son secretados por las células del estroma medular. Las funciones de la matriz extracelular incluyen: la mediación de la unión celular, la unión de factores de crecimiento y la inducción de la autorenovación y diferenciación de las células hematopoyéticas (Gordon 1988).

La adhesión de las células hematopoyéticas a las células del estroma es importante para el “homing” de los progenitores hematopoyéticos y para el control de la liberación de las células maduras hacia la sangre. Esta adhesión esta mediada por las moléculas de la matriz extracelular y por la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células hematopoyéticas. Las moléculas de la matriz interactúan con receptores de membrana de las células hematopoyéticas, fijándolas en un determinado nicho hematopoyético (Testa 1993, Adams 1993). La matriz extracelular se compone principalmente por:

- ◆ Colágenas.- es una familia de proteínas fibrilares que se encuentra en todos los organismos multicelulares. Las moléculas de colágena son secretadas y producidas por células de tejido conjuntivo, así como por una variedad de células. En el MH medular, las moléculas de colágena son producidas fundamentalmente por las células endoteliales y reticulares. El papel de las moléculas de colágena *in vitro* ha sido estudiado utilizando agentes que bloquean su síntesis. Estos estudios han demostrado que al bloquear su síntesis, se reduce la hematopoyesis. *In vitro*, se ha identificado la presencia de la colágena tipo I, III, IV y V en el MH medular, lo que sugiere que tengan un papel importante en el mantenimiento de la hematopoyesis. Estudios *in vitro* han demostrado que los progenitores mieloides y eritroides se unen a la colágena, y que su unión es importante para su maduración. (Koenigsmann 1992, Alberts 1994).
  
- ◆ Fibronectina.- es una molécula ubicua presente en forma soluble en el plasma y de forma insoluble en la matriz extracelular. Es una glicoproteína producida por las células reticulares y macrófagos. Es secretada como un dímero, con enlaces disulfuro cerca del carboxilo terminal. Es una proteína organizada en dominios funcionales con sitios de enlace para colágena, heparán sulfato y trombospondina. Tiene un papel importante en la migración, la diferenciación celular y la adhesión de progenitores hematopoyéticos inmaduros a las células del estroma. Es uno de los principales componentes de la matriz extracelular tanto *in vivo* como en los cultivos a largo plazo y tiene funciones importantes en la estabilidad de la matriz extracelular (Gordon 1988, Lerat 1993, Potts 1994, Yoder 1995).
  
- ◆ Laminina.- es una larga glicoproteína con múltiples dominios y sitios de adhesión. Es uno de los mayores componentes de la matriz extracelular; a esta molécula se adhieren desde células inmaduras como células CD34<sup>+</sup>, así como progenitores de granulocitos y células maduras como los monocitos y neutrófilos. Es producida por las células endoteliales (Alberts 1994, Gordon 1988).
  
- ◆ Proteoglicanos.- proteínas con cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG), los cuales son polisacáridos no ramificados, constituidos por unidades repetidas de disacáridos con carga negativa. Se han identificado cuatro tipos de GAG: heparán sulfato, ácido hialurónico, desmatán sulfato y condroitín sulfato. El heparán sulfato es uno de los principales glicosaminoglicanos de los cultivos a largo plazo, estos proteoglicanos interactúan con la laminina y la colágena tipo IV. El hecho de que los proteoglicanos sean producidos tanto por células del estroma como por células hematopoyéticas sugiere un papel muy importante en la interacción célula – célula y en la interacción célula - matriz extracelular. Los proteoglicanos se localizan tanto en la superficie de las células estromales como formando parte de



la matriz extracelular. Diversos estudios han demostrado la importancia de los proteoglicanos y los glicosaminoglicanos en la estimulación de la hematopoyesis. Trabajos realizados en cultivos a largo plazo muestran un incremento de 5 veces de progenitores hematopoyéticos cuando se aumenta la síntesis de estas moléculas. Los proteoglicanos adheridos a las células estromales juegan un papel importante en la presentación de citocinas dentro del microambiente hematopoyético. (Alberts 1994, Gordon 1988, Long 1993).

- ◆ Hemonectina.- es una glicoproteína de 60kd, es importante para mediar la adhesión de la línea granulocítica a la médula. Se encuentra *in vivo* en la parte exterior de las espículas del hueso. Esta proteína es expresada en tejidos hematopoyéticos durante el desarrollo de los embriones murinos y en los humanos estudios con cultivos a largo plazo han podido identificar a células hematopoyéticas no estromales como sus principales productores. En estos cultivos, además se ha demostrado la importancia de la hemonectina para la adhesión de progenitores hematopoyéticos (Long 1993).
- ◆ Trombospondina.- es una molécula grande, trimérica. Funciona como una molécula de citoadhesión; posee dominios que interactúan con la colágena y fibronectina. Es secretada por células endoteliales, células de músculo liso, y megacariocitos. La trombospondina actúa como una molécula de citoadhesión para las células seminales hematopoyéticas y para los progenitores mieloides, megacariocíticos y eritroides. Sin embargo, los granulocitos y eritrocitos maduros pierden su capacidad de unirse a la trombospondina (Alberts 1994, Gordon 1988, Long 1993).

## V. INTERACCIONES EN EL MICROAMBIENTE HEMATOPOYETICO

Los componentes del MH pueden regular la hematopoyesis tanto negativa como positivamente a través de diversos mecanismos que incluyen el contacto entre células hematopoyéticas y células del estroma, la interacción entre células hematopoyéticas y las moléculas de la matriz extracelular y la producción y secreción de citocinas tanto solubles como unidas a células del estroma (FIGURA 3) (Mayani 1992):

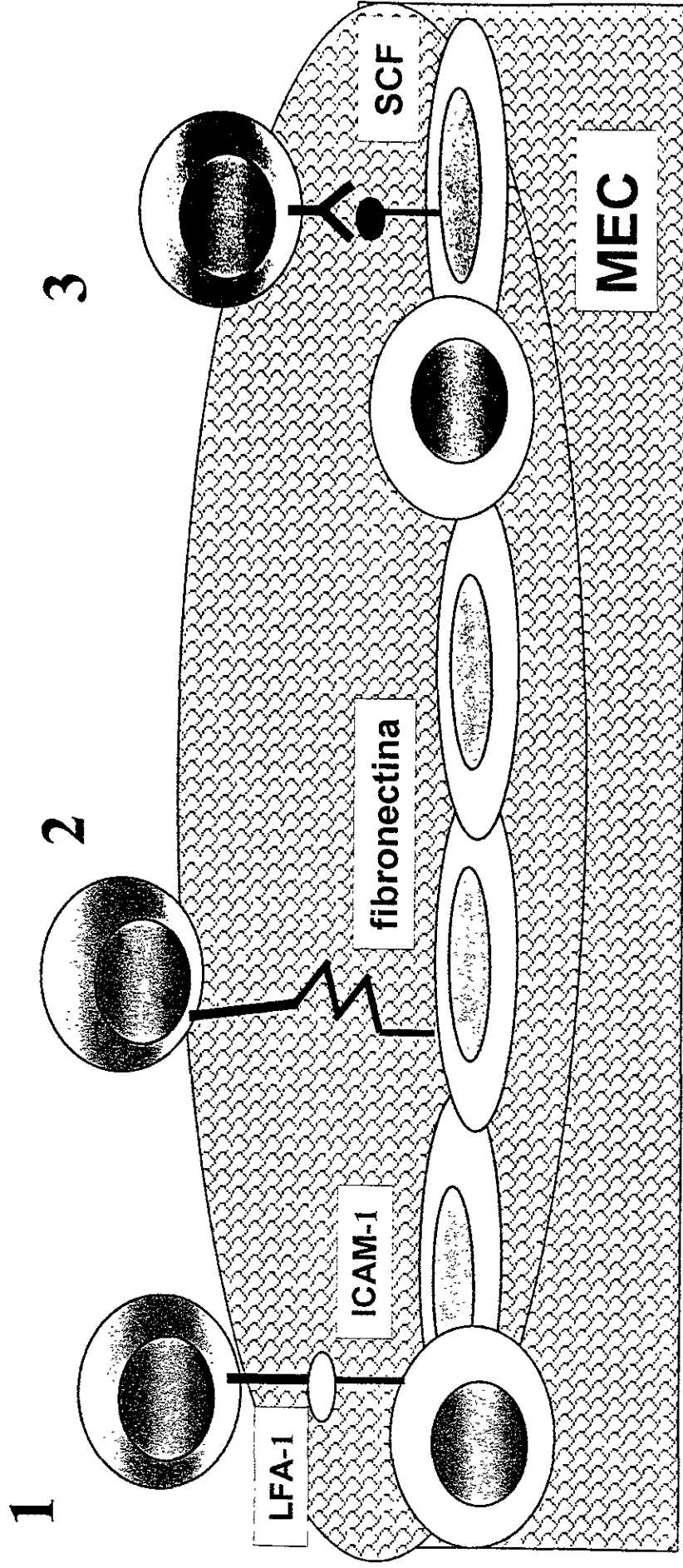
### 5.1 Contacto directo entre células hematopoyéticas y células del estroma

Análisis morfológicos tanto en médula ósea como en los cultivos a largo plazo han demostrado que las células del estroma y las células hematopoyéticas se encuentran en estrecha relación. A pesar del hecho de que se han encontrado progenitores hematopoyéticos en circulación, se sabe que dichos progenitores proliferan y se desarrollan únicamente en la médula ósea (en los organismos adultos) y en condiciones normales, la mayor proporción de células salen a circulación únicamente cuando han alcanzado el estado de maduración apropiado. En los LTMC se ha observado que los progenitores más inmaduros se encuentran asociados a la capa adherente y conforme van madurando pierden su capacidad de adhesión y se localizan en la fracción no adherente (Eaves 1991, Long 1993). La capa de estroma provee las condiciones óptimas para el desarrollo de las células hematopoyéticas. Se ha demostrado en los LTMC que los osteoblastos (Dorshkind 1990), y células endoteliales (Rafii 1995) son capaces de soportar la hematopoyesis *in vitro*.

Wineman et al (1996) aislaron distintas líneas celulares de estroma (de hígado fetal murino) y encontraron que dentro del MH existe una gran variedad de "nichos hematopoyéticos". Los nichos hematopoyéticos se refieren a regiones dentro del microambiente hematopoyético que poseen distinta capacidad de soportar la hematopoyesis. Así, caracterizó a líneas que no soportaban el crecimiento de CSH, líneas que soportaban bajos niveles de CSH, y líneas que permitían el desarrollo de las CSH. Estas últimas, eran las más infrecuentes. Por lo anterior se piensa que *in vivo* existan regiones específicas para el desarrollo de los distintos componentes hematopoyéticos. Esto ha sido corroborado con diversos estudios en donde se ha observado que la capa de estroma actúa tanto positiva como negativamente en las células seminales hematopoyéticas. Verfaillie y Catanzaro (1996) demostraron que el contacto directo entre las LTC-IC humanas y una línea celular estromal (M2-10B4) inhibía su crecimiento, mientras que cuando utilizaban cámaras de difusión que permiten el paso de moléculas solubles pero restringen el contacto directo entre las células, observaron un aumento en el número de progenitores. Utilizando capas de estroma fijadas con glutaraldeído encontraron que dicha inhibición está mediada por señales inhibitorias de las moléculas de adhesión y no por el contacto con citocinas inhibitorias presentes en esta capa. Por otra parte, Taichman et al

Figura 3

## Interacciones Moleculares



1. Contacto directo entre células del estroma y células hematopoyéticas, 2. Interacción entre células hematopoyéticas y moléculas de la matriz extracelular, 3. Interacción mediante la producción de citocinas

(1997) encontraron que en cultivos líquidos, el contacto con capas de osteoblastos, incrementaba el número de LTC-IC en el cultivo y favorecía el desarrollo de progenitores mieloides.

Las moléculas de adhesión se clasifican en tres grandes familias: (1) la superfamilia de las inmunoglobulinas, (2) la familia de las integrinas y (3) la familia de las selectinas. La familia de las inmunoglobulinas comprende a un grupo de moléculas de citoadhesión que median tanto el reconocimiento del antígeno como la comunicación célula - célula. Esta familia se define por la presencia de un dominio de 90 a 100 pb que se localiza dentro de un dímero de 2 cadenas  $\beta$  antiparalelas. Algunos miembros de esta familia son las moléculas: LFA-2, LFA-3, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y las moléculas de histocompatibilidad. ICAM-2 se expresa constitutivamente en las células endoteliales e ICAM-1 se expresa en una gran variedad de tejidos; en el sistema hematopoyético se expresa aproximadamente en el 20% al 30% de los progenitores eritroides pero no en células eritroides maduras, en el 50% de los progenitores mieloides y en los macrófagos (Torok-Storb 1988, Hynes 1992, Long 1993).

Los miembros de la familia de las integrinas son los receptores más importantes para mediar la adhesión tanto a células como a moléculas de la matriz extracelular. La adhesión celular a las integrinas es un proceso rápido que resulta de un aumento en la afinidad de los receptores más que de su sobreexpresión. Todas las integrinas son heterodímeros de cadenas  $\alpha$  -  $\beta$  y son expresadas en una gran variedad de células (Hynes 1992). Una sola integrina puede unir a más de un ligando. Así como un mismo ligando puede ser reconocido por más de una integrina. Algunos miembros de esta familia son: LFA-1, Mac1, VLA-1, VLA-4, VLA-5 (receptor de la fibronectina) y el receptor de la vitronectina entre otras. LFA-1 (expresado en monocitos y linfocitos T) es el ligando del receptor ICAM-1 (expresado en células endoteliales), VLA-4 (expresado en linfocitos y monocitos) es receptor de VCAM (expresado en células endoteliales). En la línea linfoide se ha observado que la expresión de VLA-4 en los progenitores de linfocitos B es esencial para su desarrollo, ya que anticuerpos anti-VLA-4 o anti-VCAM-1 (su correceptor en células estromales) lleva a la inhibición de la linfopoyesis en cultivos líquidos (Hynes 1992). Los miembros de la familia de las selectinas son receptores de citoadhesión que estructuralmente contienen un dominio de unión a lectina N-terminal calcio - dependiente, un dominio EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal) y una región rica en cisteínas. Existen tres tipos de selectinas: las L-selectinas, algunas de las cuales se encuentran en los linfocitos y son importantes para su reingreso a los nódulos linfáticos, otras como CD44 y LFA-1 son importantes en la adhesión celular. Las E-selectinas se encuentran en las células endoteliales y permiten la interacción con leucocitos y algunas células tumorales. Finalmente las P-selectinas que se localizan principalmente en las plaquetas pero también son expresadas por células endoteliales (Long 1993).

## 5.2. Interacción entre células hematopoyéticas y las moléculas de la matriz extracelular

Sin duda alguna, el componente extracelular del MH juega un papel muy importante en la regulación de la proliferación, de la diferenciación y de las funciones metabólicas de las células. Las moléculas de la MEC producidas por las células del estroma se encuentran en constante cambio para cubrir la demanda de células hematopoyéticas. Además de proveer una estructura de anclaje, la MEC facilita la comunicación célula – célula y juega un papel muy importante en la localización y estabilización de los factores de crecimiento. Es además parte importante del mecanismo de migración y “homing” de los progenitores hematopoyéticos (Gordon 1988).

La mayor parte de la información referente al estudio de las moléculas de la MEC se debe a la utilización de los cultivos a largo plazo. En los cultivos a largo plazo, la mayor parte de los progenitores hematopoyéticos se localizan en la MEC producida por las células adherentes (Long 1993).

La adhesión de las células hematopoyéticas con la matriz extracelular se lleva a cabo por medio de proteínas receptoras de membrana. La fibronectina posee un dominio de unión celular específico (RGD) que le permite mediar la localización de precursores linfoides y eritroides. Así mismo, la hemonectina y el heparán sulfato median la unión de los progenitores mieloides (Gordon 1988, Long 1993).

La unión a las distintas moléculas de la MEC es específica y depende no solamente del tipo celular sino del estadio de diferenciación en que se encuentre la célula. Por ejemplo, en los progenitores eritroides la capacidad de adhesión a la fibronectina se va perdiendo conforme la célula va madurando. De esta forma los progenitores eritroides (CFU-E) tienen una mayor capacidad de unirse a la fibronectina que los precursores más maduros como los pro-eritroblastos. Además la expresión de la adhesión a la fibronectina durante la diferenciación eritroide está relacionada con la capacidad migratoria de las células (Vuillet-Gaugler 1990).

La interacción entre las células hematopoyéticas y las moléculas de la MEC se lleva a cabo no solamente a través de su presentación por parte de las células estromales en la fracción adherente de los cultivos. Ha sido demostrado *in vitro* (Gupta P 1996) que el heparán sulfato soluble secretado por las células estromales es esencial para el mantenimiento y expansión de las células hematopoyéticas primitivas (LTC-IC).

### 5.3 Producción y secreción de citocinas tanto solubles como unidas a células del estroma.

A pesar de que en los cultivos a largo plazo no han sido detectadas cantidades importantes de citocinas hematopoyéticas en forma soluble, si han sido detectadas unidas a las capas adherentes. Los factores de crecimiento unidos a las moléculas de la matriz extracelular o a las células del estroma son presentados a las células hematopoyéticas adheridas a esta capa. Diversos estudios han mostrado que el GM-CSF y la IL-3 pueden unirse a los glicosaminoglicanos presentes en la MEC del estroma y el TGF- $\beta$  puede unirse a la fibronectina. Así como se han encontrado formas membranales de M-CSF e IL-1 en macrófagos y monocitos y de IL-1 $\beta$  en células endoteliales. La compartimentalización selectiva de los factores de crecimiento hematopoyéticos es una de las funciones importantes del MH para la regulación de las células hematopoyéticas. Así como la producción de citocinas por parte de células del estroma puede modificar a las células hematopoyéticas, estudios realizados por Taichman et al (1997), han demostrado que las células hematopoyéticas CD34+ son capaces de inducir la producción de citocinas (IL-6, factor inhibidor de leucemia (LIF)) por parte de los osteoblastos (Torok-Storb 1988, Long 1993).

## VI. APOPTOSIS EN EL SISTEMA HEMATOPOYETICO

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular fisiológico. es una forma de muerte más sutil que se caracteriza por una autodigestión controlada de la célula. Las células son removidas sin alterar a las células vecinas. Es un proceso que depende de la expresión intrínseca de la maquinaria suicida de la célula, por lo que es un mecanismo activo que requiere de energía y de la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) y proteínas. Al parecer las células inician su propia muerte a través de la activación de proteasas endógenas (Ellis 1991. Cohen 1993).

Los cambios morfológicos que ocurren en la apoptosis incluyen: una desorganización del citoesqueleto, condensación de la célula al perder volumen citoplásmico, la condensación de cromatina, fragmentación nuclear y rompimiento del ADN en sitios internucleosómicos. La membrana se fortalece para evitar la lisis y comienza a fragmentarse en vesículas denominadas cuerpos apoptóticos. La fosfatidilserina que normalmente se localiza en la membrana interna, es expuesta hacia el exterior, lo que permite el reconocimiento y la fagocitosis de estos cuerpos apoptóticos por fagocitos profesionales o células vecinas (Steller 1995, Israels 1999).

La apoptosis es un mecanismo de remoción celular rápido y eficiente de células que han cumplido su tiempo de vida, están dañadas, o representan una amenaza para el organismo. Las causas de muerte celular durante el desarrollo normal y la homeostasis, pueden dividirse en cinco categorías que son: (1) células que al parecer no tienen una función, (2) células que han sido producidas en exceso, (3) células que se desarrollan inapropiadamente, (4) células que terminaron con su función , (5) células que son dañinas para el organismo (Israels 1999).

Los mecanismos de muerte celular se encuentran ampliamente conservados evolutivamente. Sin importar el estímulo que haya disparado el fenómeno apoptótico, éste sigue rutas comunes en las cuales interactúan tanto factores de transcripción, proteasas, nucleasas y familias de proteínas como la familia Bcl. Todos estos componentes participan en una red de señales que culmina con la muerte de la célula (Steller 1995, Wickremasinghe 1999).

En el sistema hematopoyético, muchos de los factores de crecimiento promueven la supervivencia de las células hematopoyéticas suprimiendo la apoptosis. Las células CD34+ en estado quiescente requieren de la continua presencia de la IL-3 y el GM-CSF para sobrevivir *in vitro*. En el linaje mielóide se ha demostrado que el

GM-CSF provee señales de supervivencia a los neutrófilos; el SCF y la IL-3 suprimen la apoptosis en las células cebadas y en las células progenitoras. En el linaje eritroide, es necesaria la presencia de la eritropoyetina para inhibir la apoptosis en los progenitores inmaduros (BFU-E) y en los progenitores más maduros (CFU-E) (Chapman. 1996, Thompson 1995.)

Así como existen citocinas y factores de crecimiento que previenen la muerte celular, existen otro grupo de citocinas que la estimulan. El factor de crecimiento transformante beta (**TGF- $\beta$** ) y el TNF- $\alpha$  pueden promover la apoptosis en progenitores primitivos aun cuando estos se encuentren en presencia del ligando de Flt-3. El IFN gama provoca la muerte celular de progenitores inmaduros (LTC-IC) *in vitro*, y su acción es más potente cuando es secretada por células del estroma que cuando es añadida (Chapman 1996, Thompson 1995).

Como puede observarse las citocinas presentan una selectividad para prevenir la apoptosis, es decir actúan dependiendo del linaje o del estadio celular. El ligando de Flt-3, es selectivo para progenitores mieloides y la eritropoyetina para progenitores eritroides (Chapman 1996, Thompson 1995).

Las moléculas de adhesión también pueden prevenir la apoptosis, en la médula ósea los progenitores linfoides del linaje B, requieren del contacto directo con las células del estroma para poder sobrevivir. Este contacto es dependiente de la interacción entre las  $\beta 1$  integrinas VLA-4 y VLA-5 expresadas en la superficie de las células B y por la fibronectina generada por los fibroblastos (Chapman. 1996, Thompson 1995).

El aumento en el tiempo de supervivencia, la pérdida de la capacidad de diferenciación o la proliferación descontrolada de las células hematopoyéticas, puede ocasionar la perdida del balance entre la muerte y la proliferación celular, lo que claramente promovería el desarrollo de patologías hematológicas como la leucemia y el linfoma. En la mayoría de las patologías hematológicas se presentan alteraciones en los mecanismos de apoptosis; así tenemos algunas que se caracterizan por una inhibición en la apoptosis como el linfoma folicular y la leucemia linfocítica crónica y otras que se caracterizan por un aumento en los niveles de apoptosis como en el linfoma de Burkitt y los Síndromes Mielodisplásicos (Thompson 1995, Raza 1994).



## VII. SINDROMES MIELODISPLASICOS (SMD)

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) se definen como alteraciones primarias neoplásicas de las células seminales hematopoyéticas que en una elevada proporción de los casos se transforman a leucemia mieloide aguda (LMA). Se caracterizan por una o más citopenias en sangre periférica junto con cambios displásicos en la médula ósea (Mayani 1993, Mayer 1996, Greaves 1993, Koeffler 1992, Hofmann 1996). Los SMD han sido uno de los padecimientos hematológicos que más han presentado retos para el hematólogo-oncólogo debido a que su diagnóstico es de exclusión y hasta la fecha no se cuenta con una terapia curativa. Existe una gran variabilidad en el comportamiento tanto clínico como biológico en estos pacientes, lo que dificulta su estudio. Aunque no se cuenta con un registro estadístico de la incidencia de este padecimiento ni en México ni en los Estados Unidos de Norte América, el registro Europeo (1996) reportó una incidencia de 3/100 000/año. Esta incidencia es mayor a la de los casos de LMA en pacientes adultos, a pesar de que el número de pacientes se encuentra sub-valorado por su difícil diagnóstico (Kouides, Bennett, 1997). La incidencia de casos de SMD ha crecido durante los últimos años, posiblemente por el aumento en la población adulta, por lo que su estudio es de gran interés en la medicina pública.

### 7.1. Historia

A comienzos del siglo XX, comenzaron a surgir reportes en donde se describían una alta mortalidad en trastornos citopénicos, refractarios al tratamiento. Chevallier et al en 1942 propusieron el término de “odo-leucemia”. El eligió el término griego “odo” que significa comienzo; para resaltar que estos trastornos son el comienzo a la leucemia. En 1949, Hamilton-Peterson utilizó el término “preleucemia”, para describir a pacientes con anemia refractaria que antecedía al desarrollo de leucemia mieloide aguda (LMA). Cuatro años más tarde Block y colaboradores ampliaron el concepto para incluir citopenias de todas las líneas. Desde mediados de siglo este tipo de trastornos han recibido múltiples denominaciones dentro de los más comunes encontramos: “preleucemia”, “síndromes preleucémicos” y “síndromes dismielopoyéticos”(Beutler<sup>b</sup> 1995).

### 7.2. Clasificación

Los SMD pueden ser divididos en primarios; los cuales se refieren a trastornos que se presentan *de novo*, y secundarios, los cuales incluyen condiciones congénitas o adquiridas. Los SMD secundarios se relacionan con agentes tóxicos, como agentes alquilantes y radiación, o a terapia en el tratamiento de enfermedades

malignas (Beutler 1995, Hofmann 1996, Koudies, Bennett 1996). En el presente estudio abordaremos únicamente el estudio de los SMD primarios.

En 1982, el grupo franco-americano-inglés (FAB) propuso un esquema de clasificación para los SMD. Esta clasificación define cinco subgrupos: anemia refractaria (AR), anemia refractaria con sideroblastos (ARS), leucemia mielomonocítica crónica (LMMC), anemia refractaria con exceso de blastos (AREB) y anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t). La clasificación se basa en la cuenta de blastos tanto en sangre periférica como en médula ósea, el grado de displasia tanto de la sangre periférica como de médula ósea, la presencia o no de sideroblastos y de monocitosis (Beutler 1995, Kouides 1997). En el siguiente cuadro se observa el porcentaje de blastos de acuerdo al subtipo de síndrome mielodisplásico, tanto en sangre periférica como en médula ósea:

TIPO	SANGRE PERIFERICA	MEDULA OSEA
Anemia Refractaria (AR)	<1% blastos	<5% blastos
Anemia Refractaria con Sideroblastos (ARS)	<1% blastos	<5% blastos con sideroblastos
Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC)	<5% blastos con monocitosis ( $>1 \times 10^9 / L$ )	5-20% blastos
Anemia Refractaria con Exceso de Blastos (AREB)	<5% blastos	5-20% blastos
Anemia Refractaria con Exceso de Blastos en Transformación (AREB-t)	>5% blastos	20-30% blastos

Mayer JR, Canellos GP. 1996. Leukemia. Saunders Company.

### 7.3. Características Clínicas y Diagnóstico

Los SMD se presentan con mayor frecuencia en individuos mayores de 50 años de edad, siendo la edad promedio de 70 años (Mayani 1993, Mayer 1996, Greaves 1993, Koeffler 1992, Hofmann 1996). Únicamente el 10% al 20% de los pacientes son menores de 60 años. A pesar de la predominancia en pacientes de edad avanzada, los SMD también han sido descritos en individuos jóvenes y en niños (Koeffler 1992). A diferencia de los pacientes con LMA, los pacientes con SMD por lo general son asintomáticos a pesar de la anemia y en muchas ocasiones son diagnosticados como resultado de pruebas hematológicas de rutina. Los hallazgos hematológicos pueden incluir anemia, neutropenia y/o trombocitopenia. Sin embargo una menor proporción de pacientes puede cursar únicamente con leucocitosis, trombocitosis o trombocitopenia aislada. La anemia es la más constante y se presenta en 85% de los pacientes.

En una baja proporción de los casos (menos del 10%) puede presentarse síntomas hemorrágicos por trombocitopenia y en aproximadamente 10% de los casos se presentan infecciones debidas a la neutropenia (Koeffler 1992). Entre el 10 y 20% de los pacientes presentan esplenomegalia, y se observa hepatomegalia en el 5 al 25% de los casos, la cual es más común en uno de los subtipos de SMD (LMMC) (Hofmann 1996). Es muy infrecuente que los SMD se encuentren asociados con trastornos en la piel. En pacientes con monosomía 7 o deleciones en el cromosoma 7 existe una probabilidad de desarrollar diabetes insipidus. Síntomas comunes pero inespecíficos son, la perdida del apetito y la perdida de peso. Los pacientes en ocasiones presentan un decremento de las células NK y de linfocitos T cooperadores (Mayani 1993, Mayer 1996, Greaves 1993, Koeffler 1992, Hofmann 1996). La médula ósea es normocelular o hiper celular en la mayoría de los casos. Sin embargo una proporción de pacientes cursa con una médula hipocelular. Los pacientes hipocelulares son de difícil diagnostico y en ocasiones se confunden con pacientes con anemia aplástica (Mayani <sup>h</sup> 1993, Mayer 1996, Greaves 1993, Koeffler 1992, Hofmann 1996). Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan cariotipos anormales. Dentro de los cambios citogenéticos se pueden encontrar anormalidades tanto numéricas como estructurales. Las anormalidades cromosómicas que se presentan mas frecuentemente involucran a los cromosomas 5,7,8,11,12 y 20. Siendo los más comunes las deleciones del brazo largo del cromosoma 5 y la trisomía del cromosoma 8. La presencia de anormalidades cromosómicas varia dependiendo del subtipo clínico, los pacientes con AREB y AREB-t presentan con mayor frecuencia cariotipos anormales, con excepción de la del(5)(q13q133) y de la del(11)(q14q23) que se asocian con AR y ARS respectivamente (Bernasconi 1994). Como parte del diagnóstico son importantes la presencia de células con características displásicas, las cuales se presentan tanto en médula ósea como en sangre periférica. Los cambios displásicos pueden presentarse en las tres líneas hematopoyéticas y para confirmar el diagnóstico estos deben presentarse en por lo menos el 10% de las células. Los principales cambios displásicos se resumen en la siguiente tabla:

	Sangre Periférica	Médula ósea
<b>Serie Eritroide</b>	<b>Anemia</b> , macro-ovalocitosis, poiquilocitosis, anisocitosis, células rojas nucleadas	Eritropoyesis megaloblástica, sideroblastos en anillo
<b>Serie Mieloide</b>	<b>Neutropenia</b> , neutrófilos hipersegmentados, metamielocitos circulantes, pseudo-pelger-hüet	Hiperplasia mieloide, arresto parcial de la maduración en el estadio de mielocito, incremento de las formas monocitoides, formas blásticas (<5-30%)
<b>Serie Trombocitoide</b>	<b>Trombocitopenia</b> , plaquetas disfuncionales, alargadas y atípicas	Número incrementado de megacariocitos, pequeños y granulados

Mayer JR, Canellos GP. 1996. Leukemia. Saunders Company.

#### 7.4. Factores Pronósticos

De acuerdo con la clasificación de la FAB (1982), la supervivencia y la probabilidad de transformación leucémica varia dependiendo del subtipo. Los pacientes con AR y ARS pueden permanecer estables por años sin que la anemia o los síntomas empeoren, su transformación a leucemia oscila entre el 10 y el 17% y tienen una supervivencia promedio de 45 meses. Por otra parte, el tiempo de supervivencia es más corto (~10 meses) en pacientes con un número incrementado de blastos en la médula ósea, como en los subtipos AREB y AREB-T y su transformación a leucemia es hasta del 50%. Para el subtipo LMMC su supervivencia media es de 30 meses y tiene una probabilidad del 20% de transformarse en LMA. A pesar de que esta clasificación permite establecer los factores pronósticos según el subtipo clínico, tiene muchas deficiencias pues existen un gran número de pacientes con SMD que no pueden ser clasificados dentro de los 5 subtipos convencionales, además de que no considera el cariotipo, el nivel de displasia y la celularidad medular. Características que ya ha sido documentado, tienen un impacto importante en la supervivencia y en la transformación leucémica de los pacientes (Kouides, Bennett 1997).

A partir de la clasificación de 1982 han surgido por lo menos 6 clasificaciones adicionales que intentan incluir tanto factores clínicos como patológicos y biológicos para poder predecir de mejor medida la supervivencia y el riesgo de una transformación leucémica. Estas clasificaciones incluyen el grado de citopenia, el porcentaje de blastos, la citogenética de médula ósea, la presencia de fibrosis, la histología y localización anormal de los precursores, el inmunofenotipo y las características en cultivos *in vitro*. Sin embargo ninguna de estas clasificaciones llevó a una clasificación precisa y clara de los factores pronósticos en los pacientes. Por esto en 1997 se llevó a cabo un seminario internacional para el análisis de los factores de riesgo en los pacientes con SMD que desarrolló un sistema de clasificación que combina parámetros de las anteriores clasificaciones denominado: Sistema Internacional de Pronóstico y Clasificación (IPSS por sus siglas en inglés) (Greenberg 1997). Este sistema permite además de clasificar adecuadamente a los pacientes con SMD en cuatro diferentes grupo de riesgo, permite un mejor manejo en la elección de la terapia en cada paciente. El sistema IPSS permite estratificar a los pacientes en cuatro grupos de riesgo: bajo, intermedio-1, intermedio-2 y de alto riesgo. La estratificación por edad permite separar a pacientes de menos de 60 años en el grupo de riesgo bajo y a los mayores de 60 años en el grupo de riesgo intermedio. Este tipo de sistema permite la clasificación de los pacientes de acuerdo al porcentaje de blastos en médula ósea, el cariotipo y el número de citopenias presentes. El IPSS puede discriminar entre los subgrupos de otros tipos de clasificaciones. Por ejemplo en algunos casos, los subtipos AR y ARS se encuentran dentro del grupo de bajo riesgo y de riesgo intermedio-1 y los subtipos AREB y AREB-t en el grupo de riesgo intermedio-2 y alto (Greenberg 1997).

## 7.5. Historia natural y complicaciones clínicas

Debido a que los SMD se presentan en pacientes de edad avanzada, comúnmente la muerte esta relacionada con otros padecimientos ajenos al SMD. Aproximadamente el 20% de los pacientes muere de otra complicación no relacionada con esta enfermedad. La tercera parte de los pacientes se transforma a LMA y muere a consecuencia de la misma. En los pacientes que si mueren por SMD, la mayor parte de las muertes (~64%) es causada por infecciones resultado de la neutropenia. El 60% de los pacientes tiene cuentas de neutrófilos menores de 2500/ $\mu$ l. Además de que la clona mielodisplásica presenta anormalidades en el funcionamiento de los granulocitos, en donde las funciones de adhesión, fagocitosis y quimiotaxis se encuentran alteradas, por lo que en ocasiones se inicia con terapia profiláctica con antibióticos. Menos común que las infecciones pero también otra causa de muerte son las hemorragias, que pueden ocurrir aún en ausencia de trombocitopenia como resultado de un funcionamiento anormal de las plaquetas (Kouides, Bennett 1997).

Los pacientes con SMD pueden también presentar una amplia gama de enfermedades autoinmunes relacionadas con procesos inflamatorios. El uso de agentes inmunosupresores en estos pacientes, mejora no solamente las manifestaciones autoinmunes sino también mejora las citopenias. Se ha observado también, que los pacientes con SMD tienen una mayor incidencia de tumores malignos que la población general. Se piensa que el incremento en el riesgo a desarrollar tumores malignos refleja un defecto en el sistema inmune que condujo al surgimiento de la clona SMD anormal en el sistema hematopoyético en estos pacientes (Kouides, Bennett 1997).

## 7.6. Tratamiento

El tratamiento en los pacientes con SMD puede clasificarse en tres distintas categorías de acuerdo al tipo de terapia: (1) la terapia de diferenciación de la clona anormal, que puede ser inducida con el uso de citocinas o factores inductores de la diferenciación; (2) la terapia de supresión de la clona anormal, mediante el uso de quimioterapia de baja dosis para suprimir la hematopoyesis anormal o el uso de citocinas que estimulen la hematopoyesis normal o el uso de inmunoterapia; y finalmente (3) la terapia de eliminación de la clona anormal, mediante el trasplante alogénico de medula ósea (BMT) (Kouides, Bennett 1997). La elección en el tipo de terapia depende fundamentalmente de tres factores: la severidad de la citopenia, el grado de progresión leucémica y la edad del paciente. Estos factores se encuentran reflejados en la clasificación IPSS (Greenberg 1997, Mayer 1996, Greaves 1993, Koefler 1992, Hofmann 1996).

La principal meta en el paciente de edad avanzada es la de controlar las citopenias mediante el uso de la terapia de sostén que incluye el uso de transfusiones y antibióticos. mientras que en el paciente joven lo que se persigue es el uso de una terapia curativa como el BMT. El tipo de tratamiento puede dividirse en dos grupos de acuerdo a la clasificación IPSS: el grupo de riesgo intermedio-2 y alto, y el grupo de riesgo intermedio-1 y bajo (Greenberg 1997).

**Grupo de Riesgo Alto y Riesgo Intermedio-2:** debido a que la supervivencia media de estos pacientes es de aproximadamente un año, el uso de terapia agresiva debe de ser considerada. La terapia incluye el uso del trasplante de médula ósea (BMT) en los pacientes que tienen por lo general menos de 50 años. El porcentaje de supervivencia libre de enfermedad varia entre el 20 y el 70%. Los factores que influyen en la respuesta son: la edad del paciente, su subtipo clínico, el tipo de régimen de acondicionamiento, el uso de quimioterapia intensiva y si la medula ha sido depletada de linfocitos T. El uso de quimioterapia también puede ser una elección en estos pacientes, en donde se incluyen el uso de nuevos agentes como la 2-clorodeoxiadenosina, y el topotecan. Uno de los agentes que ha tenido una mejor respuesta es el uso del inhibidor de la topoisomerasa I con el que se consiguió un 25% de remisión completa (Greenberg 1997).

**Grupo de Riesgo Intermedio-1 y Bajo Riesgo:** el tratamiento en estos grupos depende básicamente del grado de las citopenias. En pacientes con anemia dependientes de transfusion, es recomendable el uso de la eritropoyetina en pacientes con AR, bajos niveles de TNF $\alpha$  en suero y con niveles de eritropoyetina menores a 100IU/l. La eritropoyetina puede ser administrada sola o en combinación con G-CSF o GM-CSF. En pacientes trombocitopénicos con menos de 50 000 plaquetas/ml puede administrarse danazol o fluoxymesterona. En pacientes neutropénicos esta indicado el uso de G-CSF o GM-CSF. En pacientes que presentan una médula ósea hipoplásica recientemente han salido publicado estudios en donde se administra melfalan o ciclosporina con globulina anti-linfocito (Greenberg 1997).

### 7.7. Fisiopatología de los Síndromes Mielodisplásicos

En 1993, Yoshida hipotetizó que la apoptosis podría ser la responsable de la hematopoyesis inefectiva que se observa en los SMD y desde entonces se han realizado varios trabajos que lo han demostrado. Mundle et al (1994), utilizando una técnica que mide la proliferación celular y la apoptosis en médula ósea, encontraron que en los SMD existe una elevada tasa de proliferación (reflejada por una médula normo o hipercelular) la cual se ve abatida por una alta tasa de muerte celular por apoptosis (reflejada por las citopenias en sangre periférica).

Mediante estudios morfológicos y utilizando la técnica de TUNEL. Mundle(1996) y Raza(1995) reportaron que existe un nivel elevado de apoptosis tanto en células hematopoyéticas (mieloides, eritroides y megacariocíticas) como en células del estroma.

Estudios realizados por Bogdanovic (1997) y Rajapaksa (1996) utilizando otras metodologías para medir apoptosis también reportan un incremento en el índice de apoptosis en estos síndromes, sin embargo difieren en el grado de apoptosis en cada subgrupo clínico y en los niveles de apoptosis en la médula. Raza (1995) reporta un mayor grado de apoptosis en el subgrupo AREB-t, mientras que Bogdanovic (1997) encuentra un alto índice apoptótico en AR y ARS y menos en AREB-t y LMMC, pero no pudieron comparar AREB en este estudio debido al bajo número de la muestra. Rajapaksa (1996) observó altos niveles de apoptosis en pacientes en etapas tempranas (AR y ARS) y niveles más bajos en AREB, AREB-t y en LMA. Las diferencias entre lo reportado por Raza y por Rajapaksa pudieran deberse a que el primer autor utilizó células mononucleares totales y Rajapaksa utilizó células CD34+.

Al parecer el aumento de apoptosis en los SMD es la causa de la hematopoyesis ineficaz y las citopenias, sin embargo no se conoce cual es el factor causante de la apoptosis y si este proviene de las células hematopoyéticas o si el microambiente hematopoyético tiene un papel en dicho proceso.

## ANTECEDENTES

Aunque tradicionalmente se reconoce que enfermedades hematológicas como la leucemia mieloide, la anemia aplásica y otras enfermedades hematológicas hereditarias son causadas por alteraciones que ocurren al nivel de células seminales hematopoyéticas, diversos trabajos sugieren que también el compartimento del microambiente hematopoyético se encuentra alterado. Dichos estudios tienen gran importancia no solo para entender la biología de la enfermedad sino para la creación de nuevas estrategias de tratamiento.

La leucemia mieloide aguda (LMA) se origina a partir de cambios genéticos que ocurren en las células seminales hematopoyéticas. Estos cambios genéticos llevan a una proliferación descontrolada de las células mieloides y a una alteración en su proceso de maduración; y por lo tanto, a una acumulación de células blásticas tanto en médula ósea como en sangre periférica (Beutler<sup>a</sup> 1995).

En el microambiente hematopoyético de pacientes con LMA se encuentran alteraciones tanto en la composición como en la funcionalidad del microambiente hematopoyético. Mayani et al <sup>fs</sup> (1992,1993) reportaron una reducción del 35% en el número de progenitores de fibroblastos (CFU-F), la ausencia en el crecimiento de adipocitos en el 50% de los pacientes y en el 30% el número de macrófagos se encontró reducido. Analizando la concentración de citocinas en la capa de estroma se encontraron bajos niveles del M-CSF. Los estudios acerca de la funcionalidad de los fibroblastos son contradictorios, Greenberg et al (1981) reportan que los fibroblastos de pacientes con LMA no permiten el crecimiento de progenitores granulocíticos, mientras que Mayani et al <sup>f</sup> (1992) no encontraron ninguna anomalía ni en los niveles de producción de M-CSF ni en la capacidad para soportar la hematopoyesis en cultivos a largo plazo. El trabajo de Mayani et al <sup>f</sup> (1992) propone que los macrófagos son el tipo celular que se encuentra alterado en el microambiente de estos pacientes, ya que se demostró que los macrófagos de pacientes con LMA producen cantidades elevadas de TNF $\alpha$  y que derivan de la clona leucémica.

La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por la expansión clonal de una célula seminal hematopoyética cromosoma Filadelfia positiva (Ph+). El cromosoma Filadelfia es una translocación entre los cromosomas 9 y 22 que resulta en la formación de un gen de fusión denominado bcr-abl, este gen codifica a una proteína híbrida con actividad de tirosín cinasa. La primera fase de la enfermedad conocida como fase crónica se caracteriza por una proliferación excesiva de las células hematopoyéticas, que lleva a la acumulación de células mieloides en grandes cantidades en la sangre periférica.



En la fase crónica las células maduran normalmente. no es si no hasta la fase aguda en donde también se ven alterados los mecanismos de maduración. lo que lleva a una acumulación de células blásticas mieloides (Ph+) tanto en médula ósea como en sangre periférica (Beutler<sup>a</sup> 1995).

Diversos grupos de investigación han demostrado anormalidades funcionales en el microambiente hematopoyético de los pacientes con LMC. Realizando estudios quiméricos, Takahashi et al (1985) demostraron la incapacidad del microambiente hematopoyético de pacientes con LMC para soportar la hematopoyesis normal. Estudios realizados por el grupo de la Dra. C. Verfaillie (Bhatia et al 1995, Bhatia et al 1996) también mostraron la deficiencia del estroma de pacientes con LMC para soportar el crecimiento de las células LTC-IC normales en cultivos a largo plazo y demostraron que dicha incapacidad se debe a la presencia de macrófagos bcr-abl positivos en la capa de estroma, que producen una mayor cantidad de IL-6 y de TNF $\alpha$ . Así como sugieren que alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión y de citocinas unidas a membranas también puedan contribuir a la incapacidad del estroma de pacientes con LMC para soportar la hematopoyesis normal.

La anemia aplásica es una enfermedad hematológica caracterizada por una médula ósea hipocelular y por las citopenias presentes en sangre periférica (Beutler<sup>a</sup> 1995). Múltiples estudios han demostrado que el microambiente de estos pacientes es anormal. Martínez-Jaramillo et al (en revisión) demostraron mediante estudios en cultivos líquidos a largo plazo, que existe una alta producción de TNF $\alpha$  a las cinco semanas de cultivo, lo que sugiere que dicha producción sea llevada a cabo por las células estromales. Juneja y Gardner (1985) demostraron que las capas de estroma de pacientes con anemia aplásica tienen una capacidad reducida para inducir el crecimiento de los progenitores en cultivos líquidos (actividad estimuladora de colonias o AEC) aún cuando el análisis morfológico e inmunohistoquímico de los fibroblastos resultó ser normal.

El Síndrome de Diamond-Blackfan (SDS) es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva caracterizada por diversos síntomas como la presencia de citopenias en sangre periférica y anormalidades pancreáticas entre otros (Beutler<sup>a</sup> 1995). Hasta hace unos años se pensaba que el compartimento medular afectado en el SDS era el de las células hematopoyéticas, sin embargo, en 1999 Dror Y y Freedman M reportaron anormalidades en el microambiente hematopoyético de estos pacientes. Utilizando cultivos quiméricos ellos encontraron que el microambiente de pacientes con SDS no es capaz de sostener la hematopoyesis normal y presenta un crecimiento anormal de adipocitos.

Dror Y y Freedman M (1999) no encontraron anomalías en el crecimiento de las capas de estroma ya que en todos los cultivos se alcanzó una confluencia de por lo menos el 75%. Estos autores son los primeros en reportar anomalías en el microambiente hematopoyético en una enfermedad hematológica hereditaria.

El microambiente hematopoyético de pacientes con SMD ha sido objeto de diversos trabajos. Los estudios realizados por Borbenyi (1987), Coutinho (1990) y McMullin (1998) han demostrado deficiencias en los cultivos de médula ósea a largo plazo de pacientes con SMD para soportar la hematopoyesis. Estos trabajos reportan una disminución en la cinética de proliferación tanto de las células mononucleares como de los progenitores mieloides CFU-GM a la tercera o cuarta semana del cultivo. Un estudio más reciente realizado por Flores-Figueroa et al (1999) en este mismo sistema de cultivo, mostró que además de la disminución en los progenitores mieloides también se encuentra una marcada disminución en la cinética de los progenitores eritroides y multipotenciales, lo cual es más evidente en la capa adherente de los cultivos. En estos trabajos, sin embargo, no es posible discernir si la deficiencia en el crecimiento de los progenitores de pacientes con SMD se debe a que el MH no es capaz de soportar la hematopoyesis o a que existen alteraciones en las células hematopoyéticas, o a ambos.

En los cultivos a largo plazo también se ha estudiado la composición celular y la confluencia de la capa de estroma. Existen diversos estudios en donde se establece que no existe ninguna deficiencia cuantitativa en la capa de estroma. Borbenyi et al (1987), Wetzler et al (1995), Tennant et al (1997) y Flores-Figueroa et al (1999) reportaron que la capa de estroma de pacientes con SMD es confluyente, que no se encuentra ninguna diferencia cuantitativa en el número de células ni tampoco se encuentra una diferencia en su composición. Existen únicamente dos reportes realizados por Coutinho et al (1990) y por McMullin et al (1998) en donde se encuentra que el estroma de los pacientes no es confluyente. El estudio de Coutinho reportó además, que el número de CFU-F era normal pero que su capacidad de proliferación estaba disminuida, y que el número de adipocitos en los cultivos de pacientes con RAEB-t y CMML se encontraba disminuido. Las diferencias entre los estudios no pueden ser explicadas por las condiciones de cultivo, por lo que puedan deberse a la heterogeneidad en los pacientes.

Los cultivos quiméricos han permitido estudiar la funcionalidad de las capas de estroma de los pacientes con SMD. Coutinho et al (1990) utilizaron capas de estroma de pacientes con SMD y de médula ósea normal previamente irradiadas y co-cultivaron células mononucleares normales. En este trabajo se encontró que no había diferencia en el número de células ni en el número de progenitores mieloides presentes tanto en el estroma normal como en el estroma de pacientes con SMD, por lo que concluyeron que no existen anomalías funcionales en la capa de estroma de pacientes con SMD ya que éste tiene la capacidad de

mantener la hematopoyesis de células normales. Sin embargo estudios más recientes han mostrado resultados diferentes. En el estudio realizado por Tennant et al (1997) se establecieron capas de estroma en cultivos a largo plazo por 6 semanas. las capas fueron irradiadas y se les agregó células mononucleares de cordón umbilical. Se midió la capacidad del estroma tanto de sujetos sanos como de pacientes con SMD para soportar la hematopoyesis normal y se encontró que las capas de estroma de pacientes con SMD tenían una capacidad reducida para mantener la hematopoyesis normal ya que el número de progenitores CFU-GM a la semana tres fue muy inferior que con estroma normal. Los resultados del estudio realizado por Aizawa et al (1999) apoyan lo encontrado por Tennant. Estos autores, también realizando estudios quiméricos, demostraron una marcada deficiencia del estroma de pacientes con SMD para sostener la hematopoyesis normal; encontraron que el estroma de algunos pacientes era capaz de inducir apoptosis a las células hematopoyéticas y que no permitía la diferenciación de los precursores ni el desarrollo de los progenitores hematopoyéticos.

La diferencia entre estos estudios se encuentra en que las células hematopoyéticas utilizadas por Coutinho eran células mononucleares de medula ósea normal. Mientras que en los estudios realizados por Tennant se utilizaron células mononucleares de sangre de cordón umbilical. Las células mononucleares de medula ósea consisten en una población muy heterogénea de células hematopoyéticas que contienen además elementos que dan origen a células del estroma, las cuales pueden interferir en los resultados ya que esta población tiene la capacidad de producir citocinas y ser un factor no controlado en los cultivos. Por otra parte Aizawa utilizó células CD34+, la cual es una población más homogénea. De acuerdo con los estudios anteriores puede concluirse que existe una mayor evidencia que sugiere que el microambiente hematopoyético de pacientes con SMD tiene una alteración funcional en su capacidad para soportar la hematopoyesis normal.

Analizando las concentraciones de factores hematopoyéticos en los cultivos a largo plazo, Wetzler et al (1995) mediante la técnica de retrotranscripción y amplificación en cadena de la polimerasa, reportaron la expresión de IL-6 en el 44% de las capas de estroma analizadas de pacientes con SMD y la expresión constitutiva de TGF- $\beta$ , IL-7 y de M-CSF. Aizawa et al (1999) analizaron el sobrenadante de los cultivos mediante técnica de ELISA y no detectaron la presencia de TNF- $\alpha$ , lo cual corrobora lo reportado por Wetzler et al (1999) quienes tampoco encontraron la expresión del RNA mensajero para TNF $\alpha$ .

Otros estudios han analizado las concentraciones de citocinas en macrófagos y CMN. Visani et al (1993) y Mencoboni et al (1996) observaron una producción disminuida de GM-CSF en el sobrenadante de cultivos de macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), mientras que los niveles de TNF $\alpha$  se encontraron normales. En su estudio Visani también cuantificó los niveles de IL-6 en las capas de macrófagos y los

encontró normales. A pesar de que no se encontraron niveles elevados de TNF $\alpha$  en los sobrenadantes de macrófagos, estudios funcionales sugiere que estos poseen una actividad inhibitoria. Ohmori et al (1993) describieron que los macrófagos de los pacientes con SMD inhiben el crecimiento de las CFU-GM normales, y que dicha inhibición esta mediada en parte por TNF $\alpha$  y ferritina. Por otra parte, encontraron que los macrófagos de los pacientes con SMD no suprimen a las CFU-GM mielodisplásicas, por lo que proponen que en el microambiente hematopoyético de los pacientes con SMD pueden existir factores secretados por las células SMD que inhiben a la clona normal, y/o que existen factores que estimulan a la clona anormal.

Los niveles de TNF $\alpha$  y de IL-6 sí se han reportado elevados en otros trabajos. Koike et al (1995) reportaron niveles elevados de TNF $\alpha$  y de IL-6 en cultivos de células mononucleares. En las biopsias de médula ósea se han observado "focos" o zonas de apoptosis (Mundle, 1994, Bogdanovic, 1997), en las cuales se han encontrado niveles elevados de TNF- $\alpha$ . Otras citocinas también han sido implicadas como el TGF- $\beta$  y la enzima de conversión de IL-1 $\beta$  (ICE) (Mundle, 1996). Se ha demostrado un alto nivel de estas citocinas en la médula ósea de los pacientes con SMD, lo cual correlaciona con el grado de apoptosis, sin embargo al bloquear su efecto no se elimina la apoptosis completamente. Un estudio realizado por Kitagawa et al (1997) corrobora lo encontrado por Mundle y Bodganovic. En el trabajo de Kitagawa mediante la técnica de PCR se reportan niveles elevados de TNF $\alpha$ , los cuales son verificados mediante inmunohistoquímica. Al utilizar un doble marcaje (anti-CD68 y anti-TNF $\alpha$ ) en las biopsias estos autores encontraron que las células que expresan TNF $\alpha$  son en su mayoría macrófagos (expresan el antígeno CD68), sin embargo no todas las células CD68+ expresan TNF $\alpha$ .

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que en el microambiente hematopoyético de los pacientes con síndrome mielodisplásico existe una sobreproducción de citocinas inhibitoras, una disminución de citocinas estimuladoras y un incremento en la apoptosis. Sin embargo estos estudios se han realizado en biopsias y capas de estroma totales, por lo que no es posible distinguir qué elemento o elementos se encuentran alterados, y si esa alteración se debe a la influencia de algún otro factor.

Por lo anterior en el presente proyecto se trabajó tanto con capas de estroma totales como con subpoblaciones enriquecidas de fibroblastos (debido a que representan la parte que no proviene de la fracción hematopoyética) y de macrófagos (que son los únicos elementos del MH que se ha demostrado derivan de la fracción hematopoyética). Los fibroblastos y macrófagos, representan los componentes del estroma medular más abundantes tanto *in vivo* como *in vitro*. Esto nos permitió caracterizar el microambiente hematopoyético de estos pacientes y estudiar su papel en la patofisiología de la enfermedad.

## OBJETIVO GENERAL

- Avanzar en el conocimiento del papel que desempeña el microambiente hematopoyético en la fisiopatología de los Síndromes Mielodisplásicos.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estudiar el MH producido *in vitro* de pacientes con SMD en cultivos a largo plazo tipo Dexter
- 2.- Establecer cultivos de fibroblastos y de macrófagos purificados
- 3.- Evaluar la funcionalidad de los fibroblastos y de macrófagos de pacientes con SMD

## METODOLOGIA

Se estudió el MH como capas de estroma totales en cultivos a largo plazo tipo Dexter (LTMC) y fragmentando dos de sus subpoblaciones más representativas (DIAGRAMA 1).

Para estudiar el MH total se utilizaron los cultivos a largo plazo tipo Dexter (LTMC). Estos cultivos se establecieron con CMN provenientes de aspirados de médula ósea tanto de pacientes con SMD como de médula ósea normal (MON) y se evaluaron en dos tiempos, en día 7 y en día 35. En día 7 la mayoría de las células se encuentran en la fracción no adherente, ya que el estroma no se ha formado aún. En día 35 la mayoría de los cultivos presenta un estroma confluyente y encontramos células hematopoyéticas tanto en la fracción no adherente como en la fracción adherente.

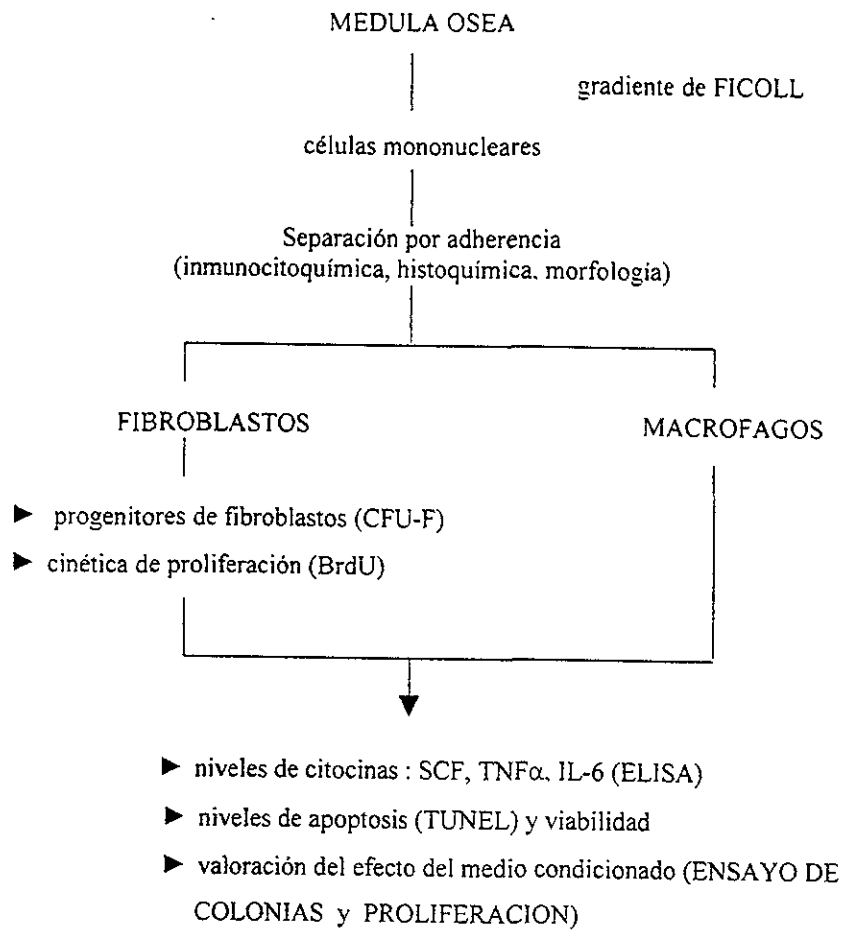
En los LTMC se evaluaron los niveles de citocinas como el SCF, el TNF $\alpha$  y la IL-6 tanto en día 7 como en día 35 para comparar los niveles secretados por las células hematopoyéticas y por las células del estroma. En el día 35 se evaluó además, el número de células adherentes (hemocitómetro), el número de progenitores (ensayo de colonias), el porcentaje de macrófagos (inmunocitoquímica CD68) y los niveles de apoptosis (TUNEL), para evaluar tanto cuantitativa como cualitativamente el MH formado *in vitro* (DIAGRAMA 2).

Para estudiar a los componentes del MH en forma aislada, se obtuvieron subpoblaciones enriquecidas de macrófagos y de fibroblastos mediante la separación por la diferencia en el tiempo de adherencia. Para cuantificar el grado de enriquecimiento se realizaron frotis en citocentrífuga de ambas subpoblaciones y se utilizaron las técnicas de inmunocitoquímica (utilizando el anticuerpo CD14 y CD68), de citoquímica (fostatasa alcalina) y se evaluaron morfológicamente (tinción de Wright-Giemsa).

Una vez obtenidas las dos subpoblaciones enriquecidas de macrófagos y de fibroblastos se evaluaron los niveles de citocinas SCF, IL-6 y TNF $\alpha$  por el método de ELISA, se cuantificaron los niveles de apoptosis por TUNEL y se valoró el efecto del medio condicionado mediante ensayo de colonias y proliferación (mediante la incorporación de bromo-deoxi-uridina). En la subpoblación de fibroblastos se evaluó además el número de progenitores de fibroblastos (ensayo de CFU-F) y se siguió su cinética de proliferación por 10 días (mediante la incorporación de bromo-deoxi-uridina) (DIAGRAMA 3).



## DIAGRAMA 3





## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de pacientes con SMD fueron obtenidas en el Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Los pacientes fueron sometidos a la toma de un aspirado de médula ósea en la cresta iliaca postero-superior, como parte de las pruebas que se realizan para diagnóstico. Las muestras fueron obtenidas bajo anestesia local, en jeringas de plástico estériles heparinizadas; se recolectaron entre 3 y 5 ml. La médula ósea de sujetos hematológicamente sanos se obtuvo de los donadores de médula ósea para trasplante alogénico, realizados en la Unidad de Trasplante de Médula Osea del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

## OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS (CMN)

La muestra de médula ósea se homogeneiza y se coloca en un tubo de plástico estéril para centrifugación (1200rpm, 7 minutos a 15°C). Después de la centrifugación se obtiene el plasma y se guarda en tubos para congelación (nalgene® cryowale™) de 5ml. La capa superior de células o "buffy coat" se separa y se resuspende en PBS (Buffer Salino de Fosfatos 7.2 -Life Technologies™) para tener una relación de 2ml de PBS por 30-35 millones de células nucleadas y 4ml de Ficoll (Ficoll-paque™ PLUS Pharmacia Biotech). Se centrifuga a 2300 rpm, 20 minutos a temperatura ambiente. Este sistema divide a los elementos celulares en dos fracciones principales: granulocitos y eritrocitos que precipitan en la pastilla y células mononucleares que permanecen en la interfase, la cual se separa y se somete a dos lavados con PBS, centrifugando a 1200 rpm, 7 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar por segunda vez con PBS se retira el sobrenadante y se resuspende la pastilla con medio de Dulbeco modificado por Iscove (IMDM) con 2% de suero fetal bovino (FBS - Stem Cell Technologies Inc). La pastilla debe de resuspenderse en una cantidad conocida de medio, para que se pueda realizar el conteo de células.

## CONTEO DE CÉLULAS

La muestra se mezcla con una solución de azul de tripan, que permite cuantificar únicamente a las células viables. Se toman 10µl de la suspensión celular y se mezcla con 90µl de azul de tripan. Se dejan pasar unos minutos y se vierten 10µl de la mezcla en el hemocitómetro. El hemocitómetro se coloca en un microscopio óptico a 10x, y se cuentan las células refringentes (que no hayan incorporado el colorante) que se encuentren dentro de la cuadrícula con la ayuda de un contador. Posteriormente se hace la relación del número de células multiplicando el volumen de la suspensión de la muestra de médula ósea (ml) por la dilución, por el número de células por cuadrícula, por una constante (10,000).

## CUANTIFICACIÓN DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS O ENSAYO DE COLONIAS (COLONY ASSAY)

El propósito de la realización de los cultivos semisólidos es el cuantificar el número de progenitores hematopoyéticos. Estos cultivos permiten evaluar tanto el fenotipo como la fisiología de estos progenitores *in vitro*. El principio de la técnica consiste en cultivar una suspensión de células de la médula ósea en un medio semisólido, que contiene nutrientes, y es suplementado con factores de crecimiento hematopoyéticos. Estas condiciones favorecen el crecimiento de las células progenitoras y la consiguiente formación de colonias. Los diferentes tipos de células maduras producidas dentro de una colonia reflejan el grado del potencial diferenciativo de la célula formadora original (UFC unidad formadora de colonias o CFU por sus siglas en inglés).

### PROCEDIMIENTO

1ª. Se adicionan 50 000 células nucleadas a un tubo que contiene 1.3 mL de metilcelulosa (Stem Cell Technologies Inc), suero fetal de bovino, 2-mercaptoetanol, penicilina, estreptomycin y citocinas recombinantes: GM-CSF, Epo, SCF e IL-3. Se agita en vortex para homogeneizar.

2ª. Con una jeringa estéril de 3mL con aguja de punta roma estéril, se aspira la suspensión celular y se coloca en placas de 35mm de diámetro.

3ª. El cultivo se coloca en cajas petri de 100x20mm con otra placa que contenga agua estéril, sin tapa. Se coloca en la incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y a una humedad relativa de 80%.

4ª. Después de 14-21 días se cuentan las colonias en el microscopio invertido.

## CONTEO DE COLONIAS

Después del periodo de incubación de los cultivos semisólidos, se sacan de la incubadora y se colocan en un microscopio invertido. Para cuantificar las colonias se utiliza el objetivo de 4x o 10x. La caja de cultivo se coloca encima de otra de mayor diámetro previamente cuadrículada para seguirla como base y contar toda la caja. Se cuantifican las colonias y dependiendo de su morfología se clasifican en colonias mieloides, las cuales son colonias de color blanquecino; colonias eritroides, que se observan de color rojo, y finalmente colonias mixtas, en este tipo de colonias se observan células tanto rojas como blancas.

Mieloides: las colonias mieloides incluyen tres tipos; las colonias de granulocitos (UFC-G), las colonias de monocitos (UFC-M), y las colonias bipotenciales o de granulo-monocitos (UFC-GM). Las colonias granulocíticas están compuestas por células de tamaño pequeño, redondas, con la membrana muy bien definida y refringentes. Las colonias de monocitos/macrófagos están compuestas por células de mayor tamaño que las de granulocitos, son células no refringentes y la colonia generalmente presenta menor número de células que la de granulocitos. Finalmente, las colonias granulo-monocíticas, están compuestas por ambos tipos celulares, generalmente son colonias de mayor tamaño que las de granulocitos o las de macrófagos.

Eritroides: dentro de las colonias eritroides podemos distinguir dos tipos, una de ellas formada por un progenitor inmaduro denominada UFB-E, es una colonia de color rojo, con células muy pequeñas, de menor tamaño que las de granulocitos, la colonia es muy densa, y puede o no contener lóbulos. El otro tipo de colonia eritroide, es la formada por un progenitor más maduro (UFC-E), por lo que el tamaño de la colonia va a ser menor, así como usualmente la intensidad del color rojo de la colonia es menor.

Pluripotenciales: las colonias mixtas son formadas por progenitores muy inmaduros. Estas colonias se distinguen por contener células tanto eritroides como mieloides, su tamaño puede ser variable.

## CUANTIFICACIÓN DE PROGENITORES DE FIBROBLASTOS

Como parte de la evaluación funcional del microambiente hematopoyético, se realizó la cuantificación de progenitores de fibroblastos. Por medio de esta técnica podemos cuantificar mediante microscopía óptica, el número de progenitores de fibroblastos presentes en una determinada muestra de células de médula ósea. Esta técnica consiste en la obtención de células mononucleares provenientes de un aspirado de médula ósea y su cultivo en medio líquido. Después de tres días, cuando los progenitores de fibroblastos se encuentran adheridos a la caja de cultivo, se retiran todas las células no adherentes y se permite así únicamente el crecimiento de las células adherentes. Después de 10 días, se tiñen las células con wright y se pueden observar agregados de fibroblastos, cada agregado se cuantifica como una unidad formadora de colonias de fibroblastos.

### PROCEDIMIENTO

- 1.. Se adicionan  $1 \times 10^5$  células mononucleares a 1ml de IMDM suplementado con 20% de FBS en una caja de petri de 35x10mm y se incuban a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>
- 2.. Después de cuatro días se retira el sobrenadante y se desecha, la caja se lava con PBS esteril y se agrega medio fresco (IMDM + 20%FBS). Se vuelve a colocar en la incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.
- 3.. Después de 7 días se retira el medio de cultivo y se lava la caja dos veces con PBS y se deja secar 12horas a temperatura ambiente.
- 4.. Una vez seca, la caja se tiñe con Wright y se deja secar
- 5.. La caja se observa en el microscopio invertido y se cuantifican los progenitores como focos de fibroblastos que crecen en una misma dirección y tienen un centro definido.

## CULTIVO LÍQUIDO DE MÉDULA ÓSEA A LARGO PLAZO (LTMC)

El cultivo líquido a largo plazo (LTBMC, por sus siglas en inglés), es un sistema de cultivo que permite la autorrenovación, proliferación y diferenciación de las células más primitivas (CSH). El cultivo líquido a largo plazo permite el crecimiento de células muy inmaduras, las cuales proliferan y se diferencian en células menos inmaduras (UFC) capaces de formar colonias en cultivos semisólidos, y en células maduras. En la tercera semana de cultivo se desarrolla una capa de células adherentes, denominada capa de células del estroma, que producen y secretan tanto factores de crecimiento como moléculas de la matriz extracelular; los cuales permiten el mantenimiento de los cultivos por 7-8 semanas. Las células del estroma que crecen *in vitro* son: fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos.

### PROCEDIMIENTO

1ª. Se utiliza una suspensión celular con  $3 \times 10^6$  células nucleadas por cada mL de medio de LTBMC, el cual contiene: medio alfa, suero fetal de bovino, suero de caballo, ácido fólico, transferrina, 2-mercaptoetanol, hidrocortizona, antibióticos (Stem Cell Technologies Inc). A la suspensión, se le agrega hidrocortizona ( $10^{-6}$  M), y se agita.

2ª. Se adiciona 1 mL de la suspensión en cada uno de los pozos centrales, de las placas de 24 pozos. A los pozos de alrededor se les adiciona agua estéril.

3ª. La placa se incuba 4 días a 37°C, después del cuarto día se incuba a 33°C.

4ª. En el día 7, se realiza el cambio de medio, el cual se realiza removiendo la mitad del medio y agregando la misma cantidad de medio fresco. Del medio que se removió, se hace una cuenta de células nucleadas, y se siembra en cultivo semisólido. El mismo procedimiento se realiza cada 7 días hasta llegar al día 49.

### Células adherentes

1.-A la capa adherente se le adicionan 500µl de tripsina y se incuban 10 minutos a 37°C. Se sacan las células de la incubadora y se agregan 300µl de suero fetal bovino. Se resuspende raspando la caja con la punta de la pipeta y se obtienen las células, el pozo se puede lavar con IMDM para recoger todas las células que hayan quedado. Las células se centrifugan 7 minutos a 1200rpm y la pastilla se resuspende en IMDM. Se cuentan las células en un hemocitómetro y se encuentran listas para ser utilizadas.

## SEPARACIÓN DE FIBROBLASTOS Y MACRÓFAGOS

Este método permite el enriquecimiento de dos subpoblaciones. fibroblastos y macrófagos. Se basa en la diferencia en el tiempo de adherencia de estos tipos celulares. Se comienza con células mononucleares obtenidas de aspirados de médula ósea.

### PROCEDIMIENTO

Se obtienen las células mononucleares (CMN) y se cultivan en IMDM con 20% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) y 20% de suero de caballo (HS, por sus siglas en inglés) por 4 días a 37°C, con una densidad celular de  $1.5 \times 10^6$  células/ml.

2. A los cuatro días se retira el sobrenadante y se centrifuga a 1200rpm durante 8 minutos.

3<sup>a</sup>. Las células que quedaron adheridas en la placa se les agrega medio IMDM con 15% de FBS y 15% de HS y se cultivan a 37°C durante 5 días.

4<sup>a</sup>. A las células adherentes se les realiza cambio de medio cada 5 días, aproximadamente a las 3 semanas se desarrolla una capa confluyente de fibroblastos.

5<sup>a</sup>. Una vez que los fibroblastos han alcanzado el 80% de confluencia, se tripsinizan (metodología obtención célula adherentes) y se vuelven a cultivar en una densidad de 100,000 fibroblastos/caja (en una caja petri de 2 mililitros).

6<sup>a</sup>.- se les realiza cambio de medio cada 5 días, aproximadamente a las 3 semanas se desarrolla una capa confluyente de fibroblastos que se encuentra lista para utilizarse.

3<sup>b</sup>. De las células no adherentes que se centrifugaron, se obtiene la pastilla y se resuspende en IMDM y 20%FBS. Se cultivan a 37°C con una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml por 2 días.

4b. A los 2 días se elimina el medio de cultivo y se lavan las células 2 veces con PBS.

5b. Las células se tripsinizan y se obtiene la población enriquecida de macrófagos.

## METODOLOGÍA PARA SEPARAR LAS CÉLULAS CD34+ LIN-

Con la finalidad de evaluar el efecto del medio condicionado en las distintas subpoblaciones (fibroblastos y macrófagos) sobre una subpoblación de células hematopoyéticas más homogénea y enriquecida de células progenitoras inmaduras, se llevo a acabo la separación de células CD34+ lin-. La separación se llevo a cabo mediante el uso de una columna inmunomagnética, la cual está basada en el sistema de separación negativa. El sistema de separación negativa consiste en el uso de un panel de anticuerpos dirigidos contra la subpoblación celular que se requiere eliminar, es decir, las células que se desea obtener son aquellas que salen por la columna, por lo que las células que se quedan adheridas a la columna son las que se eliminan de la subpoblación. La ventaja de este tipo de separación es que las células con las que se va a trabajar no quedan marcadas con anticuerpos, por lo que no influye en su fisiología.

### PROCEDIMIENTO

La muestra puede provenir tanto de sangre periférica, sangre de cordón umbilical, de médula ósea normal o de médula ósea de pacientes.

#### Obtención de células mononucleares

La muestra se procesa normalmente, obteniéndose las células mononucleares (CMN) mediante un gradiente de Ficoll. Es recomendable tener lo menos posible de células rojas. La muestra de sangre periférica está enriquecida de células blancas, por lo que deberá de evaluarse si es necesario realizar Ficoll o únicamente buffy coat; esto dependerá de la muestra.

#### Preparación de la muestra

Una vez obtenidas las CMN éstas se llevan a una concentración de  $50 \times 10^6$  de células por mililitro si provienen de buffy coat, o a  $100 \times 10^6$  de células por mililitro (con un rango de  $20$  a  $80 \times 10^6$ ) si son células mononucleadas. Las células se dilúyen con PBS + 10 % de FBS. Se debe de realizar un colony assay de la muestra antes de pasarlas por la columna para calcular el porcentaje de enriquecimiento.

### 3. Marcaje e Incubación

Las células son marcadas con un anticuerpo tetramérico agregando 100µl del cocktail de anticuerpo por cada mililitro de células ( $50-100 \times 10^6$  células) y se mezcla homogéneamente. Se deja incubar 15 minutos a temperatura ambiente o 30 minutos en hielo.

### 4. Suspensión coloidal

Se agregan 60µl de suspensión coloidal por mililitro de células y se deja incubar 15 minutos a temperatura ambiente o 30 minutos en hielo.

NOTA: DURANTE ESTE PERIODO DE INCUBACION SE RECOMIENDA MONTAR EL SISTEMA EN LA CAMPANA DE FLUJO LAMINAR.

#### 5. Llenado de la columna

Se llena la jeringa que se localiza lateral a la malla con PBS sin suero. Se introduce el PBS lentamente teniendo cuidado de que no entren burbujas. La llave reguladora deberá de estar colocada con la flecha de cerrado hacia abajo, para que el PBS suba por la malla. El PBS debe de cubrir hasta que sobrepase la malla.

#### 6. Lavado de la columna

Una vez que la malla está completamente húmeda con el PBS, se agrega por arriba de la columna PBS con 10% de FBS. La llave reguladora deberá de estar colocada con la flecha de cerrado hacia el lado lateral de la jeringa para que vaya cayendo en el tubo recolector. Es muy importante tener cuidado de que la columna nunca se seque. La columna se lava hasta que se hayan recolectado 8 mililitros. La columna deberá de quedar llena de PBS cubriendo por arriba de la malla y la llave cerrada con la flecha de cerrado hacia abajo.

#### 7. Llenado con la muestra

Se cambia el tubo recolector por un tubo nuevo estéril para recolectar la muestra. Se agrega el mililitro de la muestra y se abre la llave reguladora. Cuando comience a caer la gota se agrega PBS con 10% de FBS y se deja correr hasta que se recolecten 10ml de muestra.

#### 8. Obtención de las células CD 34+

La muestra se centrifuga a 1200 rpm durante 7 minutos, se obtiene la pastilla y se resuspende en 500µl – 1000µl de medio de cultivo para su cuenta y su posterior uso.



## METODOLOGÍA PARA MEDIR APOPTOSIS POR TUNEL

Este método permite la cuantificación del fenómeno de apoptosis en células individuales por lo que podemos obtener un índice apoptótico o porcentaje de células en apoptosis. Así como puede ser combinado con la identificación morfológica de las células apoptóticas. Esta técnica esta basada en la identificación de fragmentos de ADN con extremos 3'-OH libres, los cuales son producidos en el fenómeno de apoptosis una vez que son activadas las nucleasas. Una transferasa terminal (TdT) cataliza la polimerización de nucleótidos fluoresceinados en los extremos 3' libres, por lo que si se encuentra ADN fragmentado, este proporciona el molde para que la TdT incorpore los nucleótidos, los cuales pueden ser detectados con un microscopio de fluorescencia o puede añadirse un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con la peroxidasa y de esta forma detectar el producto al agregar el substrato de la enzima el cual produce un precipitado café que puede detectarse en un microscopio óptico.

### procedimiento

#### 1.- Fijación y Bloqueo de la peroxidasa endógena y permeabilización de la célula

Una vez secos los frotis se le agrega acetona por 20 minutos a temperatura ambiente. Se dejan secar y se lavan las células con PBS y se incuban con la solución bloqueadora por 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavan las células con PBS y se incuban con la solución de permeabilización por 2 minutos en hielo (4°C).

#### 2.- Marcaje

Se lavan los frotis dos veces con PBS, se seca el área alrededor de la muestra y se añaden 50µl del reactivo TUNEL a la muestra; la muestra se cubre con parafilm durante la incubación para evitar pérdida por evaporación y para que se distribuya homogéneamente. Se incuban los frotis en una cámara de humidificación por 60 minutos a 37°C y posteriormente se lavan los frotis 3 veces con PBS.

#### 3.- Conversión de la señal análisis

Se seca el área alrededor de la muestra y se añaden 50µl del convertidor – POD a lo largo de la monocapa celular, se cubren los frotis con parafilm. Se incuban los frotis por 30 minutos en una cámara humidificada a 37°C y se lavan los frotis 3 veces. Se añaden 50 - 100µl de la solución DAB- substrato y se incuban las células por 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavan 3 veces con PBS y finalmente se montan con el cubreobjetos.

## METODOLOGÍA PARA MEDIR LA PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE 5'-BROMO-2'-DEOXI-URIDINA BRdU

El Kit de marcaje y detección de BrdU III está basado en el principio del ELISA. Las células se cultivan en una placa de 96 pozos. Se añade la BrdU al medio de cultivo y es incorporada al DNA que se encuentra sintetizándose. Después de fijar a las células, el DNA celular es digerido parcialmente mediante un tratamiento de nucleasas. Posteriormente se agrega un anticuerpo anti- BrdU conjugado con peroxidasa. El paso final consiste en agregar el substrato de la peroxidasa. La enzima peroxidasa cataliza el rompimiento del substrato dando un producto colorido. La absorbancia de la muestra puede ser determinada utilizando una placa de lectura y puede ser correlacionada con la cantidad de BrdU incorporada al DNA celular.

### PROCEDIMIENTO

#### CÉLULAS ADHERENTES

- 1ª. Las células deberán ser cultivadas en placas de 96 pozos de acuerdo con las especificaciones del tipo celular.
- 2ª. Una vez que han alcanzado el crecimiento deseado o el día de cultivo deseado, se agregan 10µl de BrdU por pozo y se dejan incubar por 16-18 horas.
- 3ª. Se elimina el medio de cultivo y se lavan las células dos veces con 250µl del medio de lavado.
- 4ª. Se remueve completamente el medio de lavado y se agregan 200µl del fijador (a -20°C) y se dejan 30 minutos a -20°C.
- 5ª. Se elimina el fijador y se lavan las células dos veces con 250µl del medio de lavado.
- 6ª. Se remueve completamente el medio de lavado y se agregan 100µl de la solución de nucleasas por 30 minutos a 37°C en ausencia de CO<sub>2</sub>.
- 7ª. Se remueven las nucleasas y se lava la placa tres veces con el medio de lavado.
- 8ª. Se remueve el medio de lavado y se agregan 100µl del anticuerpo anti- BrdU por pozo y se incuban por 30 minutos a 37°C.

9<sup>a</sup>. Se elimina el anticuerpo y se lava la placa 3 veces con 250µl del buffer de lavado.

10<sup>a</sup>. Se remueve el buffer de lavado y se agregan 100µl del substrato de la peroxidasa.

11<sup>a</sup>. Se mide la reacción en un lector de ELISA con una longitud de onda de 405nm con un filtro de referencia de 490nm aproximadamente.

#### CELULAS EN SUSPENSION

1<sup>b</sup>. Se cultivan las células en placas de 96 pozos de fondo plano.

2<sup>b</sup>. Una vez que han alcanzado el crecimiento deseado o el día de cultivo deseado, se agregan 10µl de BrdU por pozo y se dejan incubar por 16-18 horas.

3<sup>b</sup>. Se sacan las células de la incubadora y se centrifugan 10 minutos a 300g en una centrifuga con rotor para microplacas.

4<sup>b</sup>. Con una cánula se elimina el medio de cultivo muy cuidadosamente sin tocar el fondo y se dejan secar 2 horas en una estufa a 60°C.

5<sup>b</sup>. Se sacan las células de la estufa y se agregan 200µl del fijador (a -20°C) y se dejan 30 minutos a -20°C.

6<sup>b</sup>. Se elimina el fijador y se lavan las células tres veces con 250µl del medio de lavado

7<sup>b</sup>. Se sigue la misma metodología desde el paso 6<sup>a</sup>.

## TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)

La técnica de inmunocitoquímica se realiza utilizando el kit (DAKO ENVISION+SYSTEM, PEROXIDASE (DAB)), el cual permite la detección de antígenos presentes en tejidos o en células aisladas. Esta técnica está basada en la reactividad inmune de los anticuerpos y de las propiedades químicas de las enzimas o complejos enzimáticos; los cuales reaccionan con sustratos incoloros produciendo un producto colorido. Es una técnica muy sensible y se realiza en dos pasos. El primero es la incubación con un anticuerpo de ratón dirigido contra un antígeno específico y posteriormente la adición de un polímero marcado con peroxidasa, finalmente se agrega el sustrato y la reacción se observa como un precipitado café en un microscopio óptico.

### PROCEDIMIENTO

- 1.- Las laminillas se sacan del congelador y se colocan en un vaso de coplin con agua destilada por 15 minutos.
- 2.- Las laminillas se lavan con PBS dos veces, y se escurren eliminando el exceso de líquido alrededor de la muestra. Es importante que la muestra siempre permanezca húmeda por lo que es recomendable trabajar únicamente con 5 laminillas a la vez.
- 3.- Las laminillas se colocan en una cámara de humidificación y se les agrega el agente bloqueador de la peroxidasa (reactivo 1) por  $5 \pm 1$  minutos.
- 4.- Se lavan las laminillas con PBS dos veces.
- 5.- Se elimina el exceso de líquido como en el paso anterior y se vuelven a colocar las laminillas en la cámara de humidificación. Se agrega el anticuerpo primario, el cual debe de encontrarse en la dilución adecuada (esto dependerá de cada anticuerpo), y se dejan incubando por  $30 \pm 1$  minutos
- 6.- Se lavan las laminillas con PBS dos veces.

NOTA: si el proceso debe de ser interrumpido en este paso, las laminillas pueden quedarse en PBS por una hora a temperatura ambiente.

- 7.- Se elimina el exceso de líquido y se aplica el polímero marcado con la peroxidasa (reactivo 2) por  $30 \pm 1$  minutos
- 8.- Se lavan las laminillas con PBS dos veces
- 9.- Se elimina el exceso de líquido y se aplica el sustrato de la peroxidasa (diaminobenzidina DAB) (reactivo 3) y se incuba por 5-10 minutos.
- 10.- Se lavan las laminillas con PBS dos veces. Todo el PBS desde el paso 9 deberá de ser colocado en un recipiente especial para desechos tóxicos debido a que la DAB es sumamente tóxica.
- 11.- Las laminillas son sumergidas en hematoxilina por 10-40 segundos, se lavan con agua destilada (filtrada).
- 12.- sin dejar secar se sumergen las laminillas en agua amoniacal tres veces y se lavan con agua destilada (filtrada)
- 13.- Se dejan secar las laminillas y se montan.

## TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DE FOSFATASA ALCALINA

Esta técnica permite la identificación de la enzima fosfatasa alcalina la cual es producida por fibroblastos, bandas y segmentados de neutrófilos humanos. En la médula ósea las células endoteliales y los osteoblastos. La actividad enzimática aparece como gránulos rojo brillante en el citoplasma celular.

### PROCEDIMIENTO

- 1..Las laminillas se fijan con acetona 10 minutos a temperatura ambiente, se dejan secar 12 horas y se guardan a -20°C.
- 2.. Se sacan las laminillas del congelador para ser utilizadas y se sumergen en un vaso de coplin con el medio de incubación por 20 minutos.
- 3.. Se sacan las laminillas y se lavan con agua destilada
- 4.. Se agrega hematoxilina por 30 segundos y se lavan con agua destilada
- 5.. Se sumergen las células 10 segundos en agua amoniacal y se lavan con agua destilada.
- 6.. Se dejan secar y se montan para su análisis en el microscopio.

### MEDIO DE INCUBACIÓN

Disolver 5mg de naftol AS-Bi Acido fosfórico en 0.2ml de N-N dimetilformamida.

Adicionar 60ml de propaneídol diluido (1ml de propaneídol en 40ml de agua destilada) y 40mg de fast garnet.

Disolver bien y filtrar para utilizar inmediatamente.

## KIT DE ELISA PARA MEDIR LA INTERLEUCINA 6 (IL-6) HUMANA

El kit utiliza una técnica cuantitativa basada en un inmunoensayo enzimático tipo sándwich para identificar a la proteína IL-6. Un anticuerpo monoclonal específico para IL-6 se encuentra unido al fondo de la microplaca. Los estándares y las muestras se agregan a las placas, si hay presencia de IL-6 este se une al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar para eliminar cualquier sustancia que no se haya adherido se agrega un anticuerpo policlonal anti-IL-6 conjugado con la peroxidasa. Después de lavar para eliminar todo el anticuerpo que no se haya unido, se agrega una solución de sustrato, con la reacción se desarrolla un producto colorido, el cual correlaciona directamente con la concentración de IL-6. Se agrega una sustancia para detener la reacción y se mide en un lector de ELISA.

### PROCEDIMIENTO

- 1ª. Preparar todos los reactivos y estándares.
- 2ª. Se quitan las tiras de pozos que no vayan a ser utilizados y se guardan en el empaque nuevamente a 4°C.
- 3ª. Se agregan 100µl del diluyente en cada pozo.
- 4ª. Se agregan 100µl del estándar o muestra en cada pozo y se cubren con la capa adhesiva que contiene el kit. Se incuba por dos horas a temperatura ambiente.
- 5ª. Se aspira cada pozo y se lava con el buffer de lavado cuatro veces. Se elimina el buffer de lavado (se puede golpear firmemente la placa contra una superficie dura cubierta con gasas).
- 6ª. Se agregan 200µl del conjugado de IL-6 en cada pozo. Se cubre con la capa adhesiva y se incuba por dos horas a temperatura ambiente.
- 7ª. Se aspira cada pozo y se lava con el buffer de lavado cuatro veces. Se elimina el buffer de lavado (se puede golpear firmemente la placa contra una superficie dura cubierta con gasas).
- 8ª. Se agregan 200µl de la solución de sustrato y se incuba por veinte minutos a temperatura ambiente. A partir de este paso no se debe lavar la placa.
- 9ª. Se agregan 50µl de la solución de paro de la reacción se determina la densidad óptica utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 450nm con una corrección de 570nm aproximadamente.

## KIT DE ELISA PARA MEDIR EL FACTOR ESTIMULADOR DE CÉLULAS SEMINALES (SCF) HUMANO

El kit utiliza una técnica cuantitativa basada en un inmunoensayo enzimático tipo sándwich para identificar a la proteína SCF. Un anticuerpo monoclonal específico para SCF se encuentra unido al fondo de la microplaca. Los estándares y las muestras se agregan a las placas, si hay presencia de SCF este se une al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar para eliminar cualquier sustancia que no se haya adherido se agrega un anticuerpo policlonal anti-SCF conjugado con la peroxidasa. Después de lavar para eliminar todo el anticuerpo que no se haya unido, se agrega una solución de sustrato, con la reacción se desarrolla un producto colorido, el cual correlaciona directamente con la concentración de SCF. Se agrega una sustancia para detener la reacción y se mide en un lector de ELISA.

### PROCEDIMIENTO

- 1ª. Preparar todos los reactivos y estándares.
- 2ª. Se quitan las tiras de pozos que no vayan a ser utilizados y se guardan en el empaque nuevamente a 4°C. Y se agregan 100µl del diluyente en cada pozo.
- 3ª. Se agregan 100µl del estándar o muestra en cada pozo y se cubren con la capa adhesiva que contiene el kit. Se incuba por dos horas a temperatura ambiente.
- 4ª. Se aspira cada pozo y se lava con el buffer de lavado tres veces. Se elimina el buffer de lavado (se puede golpear firmemente la placa contra una superficie dura cubierta con gasas).
- 5ª. Se agregan 200µl del conjugado de SCF en cada pozo. Se cubre con la capa adhesiva y se incuba por dos horas a temperatura ambiente.
- 6ª. Se aspira cada pozo y se lava con el buffer de lavado tres veces. Se elimina el buffer de lavado (se puede golpear firmemente la placa contra una superficie dura cubierta con gasas).
- 7ª. Se agregan 200µl de la solución de sustrato y se incuba por veinte minutos a temperatura ambiente. A partir de este paso no se debe de lavar la placa. Y se agregan 50µl de la solución de paro de la reacción. Y se determina la densidad óptica utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 450nm con una corrección de 570nm aproximadamente.



## KIT DE ELISA PARA MEDIR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA- HUMANO DE ALTA (TNF- $\alpha$ ) SENSIBILIDAD

El kit utiliza una técnica cuantitativa basada en un inmunoensayo enzimático tipo sándwich para identificar a la proteína TNF $\alpha$ . Un anticuerpo monoclonal específico para TNF $\alpha$  se encuentra unido al fondo de la microplaca. Los estándares y las muestras se agregan a las placas, si hay presencia de TNF $\alpha$  este se une al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar para eliminar cualquier sustancia que no se haya adherido se agrega un anticuerpo policlonal anti- TNF $\alpha$  conjugado con la peroxidasa. Después de lavar para eliminar todo el anticuerpo que no se haya unido, se agrega una solución de sustrato, con la reacción se desarrolla un producto colorido, el cual correlaciona directamente con la concentración de TNF $\alpha$ . Se agrega una sustancia para detener la reacción y se mide en un lector de ELISA.

### PROCEDIMIENTO

- 1.- Preparar todos los reactivos y estándares. Se quitan las tiras de pozos que no vayan a ser utilizados y se guardan en el empaque nuevamente a 4°C. Se agregan 50 $\mu$ l del diluyente en cada pozo.
- 2.- Se agregan 200 $\mu$ l del estándar o muestra en cada pozo y se cubren con la capa adhesiva que contiene el kit. Se incuba por 14-20 horas a 2-8°C.
- 3.- Se aspira cada pozo y se lava con el buffer de lavado cinco veces. Se elimina el buffer de lavado (se puede golpear firmemente la placa contra una superficie dura cubierta con gasas y se agregan 200 $\mu$ l del conjugado de TNF $\alpha$  en cada pozo. Se cubre con la capa adhesiva y se incuba por tres horas a temperatura ambiente.
- 4.- Se aspira cada pozo y se lava con el buffer de lavado cuatro veces. Se elimina el buffer de lavado (se puede golpear firmemente la placa contra una superficie dura cubierta con gasas).
- 5.- Se agregan 50 $\mu$ l de la solución de sustrato y se incuba por 60 minutos a temperatura ambiente. A partir de este paso no se debe de lavar la placa. Se agregan 50 $\mu$ l de la solución amplificadora y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregan 50 $\mu$ l de la solución de paro de la reacción se determina la densidad óptica utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 490nm con una corrección de 650nm aproximadamente.

## ESTADÍSTICA

Se utilizó la prueba estadística de F, para conocer si las medias tenían un comportamiento normal y la prueba de T de "student", para comprobar la diferencia entre las medias. En ambas pruebas se definió una alfa de 0.05.

# RESULTADOS Y DISCUSION

## I.- PACIENTES

Se estudiaron 25 muestras de pacientes con SMD, de las cuales 14 correspondieron al subtipo de anemia refractaria (AR), 1 al subtipo de anemia refractaria con sideroblastos (ARS), 3 al de anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t), 4 al de leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) y 3 muestras de pacientes con SMD atípico (SMD-a).

La mayor parte de las muestras correspondieron al subtipo de anemia refractaria (56%), lo cual correlaciona con lo reportado en trabajos previos realizados con pacientes con síndrome mielodisplásico (Coutinho 1990. Raza 1995. Flores-Figueroa 1999). A diferencia de otros estudios, en el presente trabajo encontramos una mayor frecuencia de casos de leucemia mielomonocítica crónica (16%). La distribución de los subtipos en nuestra muestra de pacientes es similar a la encontrada por nuestro grupo en un trabajo previo (Flores-Figueroa, 1999).

Dentro de las citopenias en sangre periférica características de esta patología, la anemia es la alteración hematológica más constante y de acuerdo con la literatura se presenta en el 85% de los pacientes (Mayer 1996, Hofmann W 1996). Dentro de los pacientes incluidos en este estudio el 72% presentó anemia, el 56% cursó con leucopenia y el 68% de los pacientes presentó trombocitopenia, en algunos casos muy severa (hasta menos de  $10 \times 10^3 / \mu\text{l}$  de sangre).

En cuanto al porcentaje de blastos, únicamente el 12% de los pacientes presentaron blastos en sangre periférica (de los cuales uno pertenecía al subtipo de LMMC y dos al de AR), mientras que el 85% de los pacientes presentaron blastos en médula ósea. De los subtipos estudiados, los pacientes con AREB-t fueron los que presentaron una cuenta de blastos más elevada.

La media de la distribución de edades de los pacientes fue de 66 años, con un rango de 24 a 85 años. En el grupo de pacientes hubo un ligero predominio del sexo femenino (56%).

Los parámetros hematológicos de los pacientes se muestran en la **TABLA 1**.

TABLA 1. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

NOMBRE (INICIALES)	DIAGNÓSTICO	EDAD (AÑOS)	Hb (g/dl SANGRE)	LEUCOCITOS ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ SANGRE)	PLAQUETAS ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ SANGRE)	BLASTOS SP (PORCENTAJE)	BLASTOS M.O (PORCENTAJE)
EPR	LMMC	NP	6.2	16.8	2.9	6	11
MMA	AREB-t	NP	8.2	3	38	NP	25
LChE	AR	NP	9.3	7.3	344	0	0
AML	AR	73	5.9	4.5	208	0	1.5
SVP	AR	70	7.9	2.3	375	0	1.5
SFA	AR	72	7.2	4.7	183	0	0.6
GBG	AR	58	8.1	3.5	9	0	0.9
CSF	AR	40	12.7	3.9	40	0	0.4
SOM	AR	68	10.3	2.4	81	0	0.4
VCP	LMMC	53	12.7	6.1	167	0	6.1
RAL	AR	73	8.0	7.2	376	0	0
JAM	AREB-t	80	6.4	4.4	33	0	42
CLF	LMMC	72	11.3	6.4	166	0	12
GLS	AR	59	11.5	3.3	182	0	1.6
HBR	LMMC	85	16	14.1	171	0	1
CGA	ARS	70	8.3	4.1	157	0	0.5
PTC	AR	68	13.8	1.3	49	0	0.5
JAM	AREB-t	80	6.4	4.4	33	0	42
BTC	AR	53	10.1	2.3	45	0	1.2
JMR	AR	70	9.7	2.5	290	1	2
ABS	SMD-a	70	17.2	13	10	0	1.6
GUM	AR	70	11.9	3.6	84	0	1
MLO	AR	24	9.5	4.0	22	0	0
DTE	SMD-a	60	12.4	4.1	70	1	2
HAT	SMD-a	74	13.6	2.7	154	0	0

AR. Anemia refractaria

ARS. Anemia refractaria con sideroblastos

AREB-t. Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación

LMMC. Leucemia mielomonocítica crónica

SMD-a. Síndrome mielodisplásico atípico

NP. Dato no proporcionado

## II.- EVALUACIÓN DEL MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO ESTUDIANDO LA CAPA DE ESTROMA EN CULTIVOS LIQUIDOS A LARGO PLAZO TIPO-DEXTER.

El cultivo a largo plazo tipo-Dexter (LTMC), es un sistema de cultivo que permite la diferenciación, proliferación y maduración de las células hematopoyéticas. La hematopoyesis en este sistema es sostenida gracias a una capa de células del estroma que se forma a partir de la tercera semana del cultivo (Eaves CJ. 1991). En este sistema se pueden distinguir dos componentes: el primero, compuesto por células no adherentes hematopoyéticas que se localizan en la parte superficial del cultivo y el segundo, por células del estroma, las cuales se localizan adheridas a la caja de cultivo y por progenitores hematopoyéticos adheridos al estroma. La capa de células del estroma produce y secreta tanto moléculas de matriz extracelular (MEC) como citocinas y es capaz de mantener la hematopoyesis por varias semanas sin la adición de citocinas exógenas (Eaves CJ 1991, Mayani H<sup>d</sup> 1992, Perkins, Feishman 1998). Diversos estudios han demostrado la presencia de elementos del estroma en los LTMC similares a los encontrados *in vivo*, por lo que se considera a la capa de estroma en los LTMC como un modelo para la caracterización del microambiente hematopoyético *in vitro* (Deryugina, Müller-Sieburg 1993).

A pesar de que la capa de estroma se forma a partir de la tercera semana (día 21), en el presente trabajo se determinó el día 35 para evaluarla, tomando en cuenta lo reportado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Flores-Figueroa et al 1999, Gutiérrez-Rodríguez M et al 2000). En día 35, la capa de células de estroma es confluyente en la mayoría de los cultivos y se encuentra un número significativo de progenitores adheridos a las capas de estroma, así como el número de células hematopoyéticas en la capa no adherente es más reducido que en día 21, por lo que el cultivo esta conformado en su mayoría por células adherentes, lo que permite su mejor valoración.

El primer parámetro evaluado en las capas de estroma en los cultivos, fue la confluencia. La confluencia fue evaluada de manera cualitativa, mediante la observación directa de las cajas de cultivo en el microscopio invertido. Un estroma confluyente se definió como la cobertura por parte de las células del estroma de más del 85% del pozo, sin presentar zonas sin crecimiento o crecimiento irregular. La mayoría de los cultivos (> 90% de las muestras) tanto de médula ósea normal como de médula ósea de pacientes con SMD mostraron un estroma confluyente en día 35. Morfológicamente no hubo diferencia en el crecimiento del estroma de muestras de pacientes y de médula ósea normal (**FIGURA 4**), ambos grupos presentaron un patrón regular de crecimiento, cubriendo todo el pozo sin dejar áreas carentes de células.

Debido a que la evaluación cualitativa de la confluencia es muy subjetiva, se valoró también cuantitativamente este parámetro mediante la cuantificación del número de células en la capa adherente al día 35 de los cultivos. Para ello las células adherentes fueron tripsinizadas y resuspendidas en IMDM con 15% de suero fetal bovino. La cuantificación de las células viables se llevó a cabo utilizando el colorante azul de tripán (colorante que se incorpora en las células muertas). Como puede observarse en la **FIGURA 5** no se presentaron diferencias en el número de células presentes en la capa de estroma entre las muestras de pacientes y controles, aunque se observó una mayor heterogeneidad en el crecimiento de la capa adherente en los cultivos de pacientes. Los resultados obtenidos de la valoración tanto cuantitativa como cualitativa de la confluencia del estroma en pacientes con SMD confirman lo reportado por Borbeny (1987), Wetzler (1995), Tennant (1997) y Flores-Figueroa (1999). Estos autores reportaron que la capa de estroma es confluyente y que no hay diferencia ni en el número de células ni en la composición celular.

De las células adherentes obtenidas de la tripsinización de los cultivos en día 35 se cuantificó el número de células viables mediante la técnica de exclusión de azul de tripan y se obtuvo un porcentaje de células viables. El porcentaje se obtuvo dividiendo el número de células vivas entre la suma del número de células vivas y muertas. Una vez cuantificado el número celular, se realizaron frotis en la citocentrífuga para evaluar los niveles de apoptosis en la capa de estroma. Como se muestra en la **FIGURA 6** la viabilidad de las células en el cultivo fue mayor al 90% tanto para los cultivos de médula ósea normal como para los cultivos de pacientes. Los frotis fueron fijados con acetona y almacenados a -20°C hasta su procesamiento. Se realizó la técnica de TUNEL para medir apoptosis en los frotis tanto de células adherentes de cultivos de pacientes con SMD como de médula ósea normal. Como control positivo de la técnica se utilizaron frotis de células hematopoyéticas tratadas con DNAsa (enzima que rompe el ADN) y frotis realizados de una línea celular 32D en ausencia de IL-3 (línea celular murina dependiente de IL-3). Como control negativo se utilizaron frotis de la línea 32D en presencia de IL-3 (la IL-3 inhibe la apoptosis en esta línea celular) y como control interno se procesaron frotis con células en apoptosis (32D sin IL-3) pero sin agregar la enzima TdT (por lo que se debería de esperar una señal negativa y es un control para la inespecificidad de la técnica). Después de realizar la técnica de TUNEL, los frotis fueron contra- teñidos con hematoxilina. Las células positivas fueron evaluadas como células que en su núcleo presentaban gránulos de color café oscuro. Después de evaluar 500 células por laminilla se obtuvo un porcentaje de células en apoptosis, dividiendo las células positivas entre la suma de las células positivas más las negativas y multiplicándolas por cien. Como se observa en la **FIGURA 7** no se encontró una diferencia significativa en los niveles de apoptosis en las células adherentes entre los cultivos de pacientes y controles. Los niveles de apoptosis en las células del estroma en pacientes con SMD fueron más heterogéneos presentando una distribución muy amplia, esto puede deberse a la heterogeneidad intrínseca de las muestras, ya que los SMD comprenden a varios subtipos y dentro de los

mismos subtipos existe una amplia heterogeneidad biológica (Flores-Figueroa 1999). Es importante resaltar que los niveles de apoptosis que se encontraron en ambos grupos fueron elevados (mayor al 30%). No existe un estudio similar en donde se midan los niveles de apoptosis en LTMC utilizando la técnica de TUNEL, por lo que no es posible compararlo. El estudio de Raza et al (1997) reportaron que en las biopsias de médula ósea de pacientes con SMD había un incremento en los niveles de apoptosis, lo que incluía tanto a células hematopoyéticas como células del estroma y Lepelley et al (1996) reportaron un 39% de apoptosis en células mononucleares (CMN) después de 3 días de cultivo. Los niveles de apoptosis en las capas de estroma de pacientes con SMD concuerdan con lo reportado con los estudios realizados en biopsias y CMN, sin embargo en médula ósea normal el porcentaje de apoptosis que se ha reportado es menor al 2% en células mononucleares.

Se encuentra reportado (Cashman J 1995) en los LTMC que los progenitores hematopoyéticos tienden a adherirse a la capa de estroma que se forma en los cultivos, ya que esto favorece su proliferación y su maduración, por lo que como parte de la evaluación funcional del microambiente hematopoyético en los LTMC, se evaluó el número de progenitores adheridos a la capa de estroma. En día 35 se tripsinizaron los cultivos, se realizó la cuantificación del número de células y se sembraron en cultivos semisólidos. Los cultivos semisólidos de metilcelulosa (colony assay) permiten el crecimiento de los progenitores hematopoyéticos, por lo que es posible su cuantificación haciendo una relación entre el número de células sembradas y el número de colonias en el cultivo semisólido. A pesar de que la capa adherente de los cultivos de pacientes con SMD no mostró diferencias ni en el número de células ni en los niveles de apoptosis, el número de progenitores adheridos a dicha capa se encontró muy por debajo de los progenitores presentes en la capa de la médula ósea normal (**FIGURA 8**). En la capa de estroma de médula ósea normal observamos casi 200 progenitores hematopoyéticos adheridos por pozo, mientras que en las capas de estroma de pacientes con SMD sus niveles son más bajos de 10 progenitores por pozo y en la mayoría de los casos no fueron detectados. Estos datos corroboran lo publicado por Coutinho (1990), McMullin (1998) y Flores-Figueroa (1999), estos autores también encuentran una disminución en el número de progenitores hematopoyéticos adheridos a las capas de estroma. Debido a que tanto el estroma como las células hematopoyéticas provienen de pacientes con SMD no puede concluirse que la capacidad de adhesión por parte del estroma se encuentre alterada, ya que pudiera deberse a un defecto en las propias células hematopoyéticas. Por lo que son necesario estudios en donde se utilicen capas de estroma de pacientes con células normales, estos estudios son denominados como cultivos quiméricos. Existen dos trabajos realizados por Tennant (1997) y Aizawa (1999) utilizando cultivos quiméricos con células estromales de pacientes y células hematopoyéticas normales. Estos autores reportaron que el microambiente hematopoyético de los pacientes con SMD sí presenta una capacidad reducida para soportar la hematopoyesis. Sin embargo son necesarios estudios más

específicos que demuestren una anormalidad en la expresión de moléculas de adhesión o una alteración en la secreción de moléculas de la matriz extracelular o secreción de citocinas por parte de las células del estroma.

Como parte de la caracterización del estroma en los pacientes con SMD, se midieron los niveles de tres citocinas tanto en día 7 como en día 35. En el día 7 en los LTMC, la mayoría de las células hematopoyéticas se encuentran en la fracción no adherente ya que todavía no se forma el estroma y las células hematopoyéticas no se adhieren al plástico. La fracción no adherente esta constituida por células hematopoyéticas en sus distintos estadios de diferenciación, desde progenitores hematopoyéticos inmaduros hasta granulocitos maduros, por lo que se tomó el día 7 como punto de comparación al día 35. En día 35 la mayor parte de las células se encuentran en la fracción adherente, constituida en su mayor parte por células estromales. Las citocinas evaluadas fueron: el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), la interleucina seis (IL-6) y el factor estimulador de células seminales (SCF). Se llevó a cabo la cuantificación de la IL-6 y el  $TNF\alpha$  ya que estudios anteriores realizados tanto en capas estromales *in vitro* como en biopsias de médula ósea, han reportado niveles elevados de estas citocinas en el estroma de pacientes con SMD (Wetzler et al en 1995, Mundle 1994, Bogdanovic 1997 y Kitagawa et al 1997). Así como se han reportado niveles elevados de estas citocinas también en cultivos de células mononucleares (Koike et al 1995). Se ha postulado que el  $TNF\alpha$  sea un factor inductor de apoptosis de las células hematopoyéticas de los pacientes con SMD y que tenga un papel importante en las citopenias presentes en estos pacientes (Raza 1994). La IL-6 es una citocina pleiotrópica involucrada en varios procesos como la inflamación y angiogénesis. Así como es un factor estimulador de las células progenitoras hematopoyéticas y de varias líneas celulares (Thomson 1994, Hibi T 1996). A pesar de que se cuenta con reportes anteriores no se ha establecido qué células producen estas citocinas y bajo qué condiciones. Por otra parte, el SCF es una citocina producida por las células del estroma, es una citocina importante en el crecimiento tanto de progenitores hematopoyéticos normales como leucémicos (Wheatton, Gordon 1996). Se han reportado niveles reducidos de SCF en el plasma de pacientes con SMD (Cortezzi 1999), estos autores sugieren que dicha reducción es debida a una baja en su producción por parte de las células del estroma, sin embargo hasta la fecha no existe ningún reporte que cuantifique los niveles de esta citocina en capas adherentes de pacientes con SMD.

Se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos tanto de pacientes con SMD como de médula ósea normal en día 7 y en día 35. Los sobrenadantes fueron almacenados a  $-20^{\circ}C$  hasta su cuantificación. Los niveles de las tres citocinas fueron cuantificados por medio de un kit de ELISA comercial, el cual utiliza una técnica cuantitativa basada en un inmunoensayo enzimático tipo sándwich para identificar a la proteína.



En el día 7 (**FIGURA 9**) se encontraron valores elevados de TNF $\alpha$  en el 95% de los sobrenadantes de los cultivos de pacientes con SMD siendo la media de 340.6 pg/ml con un rango de (1.8-658.8 pg/ml), mientras que en médula ósea normal la media fue de 4.3 pg/ml con un rango de (1.8-7.2 pg/ml). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Koike et al (1995). Estos autores también reportaron un incremento en la producción de TNF $\alpha$  por parte de las células mononucleares de pacientes con SMD a comparación de médula ósea normal (68 $\pm$ 31 pg/ml vs 0 pg/ml). La diferencia de ambos estudios es que en el estudio de Koike las células mononucleares estuvieron en cultivo por 3 días en IMDM y en el presente estudio estuvieron por 7 días en LTMC.

En día 35 de cultivo se encontraron elevados los niveles de TNF $\alpha$  en el 65% de los sobrenadantes de los cultivos de pacientes (**FIGURA 9**) siendo la media de 103.5 pg/ml con un rango de (0.6-378.6 pg/ml), mientras que en médula ósea normal los niveles se encontraron muy bajos con una media de 2.2 pg/ml y un rango de (0.9-3.6 pg/ml). A diferencia de estos resultados, Wetzler en 1995 y Aizawa en 1999 no encontraron niveles detectables de esta citocina en las capas de estroma de pacientes con SMD. La diferencia puede deberse a que en ambos estudios la capa de estroma se obtuvo eliminando las células no adherentes a los 7 días de cultivo y en este trabajo las células no adherentes se eliminaron parcialmente mediante la remoción de la mitad del medio de cultivo cada 7 días; y aunque el número de CMN es muy bajo en día 35 posiblemente puedan estar produciendo TNF $\alpha$  o estimulando a la capa de estroma a producir esta citocina.

Los bajos niveles de TNF $\alpha$  en los cultivos de médula ósea normal correlacionan con lo encontrado por Mayani et al (1992) y por Bathia et al en 1995. Es importante hacer énfasis en el hecho de que los niveles de TNF $\alpha$  en cultivos líquidos a largo plazo de pacientes con SMD fueron más elevados en día 7 que en día 35, por lo que posiblemente en día 7 los monocitos y/o células blásticas estén produciendo una mayor cantidad de esta citocina y en día 35 se deba principalmente a las células del estroma.

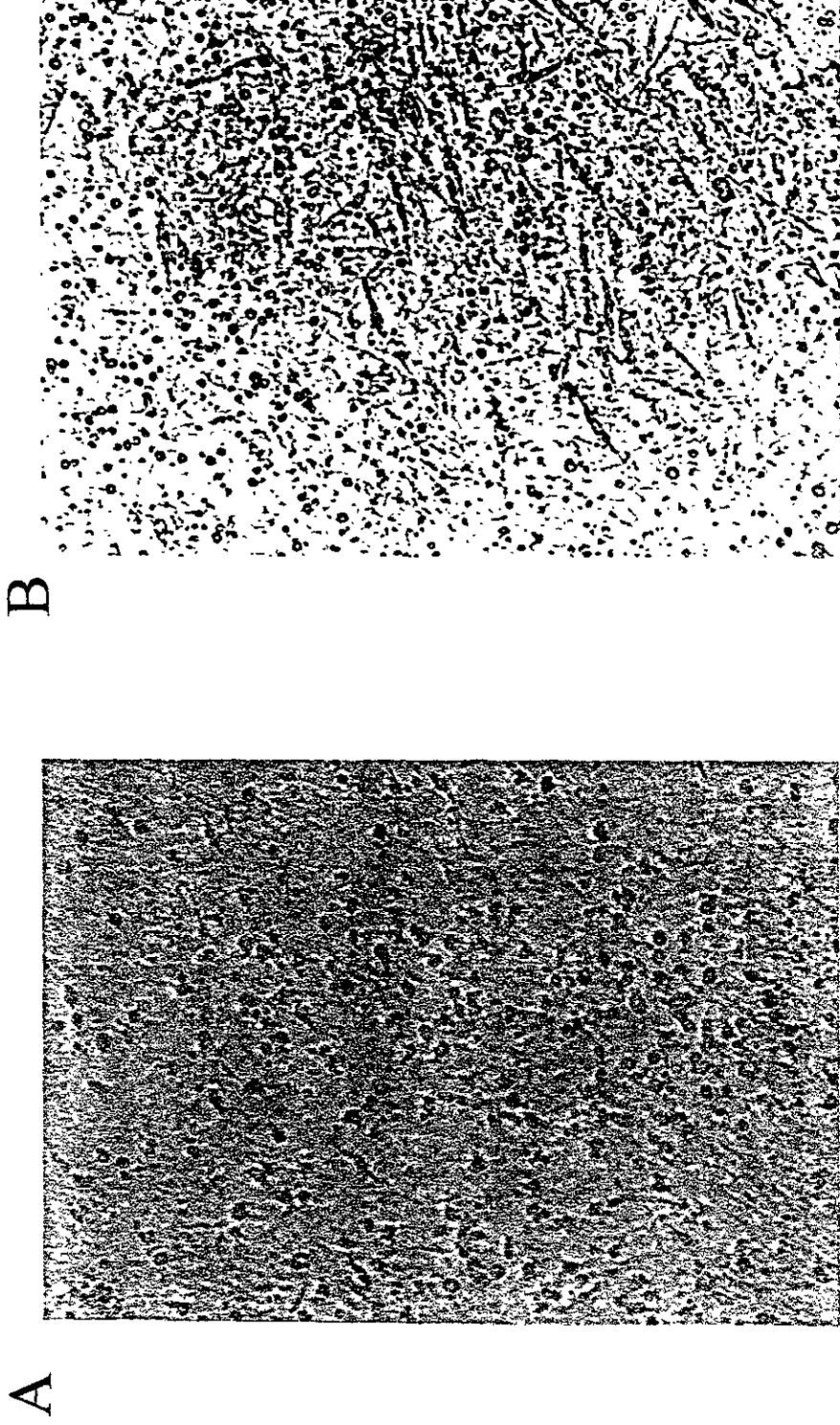
Como se observa en la **FIGURA 10**, el 80% de las muestras analizadas en día 7 presentaron niveles de IL-6 superiores al de médula ósea normal, siendo su media de 38.9 ng/ml con un rango de (1-149.6ng/ml), mientras que los niveles de IL-6 en médula ósea normal se encontraron por debajo de 1ng/ml. Con estos resultados puede suponerse que exista una anomalía en las células hematopoyéticas de pacientes con SMD que induce la producción de IL-6. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Koike et al (1995); este grupo también reportó un aumento en la producción de IL-6 por parte de las CMN de pacientes con SMD a comparación de médula ósea normal (68 $\pm$ 31 pg/ml vs 0pg/ml). Al igual que los niveles de TNF $\alpha$ , los niveles de IL-6 reportados por Koike et al fueron inferiores a los reportados en este trabajo, por lo que la explicación podría ser la misma (el menor número de días en cultivo).

Tanto en los cultivos de pacientes como en los de médula ósea normal, se observó un aumento en los niveles de IL-6 en el día 35 del cultivo (**FIGURA 10**). (155 ng/ml y 74ng/ml, respectivamente). El 80% de las muestras de pacientes con SMD presentaron niveles de IL-6 superiores al normal, con un rango de 131-252.7 ng/ml. Por lo que podemos concluir que las células estromales son una importante fuente de IL-6, tanto en los cultivos de pacientes como en los normales, sin embargo en los cultivos de pacientes con SMD existe una sobre- producción de esta citocina. Estos resultados son apoyados por trabajos anteriores, como el estudio de Wetzler en 1995, en donde mediante la técnica de retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa(RT-PCR) encontró que 40% de las capas de estroma expresan mayor cantidad de esta citocina.

Los niveles de SCF se encontraron muy bajos tanto en día 7 como en día 35 del cultivo en ambas muestras (**FIGURA 11**). En día 7 los valores de SCF tanto en cultivos de médula ósea normal como de pacientes fueron alrededor de los 2 pg/ml ( $2.5 \pm 0.5$  vs  $1.5 \pm 0.5$  pg/ml), lo cual es de esperarse debido a que el SCF es producido principalmente por las células del estroma y en este día de cultivo su población todavía es muy escasa. En día 35, los niveles de SCF aumentaron en ambos grupos, aunque en el grupo de pacientes la media fue significativamente inferior a la de médula ósea normal ( $4.5 \pm 0.5$  vs  $10.5 \pm 0.5$  pg/ml). Esto correlaciona con los bajos niveles de SCF encontrados en el suero de pacientes con SMD en estudios anteriores (Cortezzi 1999). Los niveles de SCF encontrados en d35 en este estudio se encuentran por debajo de los niveles encontrados en estudios anteriores (Gutiérrez Rodríguez et al, 2000). Posiblemente los valores fueron tan bajos en este estudio debido a que el SCF también puede encontrarse adherido a membrana o a la sensibilidad del kit utilizado.

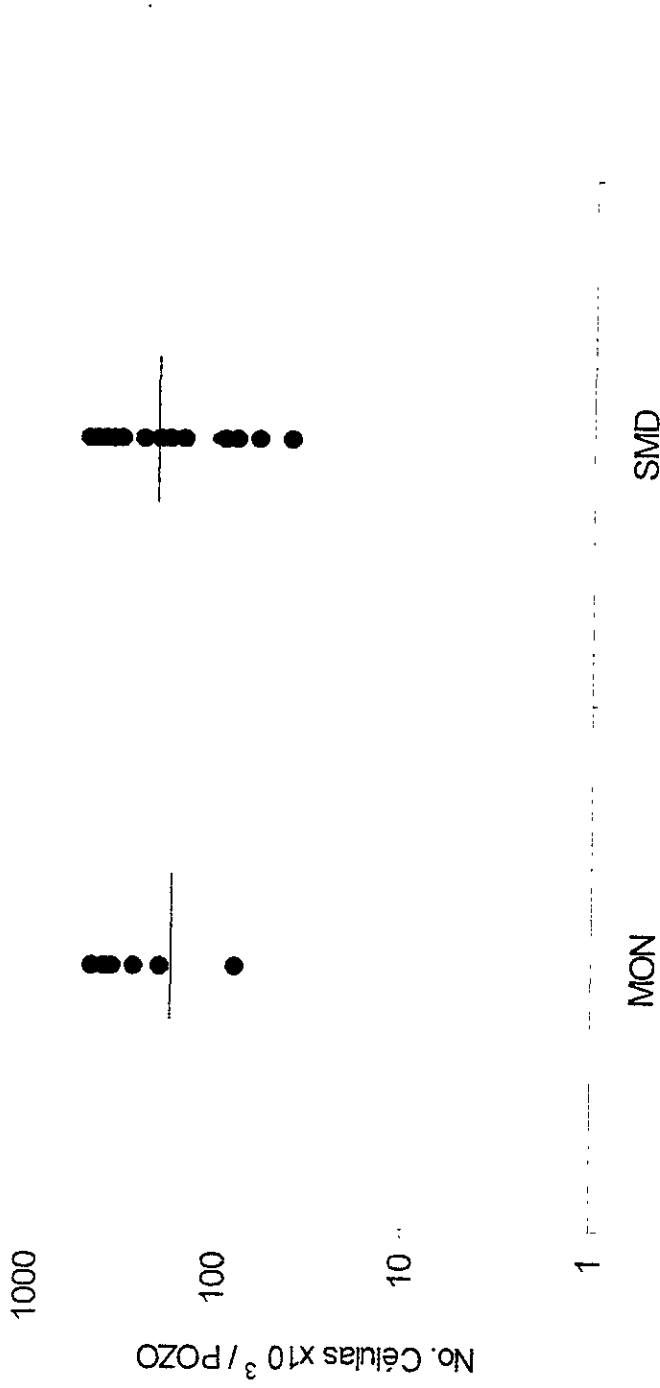
De acuerdo a los estudios realizados en los cultivos a largo plazo puede concluirse, que a pesar de que la capa de estroma en los LTMC de pacientes con SMD no presenta anormalidades cuantitativas (es confluyente y no presenta diferencias en la proliferación ni en la muerte celular comparado a médula ósea normal), sí presenta anormalidades cualitativas, el número de progenitores adheridos se encuentra muy por debajo del de médula ósea normal y su producción de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-6 y SCF) se encuentra alterada. Es importante considerar que tanto en día 7 como en día 35 se encontraron niveles elevados tanto de TNF $\alpha$  como de IL-6. En día 7 la mayor parte de las células son hematopoyéticas en los diferentes estadios de diferenciación, mientras que en día 35 la mayoría de las células son de tipo estromal. Por lo que esto sugiere que existe alguna subpoblación que se encuentra alterada, presente en las células hematopoyéticas no adherentes y en las células estromales. Por lo anterior es importante realizar un estudio de estos componentes por separado.

Figura 4



Microfotografía de la capa adherente de día 35 de un cultivo representativo de médula ósea normal (Fotografía A) y de un paciente con síndrome mielodisplásico (Fotografía B)

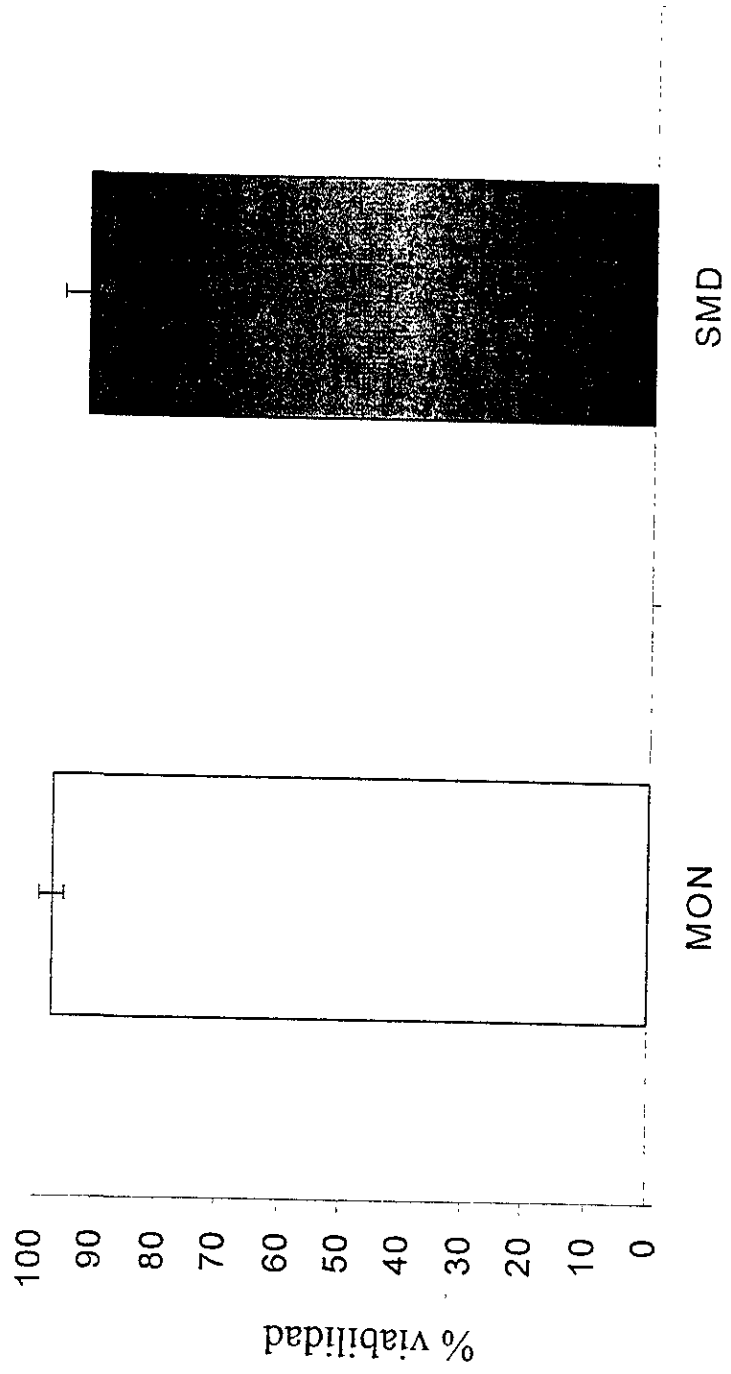
Figura 5



Número de células por pozo en la capa adherente de los cultivos líquidos a largo plazo en día 35. MON (médula ósea normal como control), SMD (pacientes con síndrome mielodisplásico). La barra representa la media.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

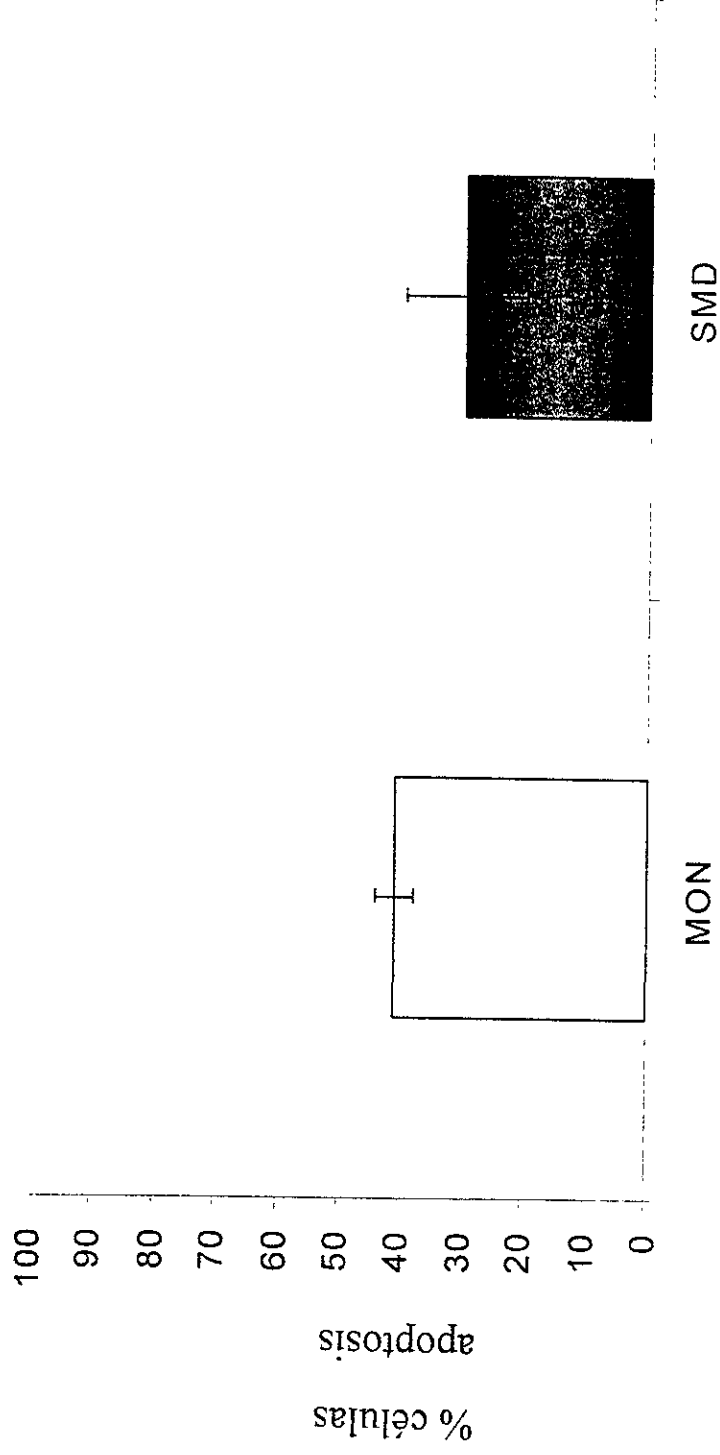
Figura 6



Porcentaje de viabilidad de las células en la capa adherente de los cultivos líquidos a largo plazo en día 35. MON (médula ósea normal como control), SMD (pacientes con síndrome mielodisplásico). Las barra representa la media. Las líneas representan la desviación estándar.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

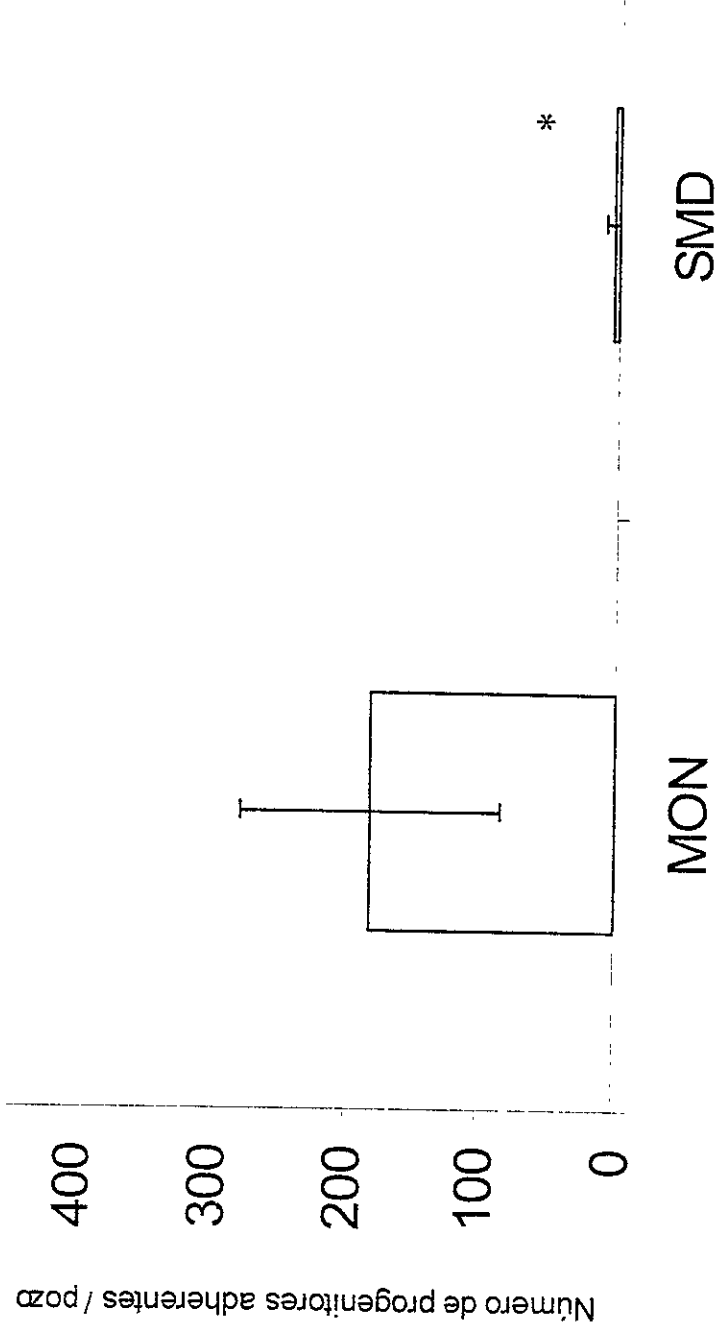
Figura 7



Niveles de apoptosis en la capa adherente de los cultivos líquidos a largo plazo en día 35. MON (médula ósea normal como control), SMD (pacientes con síndrome mielodisplásico). Las barras representan la media. Las líneas representan la desviación estándar.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

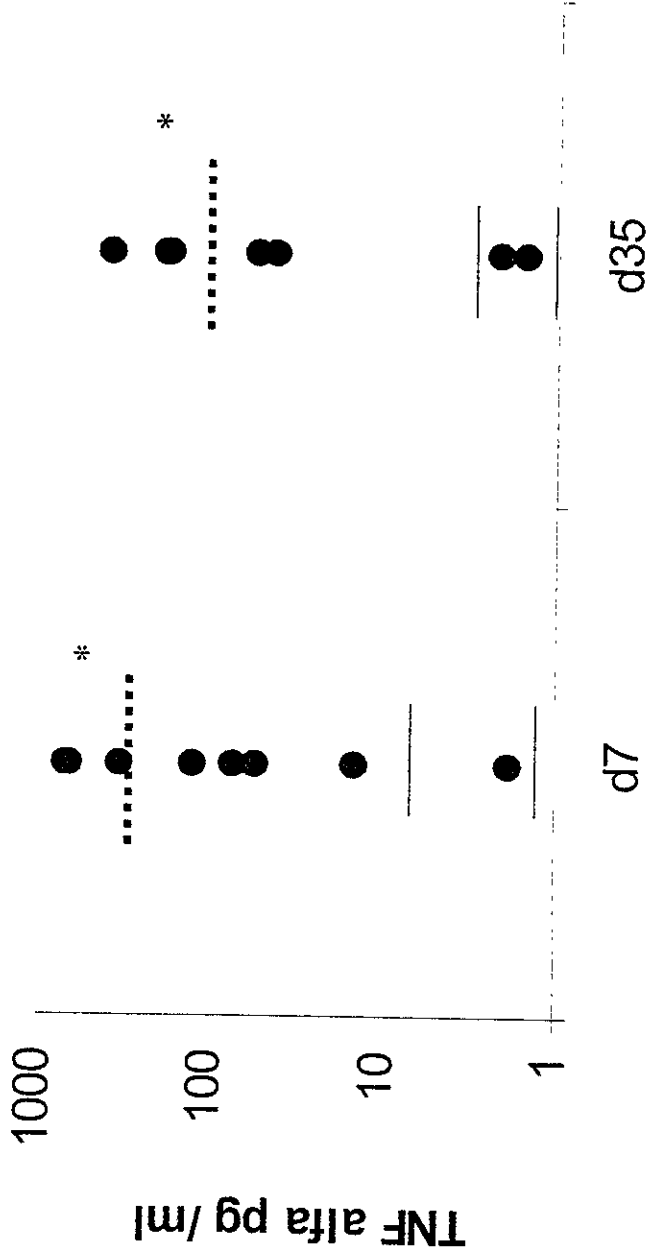
Figura 8



Número de progenitores hematopoyéticos por pozo en la capa adherente de los cultivos líquidos a largo plazo en día 35. MON (médula ósea normal como control), SMD (pacientes con síndrome mielodisplásico). Las líneas representan la desviación estándar.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

Figura 9

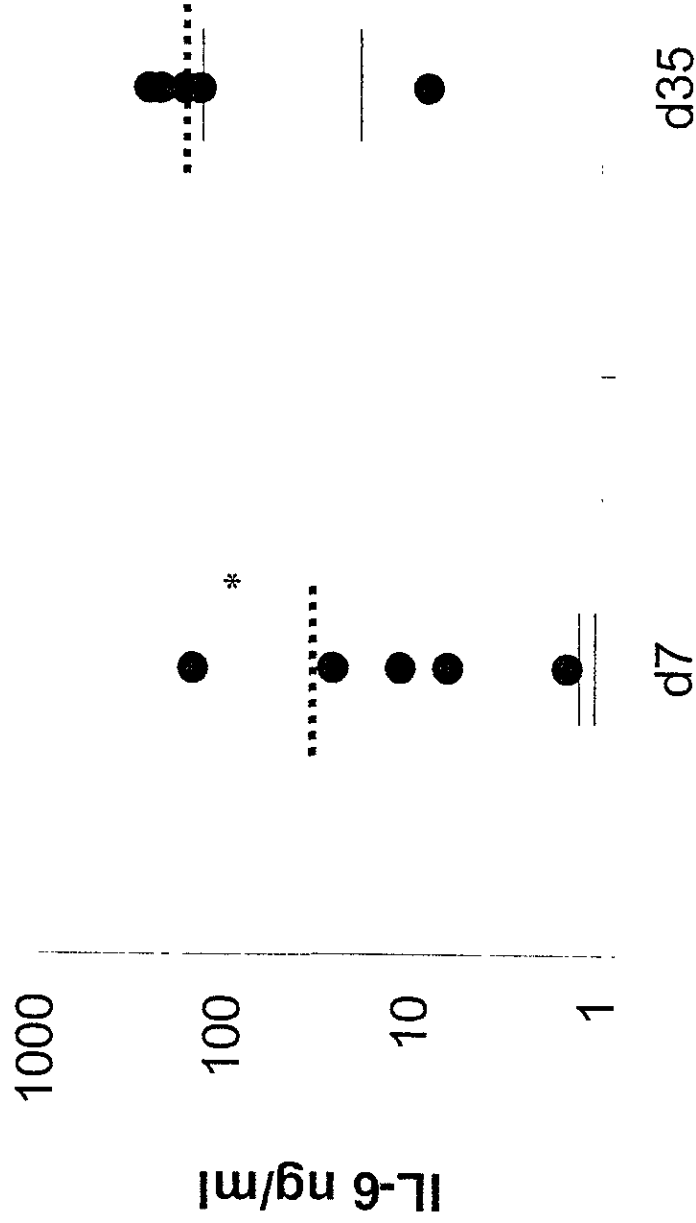


Niveles de TNF $\alpha$  por mililitro de medio condicionado de cultivos líquidos a largo plazo en día 7 y en día 35. Las barras representan el rango de médula ósea normal como control. La barra discontinua representa la media de los niveles de TNF $\alpha$  en pacientes con síndrome mielodisplásico. Los puntos representan el valor de cada paciente con SMD.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$



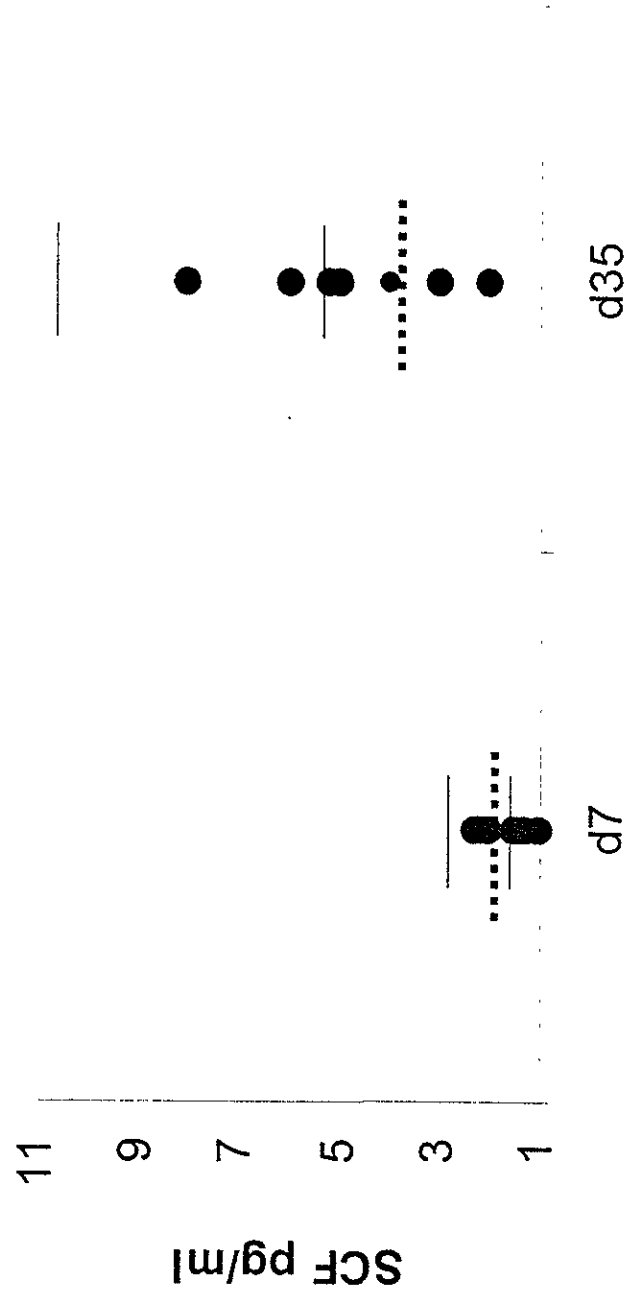
Figura 10



Niveles de IL-6 por mililitro de medio condicionado de cultivos líquidos a largo plazo en día 7 y en día 35. Las barras representan el rango de médula ósea normal como control. La barra discontinua representa la media de los niveles de IL-6 en pacientes con síndrome mielodisplásico. Los puntos representan el valor de cada paciente con SMD.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

Figura 11



Niveles de SCF por mililitro de medio condicionado de cultivos líquidos a largo plazo en día 7 y en día 35. Las barras representan el rango de médula ósea normal como control. La barra discontinua representa la media de los niveles de SCF en pacientes con síndrome mielodisplásico. Los puntos representan el valor de cada paciente con SMD.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

### III.- EVALUACIÓN DEL MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO UTILIZANDO CULTIVOS DE SUBPOBLACIONES ENRIQUECIDAS DE FIBROBLASTOS Y MACRÓFAGOS.

Los estudios realizados en cultivos líquidos a largo plazo demostraron que la producción de citocinas por parte de la capa adherente de los cultivos de pacientes con SMD es anormal. Al parecer las células estromales son el componente que se encuentra alterado. Sin embargo, en este tipo de cultivo existe una proporción de células hematopoyéticas, por lo que no es posible distinguir en que compartimiento se encuentra tal alteración. Por lo anterior, se decidió realizar cultivos de células estromales libres de células hematopoyéticas.

Existe una gran variedad de células estromales que pueden crecer *in vitro*, sin embargo en el presente estudio se eligió trabajar con la población de fibroblastos y macrófagos. Los fibroblastos, son el componente más abundante de los LTMC (aproximadamente el 60%) y de la médula ósea (Mayani <sup>d</sup>1992). Su papel es fundamental en la hematopoyesis, ya que secretan una gran variedad de citocinas, principalmente estimuladoras de la hematopoyesis (G-CSF, GM-CSF) y son la principal fuente de producción de SCF en la médula ósea. Los fibroblastos son también productores de moléculas de la matriz extracelular (Deryungia. Mülher-Sieburg 1993). Los estudios de fibroblastos de pacientes con SMD son limitados. Coutinho et al (1990) encontraron que la proliferación de este tipo celular se encontraba disminuída, sin embargo encontraron un número normal de progenitores de fibroblastos (CFU-F). Por otra parte, se han reportado niveles disminuidos de SCF en el plasma de pacientes con SMD (Cortelezzi 1999), por lo que posiblemente exista una alteración en la producción de dicha citocina por parte de los fibroblastos.

Los macrófagos son el segundo componente más abundante de los LTMC (aproximadamente el 35%) y de la médula ósea (Mayani <sup>d</sup>1992). Este tipo celular es una pieza clave en la regulación de la hematopoyesis a través de varios mecanismos que incluyen, la secreción de citocinas (tanto estimuladoras como inhibidoras de la hematopoyesis), el contacto directo célula-célula y la secreción de moléculas de la matriz extracelular (Dorshkind 1990, Mayani <sup>d</sup> 1992). Diversos estudios realizados en biopsias de médula ósea de pacientes con SMD (Mundle, 1994, Bogdanovic, 1997, Kitagawa, 1997) han reportado un incremento en el número de macrófagos y una elevada producción de TNF  $\alpha$ . Ohmori et al (1993) describieron que los macrófagos de los pacientes con SMD inhiben el crecimiento de las CFU-GM normales, y que dicha inhibición esta mediada en parte por TNF $\alpha$  y ferritina.

Para estudiar a los componentes del MH en forma aislada, se obtuvieron subpoblaciones enriquecidas de macrófagos (mQ) y de fibroblastos (Fb) mediante la separación por adherencia. Esta metodología se basa en la diferencia en el tiempo de adherencia de cada tipo celular. Para cuantificar el grado de enriquecimiento de ambas subpoblaciones y para confirmar su tipo celular, se utilizaron varias técnicas. La primera consistió en la identificación morfológica de las subpoblaciones directamente en las cajas de cultivo, mediante la utilización de un microscopio invertido. En la **FIGURA 12 (FOTOGRAFÍA A)** se observa la subpoblación de fibroblastos a la segunda resiembra. El cultivo se encontraba confluyente al 90%, se puede observar que las células crecen en una sola dirección y su forma es alargada. En la **FIGURA 12 (FOTOGRAFÍA B)** se muestra la subpoblación de mQ. como puede observarse el número celular de esta subpoblación es menor que el de la de fibroblastos y las células presentan una forma más circular.

Para poder observar mejor la morfología de las células, las capas de fibroblastos y de macrófagos fueron teñidos directamente en la caja de cultivo con Wright-Giemsa. En la **FIGURA 13** se observan las fotografías de ambas subpoblaciones que muestran claramente su morfología. Los fibroblastos son células generalmente de mayor tamaño, de forma elongada con un núcleo céntrico y un citoplasma poco vacuolado. Los fibroblastos crecen formando una capa homogénea en donde las células se encuentran en contacto estrecho unas con otras. Los macrófagos son células generalmente más redondas, con un citoplasma vacuolado y un núcleo excéntrico.

Los cultivos tanto de fibroblastos como de macrófagos que no fueron teñidos, se tripsinizaron y se realizaron frotis en la citocentrífuga. Los frotis fueron fijados con acetona y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizarse las técnicas de citoquímica y de inmunocitoquímica. La primera técnica se realizó para identificar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, la cual es una enzima producida por fibroblastos. La reacción se detecta como precipitados de color rojizo. Como se observa en la **FIGURA 13**, más del 80% de las células en la subpoblación de Fb fueron positivas, mientras que únicamente 20% de las células en la subpoblación de mQ fueron fosfatasa alcalina positivas. Para realizar la técnica de inmunocitoquímica en los frotis se utilizaron dos anticuerpos, el anti- CD68 y el anti- CD14, ambos anticuerpos reconocen a antígenos que son expresados por las células monocito-macrofágicas. Las células positivas presentan un precipitado de color café. Como se muestra en la **FIGURA 13**, la subpoblación de mQ presentó una mayor positividad para ambos anticuerpos ( $>80\%$ ), mientras que en la subpoblación de Fb, menos del 20% fueron positivas para CD 68. Por lo tanto, utilizando tres tipos de técnicas (morfología, inmunocitoquímica e histoquímica) se puede concluir que las subpoblaciones se encuentran enriquecidas en más de un 80%.

Para evaluar el contenido de progenitores de fibroblastos en la médula ósea de pacientes, se realizó el ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F). Como se muestra en la **FIGURA 14**, no se encontró ninguna diferencia entre el número de CFU-F de pacientes y de médula ósea normal. Estos resultados apoyan los resultados obtenidos por Coutinho (1990) en donde se reportan niveles normales de estos progenitores en la médula ósea de pacientes con SMD. Sin embargo en el estudio de Coutinho si se encontró una deficiencia proliferativa en estos progenitores, debido a que el número de resiembras era limitado a comparación del número de resiembras de fibroblastos provenientes de médula ósea normal. En el presente estudio como se muestra en la **FIGURA 15** no se encontraron diferencias en la cinética de proliferación de fibroblastos de pacientes y normales. Es importante mencionar que la curva de proliferación se siguió únicamente por 10 días, por lo que posiblemente pudiera encontrarse una alteración en el crecimiento a un plazo mayor de tiempo.

Para evaluar los niveles de apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL en ambas subpoblaciones. Como control se utilizó la línea celular 32-D, esta es una línea celular mieloide murina que es dependiente de IL-3. Cuando se cultiva en ausencia de IL-3 las células sufren apoptosis. El control negativo de la técnica consistió en frotis de células 32-D cultivadas en ausencia de IL-3 pero sin agregar la enzima TdT. El control positivo consistió de células 32-D cultivadas tanto con IL-3 como sin IL-3, agregando la enzima TdT. Como se muestra en la **FIGURA 16** no se encontraron células positivas en el control negativo, mientras que el 70% de las células cultivadas en ausencia de IL-3 fueron positivas para apoptosis; este porcentaje disminuyó hasta 15% cuando se agregó IL-3 a los cultivos. Las muestras tanto de subpoblaciones de fibroblastos como de macrófagos normales presentaron menos de 10% de sus células en apoptosis. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Raza et al (1995) en donde observaron que ocasionalmente las células estromales de médula ósea normal eran positivas para la técnica de ISEL (la cual es una técnica similar a la técnica de TUNEL). A pesar de que la media del porcentaje de apoptosis tanto en fibroblastos como en macrófagos de pacientes con SMD fue superior al de médula ósea normal, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados difieren del estudio realizado por Raza et al (1995), en donde se reporta que existe una elevada proporción de células del estroma ISEL-positivas. La diferencia puede deberse a que en el presente estudio las células del estroma (tanto la subpoblación de Fb como de mQ) se encuentran aisladas de factores del microambiente o de células hematopoyéticas, y el estudio de Raza fue realizado en biopsias de pacientes, por lo que las células del estroma se encuentran inmersas en la complicada red de interacciones que existen en el microambiente hematopoyético.

Estos resultados sugieren que las células del estroma en las biopsias de pacientes están siendo inducidas a la muerte celular por apoptosis por factores del microambiente que no se encuentran presentes en los cultivos *in*

*in vitro* de subpoblaciones enriquecidas. Es importante resaltar, que otra posibilidad es que no se hayan encontrado diferencias significativas entre los niveles de apoptosis de médula ósea normal y de pacientes con SMD, debido a la heterogeneidad de los datos y al bajo número de muestras de médula ósea normal; por lo que será necesario analizar un mayor número de muestras en un estudio posterior.

De acuerdo con estos resultados, no se encontraron diferencias en el crecimiento de fibroblastos de pacientes con SMD, ya que su cinética de crecimiento y el número de progenitores de fibroblastos fue semejante al de médula ósea normal. Así como no se encontró diferencia en los niveles de apoptosis de fibroblastos y de macrófagos aislados de pacientes y sujetos normales.

Como parte de la caracterización funcional de las capas tanto de fibroblastos como de macrófagos, se midieron los niveles de SCF, IL-6 y TNF $\alpha$  (que también fueron cuantificadas en los LTMC) en el sobrenadante de las subpoblaciones enriquecidas. El medio condicionado (MC) del cultivo de fibroblastos fue obtenido en la segunda resiembra cuando el cultivo se encontraba en un 90% de confluencia, y el medio condicionado del cultivo de macrófagos se obtuvo a los dos días de haber realizado el pase de células no adherentes a las cajas, (en ese tiempo los macrófagos se habían adherido y se retiraron todas las células no adherentes -ver metodología). Los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron por 24 horas con RPMI y 20% de sustituto de suero. El medio condicionado se filtró con un poro de 0.2 $\mu$  y se guardó a -20°C hasta ser utilizado.

Como se muestra en la **FIGURA 17** la subpoblación de macrófagos presentó niveles por debajo de lo detectable de SCF, lo cual se encuentra reportado en la literatura ya que los macrófagos no son productores de esta citocina (Dorshkind 1990, Mayani H 1992, Deryugina, Müller-Sieburg 1993). En cuanto a la población de fibroblastos, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de SCF en la subpoblación de fibroblastos provenientes de pacientes y de médula ósea normal. Ambas fracciones presentaron niveles muy bajos (1.5 y 3.4 pg/ml). Los niveles fueron más bajos a los reportados en otros estudios (Gutiérrez M et al 2000). Estos resultados no reflejan la disminución en los niveles de SCF en el plasma de pacientes con SMD y lo encontrado en la capa de estroma en LTMC, por lo que posiblemente la producción de SCF por parte de los fibroblastos *in vivo* esté siendo inhibida por algún factor presente en el MH.

En cuanto a los niveles de IL-6, la subpoblación de macrófagos tanto normales como de pacientes presentaron niveles muy bajos (0.056ng/ml y 0.016 ng/ml) (**FIGURA 18**), y no se encontró diferencia significativa entre los niveles de expresión de IL-6 entre macrófagos de pacientes y macrófagos normales.

Estos resultados apoyan lo obtenido por Mencoboni (1996) y por Visani (1993), estos autores no encontraron diferencia en los niveles de IL-6 entre macrófagos estimulados por LPS de pacientes y normales. Los niveles de IL-6 en este estudio fueron inferiores de los encontrados por los mencionados autores, esto debido a que en este estudio los macrófagos no fueron estimulados. Por lo que con estos resultados se sugiere que los macrófagos de pacientes cuando se encuentran aislados no producen más IL-6, contrario a lo que se había reportado trabajando con biopsias de pacientes (Kitagawa 1997).

En el 63% de las muestras de MC de fibroblastos de pacientes se encontraron niveles de IL-6 superiores al rango normal (0.015 – 5ng/ml) (**FIGURA 18**), siendo la media de 27 ng/ml en los MC de fibroblastos de pacientes y de 1.75 ng/ml en el MC de fibroblastos normales. Los niveles de IL-6 en fibroblastos normales concuerdan con los niveles encontrados en el estudio de Lagneaux et al (1996), estos autores midieron los niveles de IL-6 en cultivos de fibroblastos de médula ósea utilizando un kit de ELISA comercial, ellos reportaron una producción de 2.5 ng/ml. No se encuentran reportes que indiquen los niveles de IL-6 en capas de fibroblastos de pacientes con SMD, sin embargo es interesante mencionar que en el estudio de Lagneaux et al analizaron el efecto de la infección de las capas de fibroblastos por citomegalovirus (CMV) y encontraron que la infección por CMV incrementaba los niveles de IL-6 hasta 23ng/ml, dichos niveles son muy similares a los encontrados en las capas de pacientes con SMD. Por lo que es importante considerar una posible infección viral como la causante del aumento de los niveles de IL-6, aunque sin dejar de considerar otras posibles explicaciones eg. que los fibroblastos provengan de la clona anormal.

Como se muestra en la **FIGURA 19**, el 33% de las muestras de MC de macrófagos de pacientes presentaron niveles de TNF $\alpha$  superiores al rango normal (0.5-241 pg/ml). Sin embargo, la media de los niveles de TNF $\alpha$  en las muestras de macrófagos de todos los pacientes con SMD (148 pg/ml con un rango de 0.6-577 pg/ml) no resultó ser significativamente diferente al de médula ósea normal (67 pg/ml) posiblemente por la gran heterogeneidad en las muestras. Si bien estos resultados concuerdan con lo obtenido por Visani (1993) y Mencoboni (1996) en donde encontraron niveles normales de TNF $\alpha$  en subpoblaciones de macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), difieren de los estudios realizados en biopsias de médula ósea (Shetty 1996 y Kitagawa 1997), en donde reportaron que los macrófagos de pacientes producían niveles elevados de TNF $\alpha$  en comparación con biopsias de individuos sanos. Estos resultados son muy interesantes ya que al parecer los macrófagos de pacientes con SMD, cuando se encuentran aislados no producen una mayor cantidad de TNF $\alpha$ , dicho incremento se observa únicamente cuando los macrófagos se encuentran en contacto con otros componentes del microambiente, por lo que puede sugerirse que los macrófagos de pacientes con SMD necesitan ser estimulados por otro componente del MH.

Como se esperaba, los niveles de TNF $\alpha$  en fibroblastos normales fue muy baja (1.5 pg/ml) (FIGURA 19), ya que se encuentra reportado que los fibroblastos de médula ósea normal no producen esta citocina (Dorshkind 1990, Mayani H 1992, Deryugina 1993).

A pesar que los fibroblastos de médula ósea normal no producen TNF $\alpha$ , encontramos que el 83% de las muestras de MC de fibroblastos de pacientes con SMD presentaron niveles elevados de TNF $\alpha$  (207 pg/ml) con un rango de 0.2 a 392 pg/ml. No se encuentra reportado en la literatura que los fibroblastos de médula ósea produzcan ésta citosina, sin embargo fibroblastos provenientes de otros tejidos como la dermis y tejido cardíaco (Lind M 1998) son productores de ésta citocina, incluso su producción es inducida por IL-6, IL-1 y TNF $\alpha$ , por lo que es necesario realizar nuevos estudios con fibroblastos aislados en un 100% y determinar si necesitan ser estimulados para producir TNF $\alpha$  y cual es la razón de que la produzcan, posiblemente estén infectados con algún virus o provengan de la clona anormal.

Estos trabajos sugieren que los macrófagos de pacientes con SMD no producen una mayor cantidad de TNF $\alpha$  ni de IL-6 cuando se encuentran aislados, sin embargo, *in vivo* los macrófagos pueden estar siendo estimulados a producir cantidades elevadas de esta citocina, como se ha mostrado en los estudios con biopsias o en capas de cultivos a largo plazo. Es importante considerar que una pequeña proporción de macrófagos de pacientes (33%) produce cantidades elevadas de TNF $\alpha$  aún sin haber sido estimulados con LPS, por lo que posiblemente en estos pacientes existan otros factores que están afectando su producción de citocinas.

En este estudio reportamos que las capas enriquecidas de fibroblastos de pacientes con SMD expresan una mayor cantidad de TNF $\alpha$  y de IL-6. Es importante resaltar que en estas capas de fibroblastos no se encuentran células hematopoyéticas por lo que el efecto es exclusivo de células del estroma; con lo que podemos concluir que el componente del microambiente hematopoyético en pacientes con SMD se encuentra alterado.

Debido a que las capas enriquecidas de fibroblastos contienen un 20% de macrófagos, con este estudio no podemos discernir si son los fibroblastos o los macrófagos los que están produciendo una mayor cantidad de IL-6 y de TNF $\alpha$ . Una posible explicación es que los fibroblastos hayan inducido al componente de macrófagos (probablemente a través de la producción de IL-1) a producir grandes cantidades de estas citocinas (ya que cuando se encuentran aislados no producen una mayor cantidad de IL-6 ni de TNF $\alpha$  ) o posiblemente los macrófagos hayan estimulado a los fibroblastos a producir estas citocinas. Otra explicación



alternativa es que los fibroblastos no necesiten de la estimulación, sino que su producción de citocinas se encuentre alterada (**FIGURA 23**) por provenir de la clona anormal o estar infectados por algún virus.

Para estudiar si el MC tanto de la subpoblación de fibroblastos como la de macrófagos tenía un efecto inhibitor, se evaluó el efecto del MC sobre progenitores hematopoyéticos normales en cultivos semisólidos de día cero. El MC se obtuvo de la misma forma que para la cuantificación de citocinas, almacenándose a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El control consistió en agregar el 10% de medio RPMI con sustituto de suero únicamente y del MC de fibroblastos y de macrófagos se agregó el 10% tanto de pacientes como de médula ósea normal como control a cultivos semisólidos. Como se observa en la **FIGURA 20**, el MC de macrófagos normales (MON) no tuvo un efecto inhibitor sobre los progenitores normales, incluso en algunas muestras se encontró un efecto estimulador. Contrariamente, el MC de macrófagos de pacientes con SMD inhibió en un 20% el crecimiento de progenitores hematopoyéticos normales. Estos resultados corroboran lo obtenido por Ohmori (1993) este autor observó una inhibición en el crecimiento de progenitores. La diferencia de ambos estudios se encuentra en que en el estudio de Ohmori únicamente se evaluó el efecto sobre progenitores mieloides. En este estudio los progenitores hematopoyéticos que fueron evaluados fueron tanto eritroides, como mieloides y multipotenciales.

Los MC tanto de fibroblastos normales como de pacientes no tuvieron ningún efecto en el crecimiento de progenitores hematopoyéticos normales (**FIGURA 20**); sin embargo en el MC de fibroblastos de algunos pacientes se observó un efecto estimulador, aunque no fue significativo.

Con estos resultados podemos concluir que los macrófagos de pacientes con SMD producen una molécula inhibitora de progenitores hematopoyéticos normales diferente a  $\text{TNF}\alpha$ , ya que en su MC no se encontraron niveles elevados de esta citocina. Otras moléculas inhibitoras producidas por los macrófagos son la IL-1 y el MIP-1 $\alpha$  (Dorshkind 1990, Mayani H 1992, Deryugina, Müller-Sieburg 1993) por lo que es necesario realizar otros estudios evaluando estas dos moléculas.

Para evaluar si el efecto inhibitor del MC de macrófagos de pacientes con SMD afectaba también a progenitores hematopoyéticos de pacientes con SMD, se agregó el 10% del MC de macrófagos normales y de pacientes a progenitores hematopoyéticos de pacientes con SMD (**FIGURA 21**). Aunque la media del número de colonias con el MC de macrófagos fue 20% menor con respecto al control, no se encontró un efecto estadísticamente significativo en la reducción del número de colonias de progenitores hematopoyéticos con ningún medio condicionado ni de macrófagos normales ni de pacientes, por lo que estos resultados sugieren que los progenitores hematopoyéticos de pacientes con SMD tienen una

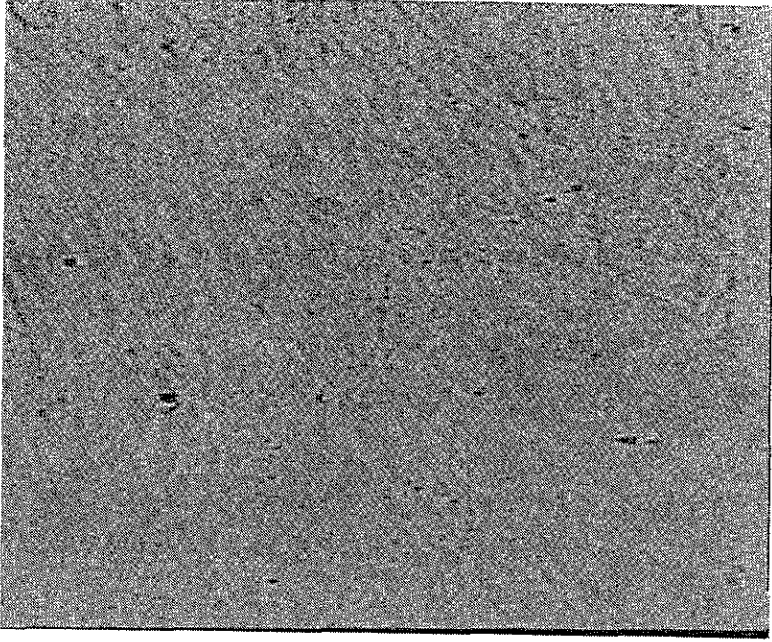
sensibilidad alterada a las citocinas, ya que el MC de macrófagos normales no aumentó el número de colonias en ningún caso y el MC de macrófagos de pacientes no disminuyó significativamente el crecimiento de los progenitores hematopoyéticos de pacientes.

Para evaluar si el MC de macrófagos de pacientes y normales tenía un efecto en la proliferación de las células hematopoyéticas tanto maduras (CMN) como inmaduras (CD34+) de pacientes con SMD, se agregó 10% del MC a cultivos líquidos de células hematopoyéticas por 72 horas (**FIGURA 22**).

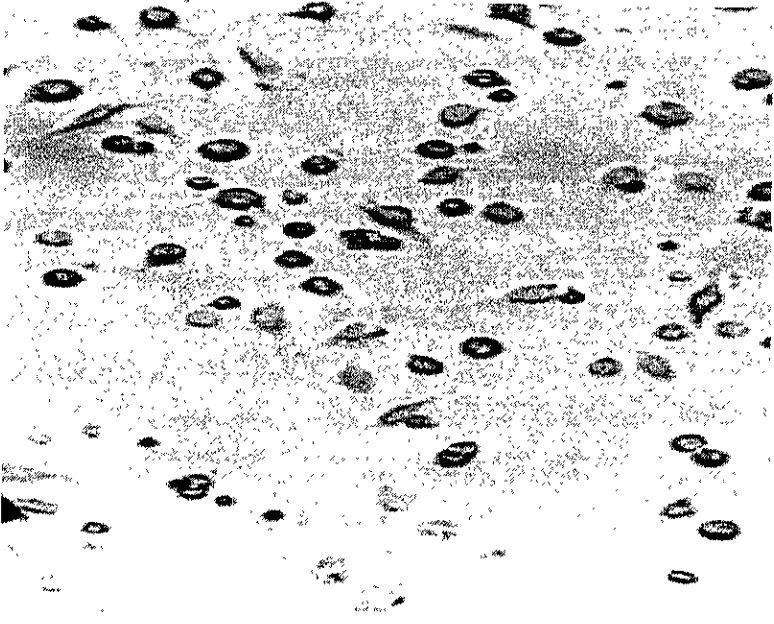
El control consistió en la adición del 10% de medio RPMI con sustituto de suero, y como control positivo se agregó 10% de MC de células gigantes y el factor estimulador GM-CSF. El MC de células gigantes aumentó la proliferación tanto de CMN como de células CD34+, mientras que el GM-CSF estimuló en una mayor proporción (3.5 veces) a las células más inmaduras CD34+ que a las células maduras mononucleares (1.5 veces). El MC de macrófagos de pacientes no afectó la proliferación ni de CMN ni de células CD34+ de pacientes con SMD, por lo que puede suponerse que los macrófagos no están produciendo citocinas estimuladoras, ya que el MC de macrófagos normales sí estimula la proliferación de las CH tanto CMN como CD34+ de pacientes con SMD.

Figura 12

A



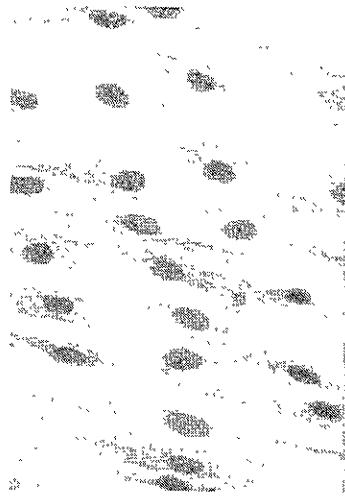
B



Fotografía en microscopio invertido de la capa de fibroblastos en la caja de cultivo en la segunda resiembra (Fotografía A) y fotografía de la capa de macrófagos en cultivo (Fotografía B).

Figura 13

FIBROBLASTOS



MACROFAGOS



MORFOLOGIA

% POSITIVIDAD

FOSFATASA  
ALCALINA

84

20

CD68

17

80

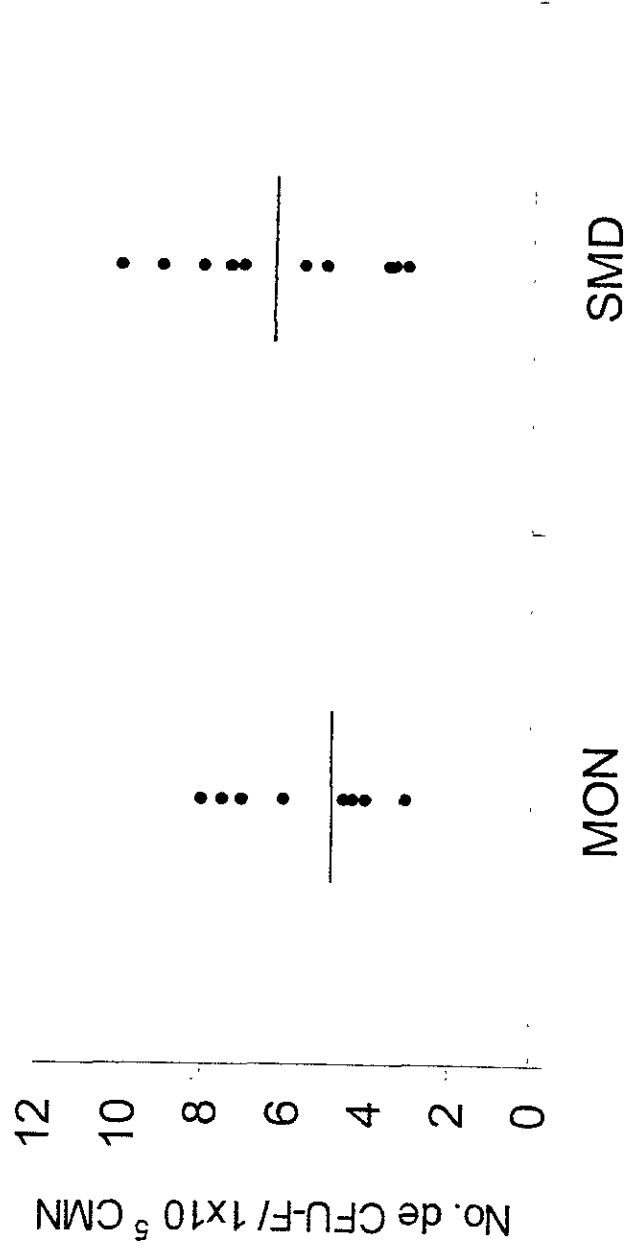
CD14

NR

85

NR. No realizado.

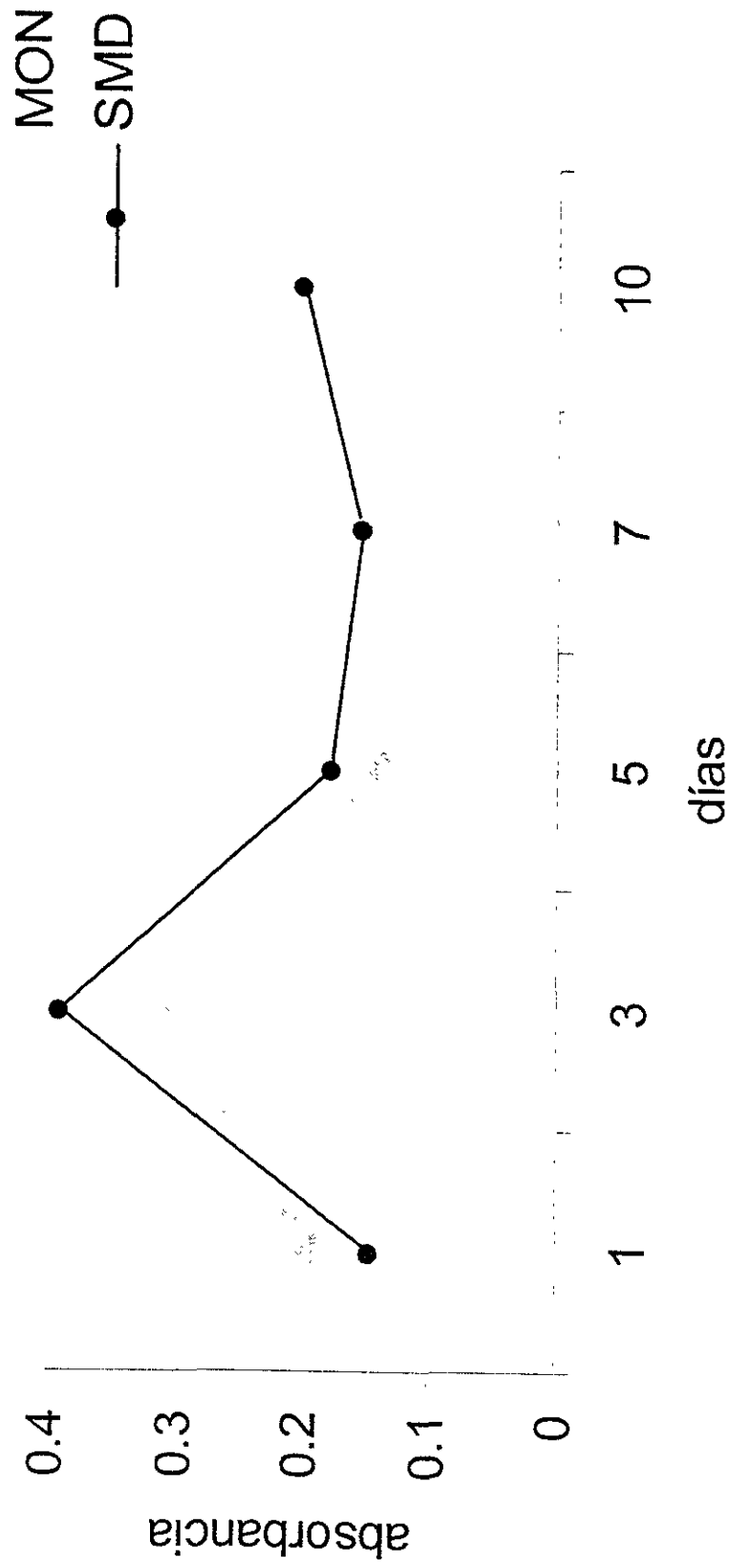
Figura 14



Número de unidades formadoras de colonias de fibroblastos de pacientes (SMD) y de medula ósea normal (MON) por 100 000 células mononucleares. La barra representa la media en ambos casos. Los puntos negros representan cada paciente.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

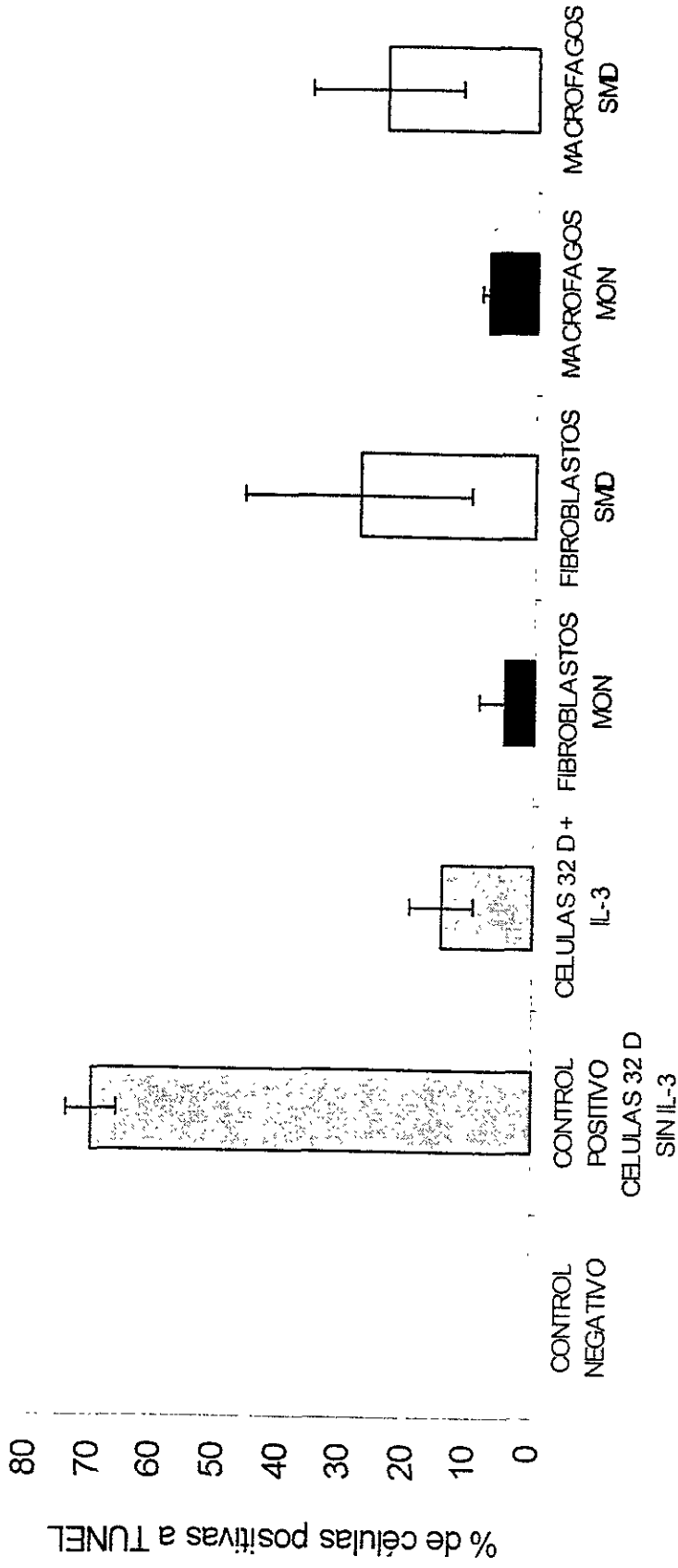
Figura 15



Cinética de proliferación de fibroblastos provenientes de la médula ósea de pacientes (SMD) y de médula ósea normal (MON).

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

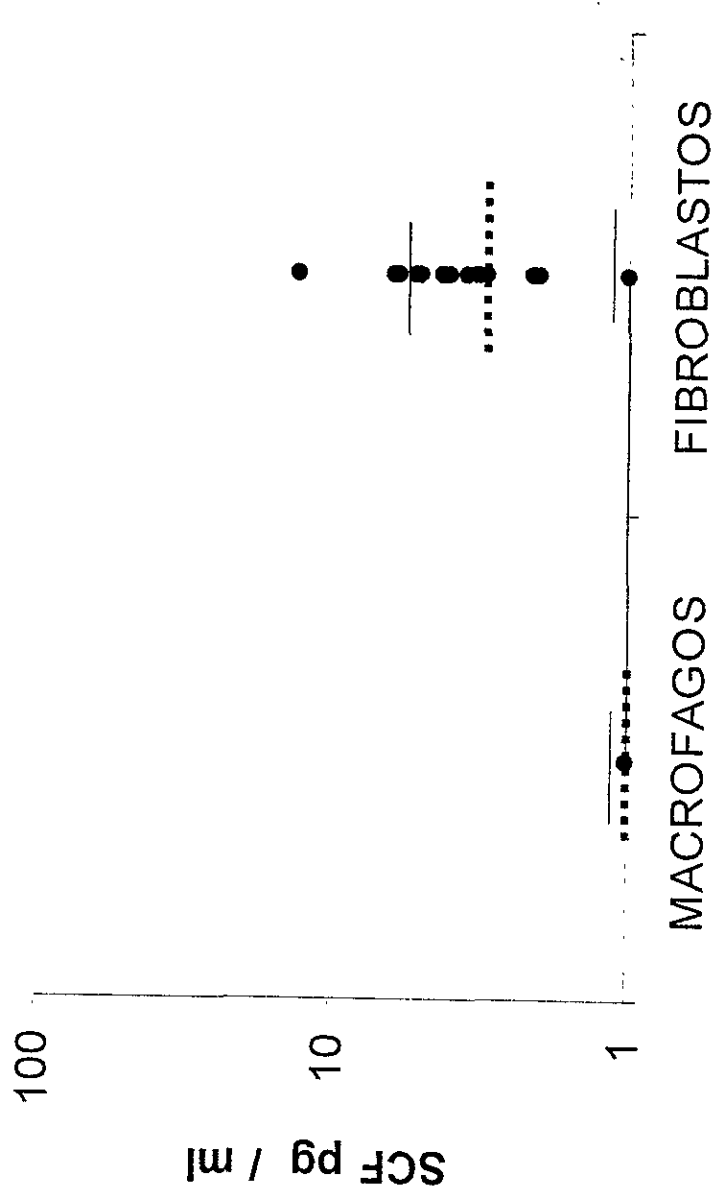
Figura 16



Niveles de apoptosis en subpoblaciones enriquecidas de fibroblastos y macrófagos provenientes de la médula ósea de pacientes (SMD) y de médula ósea normal (MON).

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

Figura 17

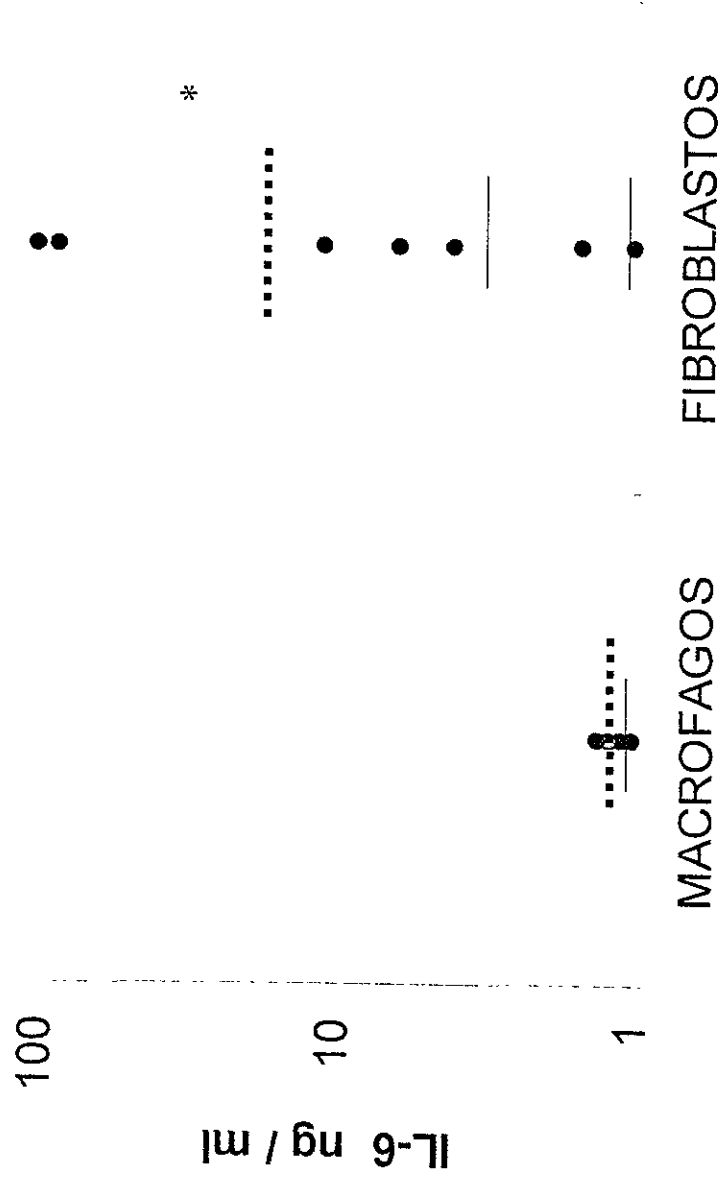


Niveles de SCF en el medio condicionado de subpoblaciones enriquecidas de fibroblastos y macrófagos provenientes de la médula ósea de pacientes con SMD. Las barras representan el rango de médula ósea normal como control. La barra discontinua representa la media de los niveles de SCF en pacientes con síndrome mielodisplásico.

\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$



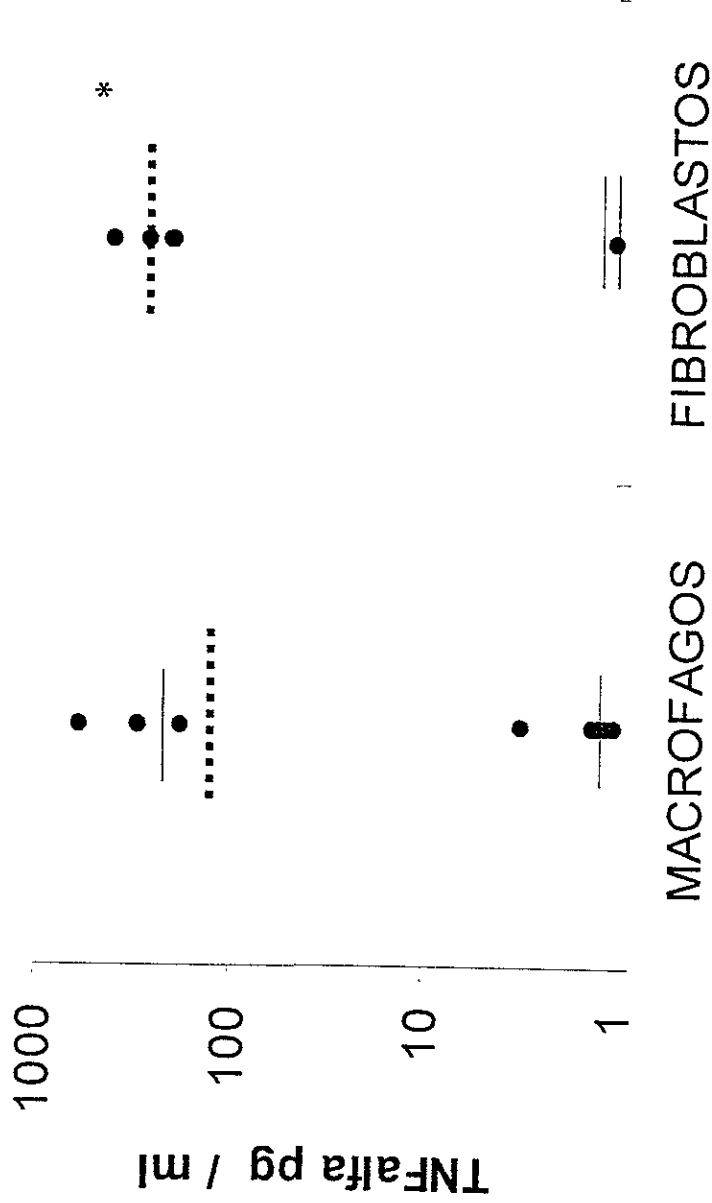
Figura 18



Niveles de IL-6 en el medio condicionado de subpoblaciones enriquecidas de fibroblastos y macrófagos provenientes de la médula ósea de pacientes con SMD. Las barras representan el rango de médula ósea normal como control. La barra discontinua representa la media de los niveles de IL-6 en pacientes con síndrome mielodisplásico.

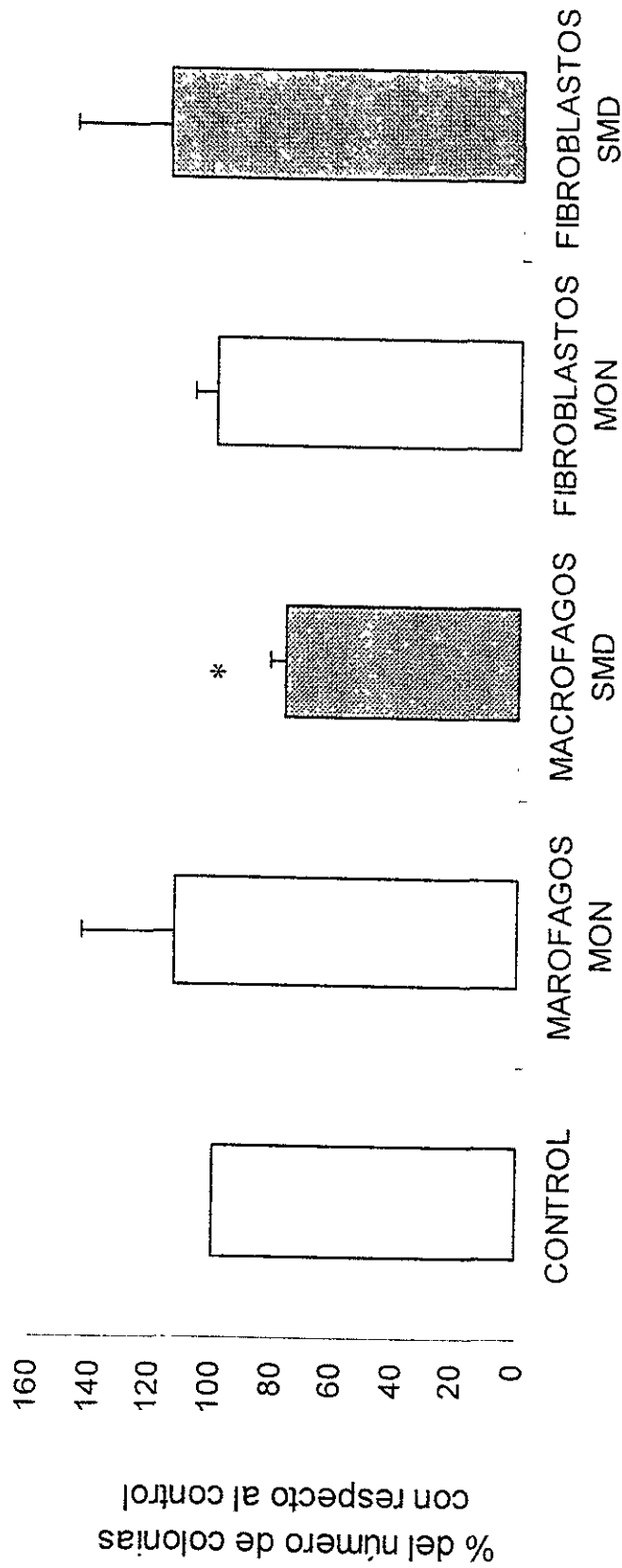
\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

Figura 19



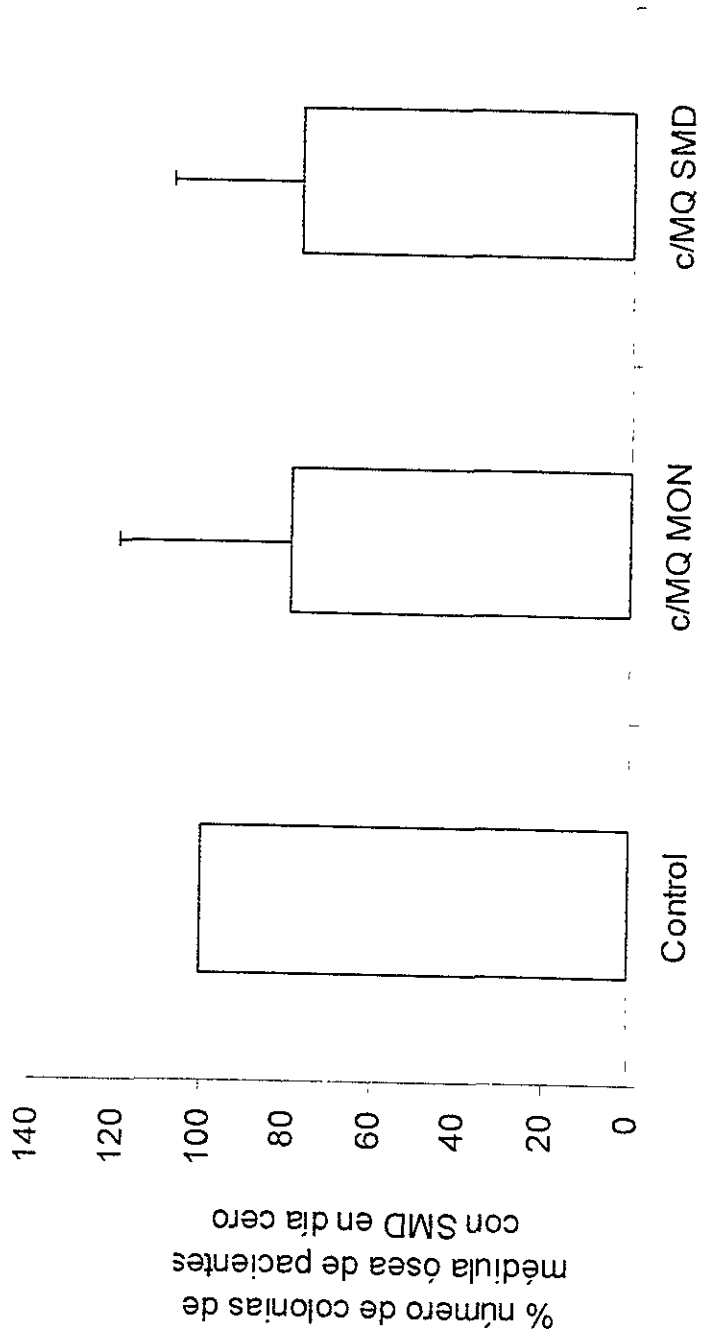
Niveles de TNF $\alpha$  en el medio condicionado de subpoblaciones enriquecidas de fibroblastos y macrófagos provenientes de la médula ósea de pacientes con SMD. Las barras representan el rango de médula ósea normal como control. La barra discontinua representa la media de los niveles de TNF $\alpha$  en pacientes con síndrome mielodisplásico. \* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

Figura 20



Efecto del medio condicionado de macrófagos y fibroblastos tanto de médula ósea normal (MON) como de pacientes (SMD) sobre progenitores hematopoyéticos normales en día cero.  
\* Estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

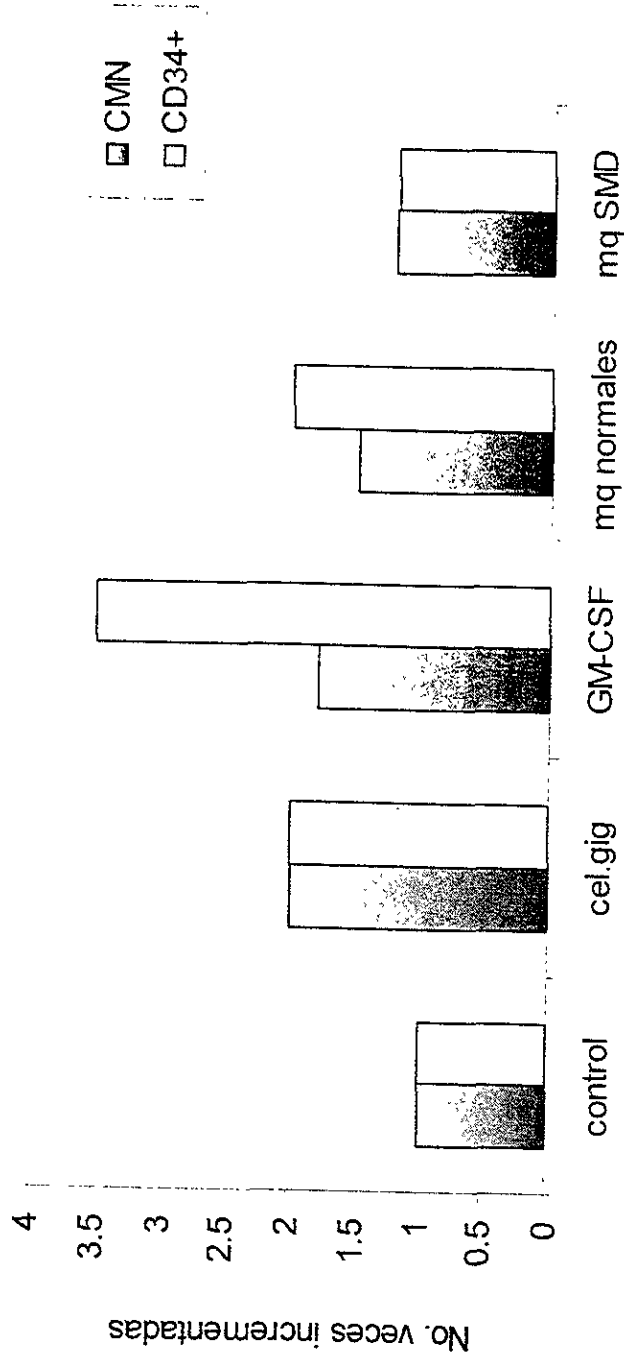
Figura 21



Efecto del medio condicionado de macrófagos tanto de médula ósea normal (MON) como de pacientes (SMD) sobre progenitores hematopoyéticos de pacientes con síndrome mielodisplásico.

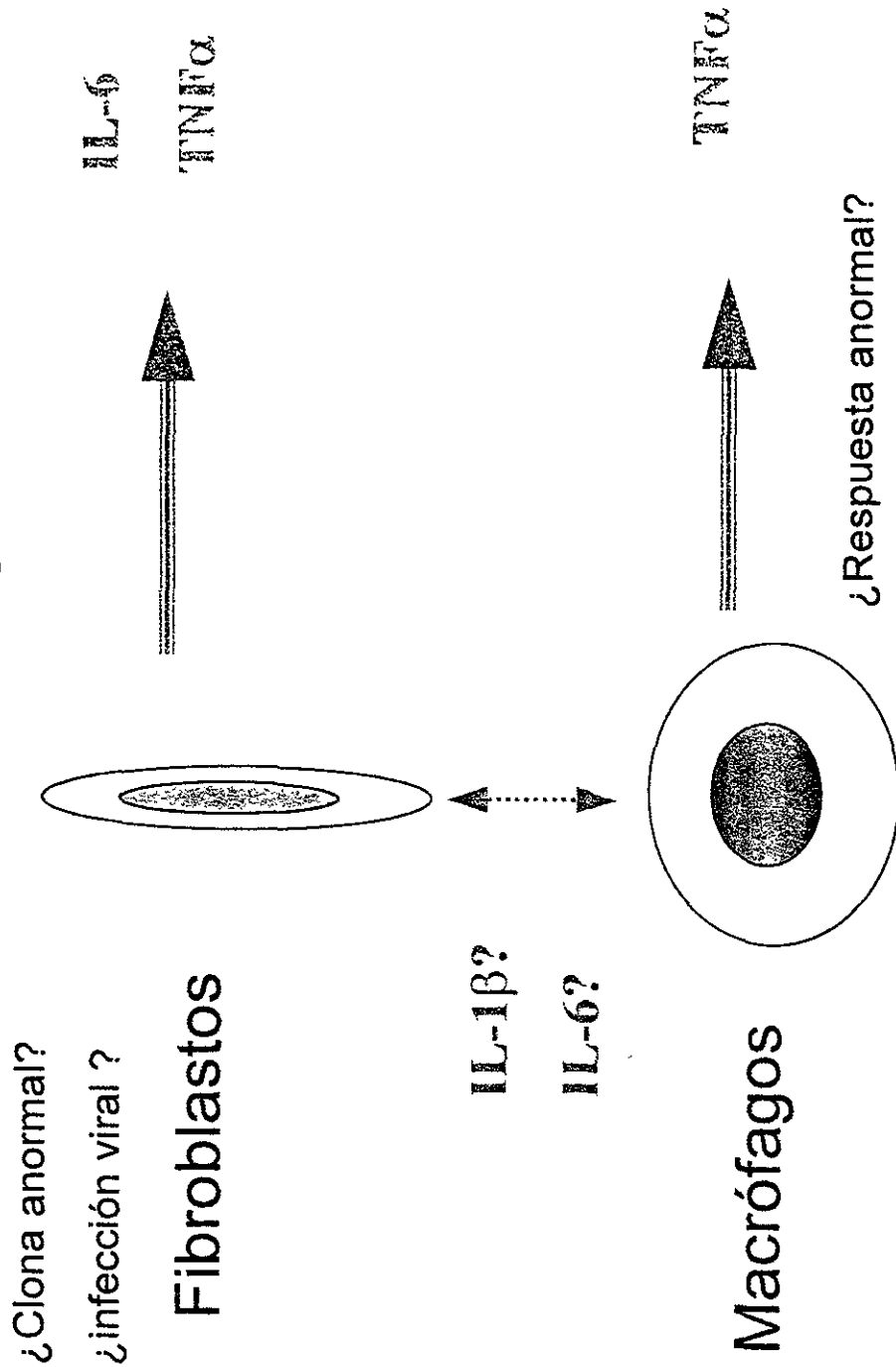
\* Estadísticamente significativo.  $p < 0.05$

Figura 22



Efecto del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y del medio condicionado de células gigantes (cel.gig) y de macrófagos (mq) de pacientes (SMD) y normales en la proliferación de progenitores hematopoyéticos (CD34+) y células mononucleares (CMN) de pacientes con SMD

Figura 23



Mecanismos hipotéticos de la producción de TNF-alfa e IL-6 en pacientes con SMD. 1.- los fibroblastos inducen al componente de macrófagos (probablemente a través de la producción de IL-1β y/o IL-6). 2.- los macrófagos estimulan a los fibroblastos (probablemente a través de la producción de IL-1β y/o IL-6). 3.- los fibroblastos no necesitan de la estimulación, sino que su producción de citocinas se encuentra alterada por provenir de la clona anormal o estar infectados por algún virus.

## CONCLUSIONES

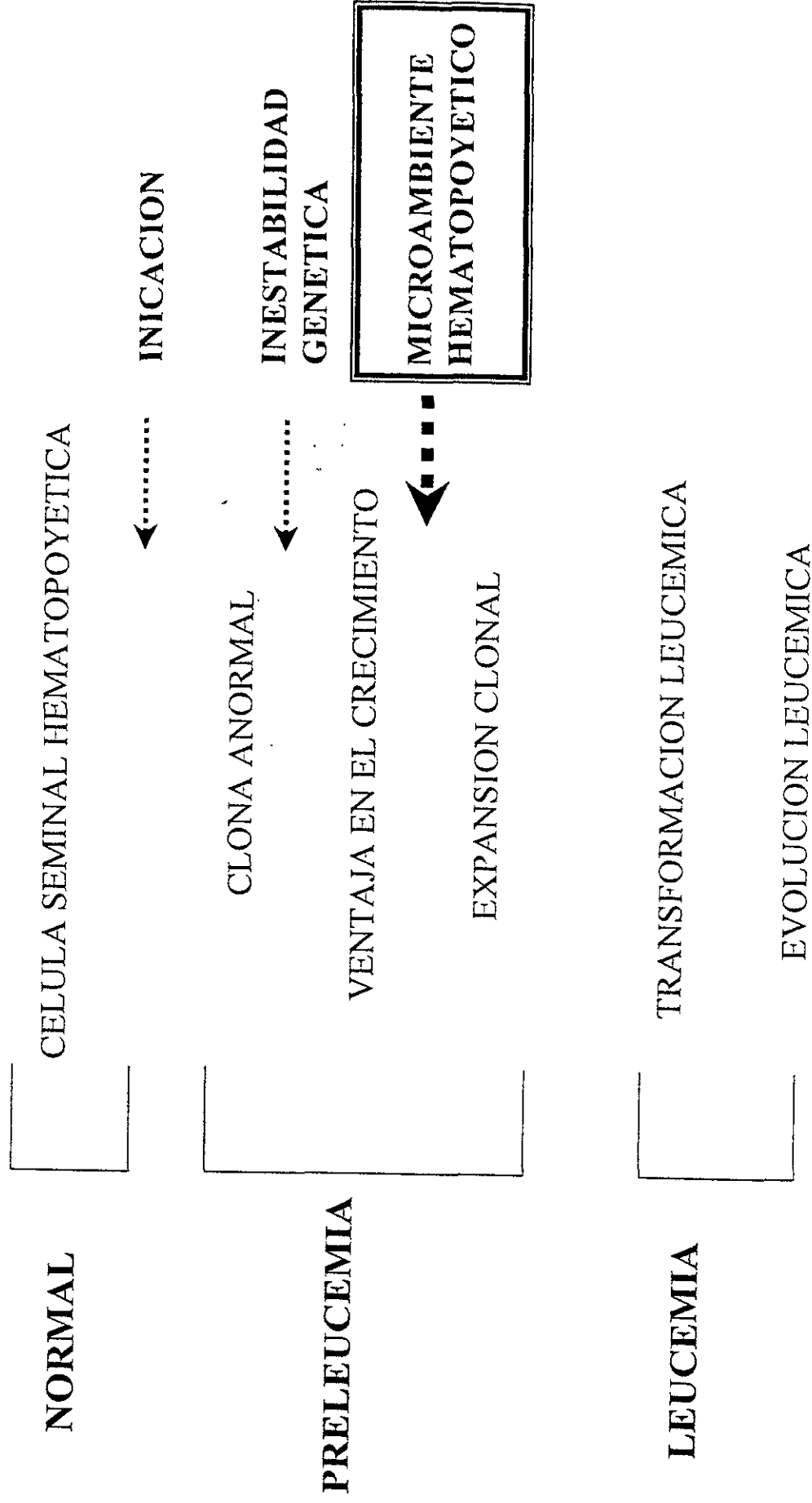
De acuerdo con los resultados del presente estudio podemos concluir que el microambiente hematopoyético de los pacientes con síndrome mielodisplásico se encuentra alterado. Los estudios realizados en los cultivos a largo plazo sugieren, que a pesar de que la capa de estroma en los LTMC de pacientes con SMD no presenta anormalidades cuantitativas (es confluyente y no presenta diferencias en la proliferación ni en la muerte celular comparado a médula ósea normal), sí presenta anormalidades cualitativas, el número de progenitores adheridos se encuentra muy por debajo del de médula ósea normal y su producción de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-6 y SCF) se encuentra alterada.

Gracias al diseño experimental del presente estudio, en donde se estudiaron dos de los componentes más importantes del MH en forma aislada y en cultivos libres de células hematopoyéticas, podemos concluir que existe una producción alterada de citocinas por parte de las capas enriquecidas de fibroblastos de pacientes con síndrome mielodisplásico. Al igual que en los estudios en LTMC, no encontramos diferencias cuantitativas, el crecimiento de fibroblastos de pacientes con SMD fue normal al igual que su cinética de crecimiento y el número de progenitores de fibroblastos. Así como no se encontró diferencia en los niveles de apoptosis de fibroblastos y de macrófagos aislados de pacientes y normales.

Estos trabajos sugieren que los macrófagos de pacientes con SMD no producen una mayor cantidad de TNF $\alpha$  ni de IL-6 cuando se encuentran aislados, sin embargo, *in vivo* los macrófagos pueden estar siendo estimulados a producir cantidades elevadas de esta citocina, como se ha mostrado en los estudios con biopsias o en capas de cultivos a largo plazo.

De acuerdo con los resultados del presente estudio podemos concluir que el microambiente hematopoyético de los pacientes con síndrome mielodisplásico se encuentra alterado cualitativamente, y que dicha alteración puede contribuir al desarrollo y progresión de éstos síndromes. Por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos, postulamos que el papel del microambiente hematopoyético en la fisiopatología de los síndromes mielodisplásicos sea el de conferir una ventaja en el crecimiento a la clona mielodisplásica (mediante la secreción alterada de citocinas), lo que conlleva a una expansión de ésta clona y finalmente a la transformación leucémica (**FIGURA 24**).

Figura 24



Modelo de leucemogénesis propuesto por Jacobs A (1991)



## PERSPECTIVAS

Es importante realizar estudios utilizando capas purificadas al 100% tanto de fibroblastos y macrófagos. Una estrategia para obtener capas más enriquecidas de fibroblastos puede ser el llevarlos a cuatro resiembras para eliminar la mayor cantidad de macrófagos, así como pasar las capas de fibroblastos por una columna inmunomagnética de selección negativa con anticuerpos dirigidos a las células mono-macrofágicas (CD14, CD64). Una alternativa para obtener capas más enriquecidas de macrófagos sería utilizar columnas de selección positiva utilizando los anticuerpos CD14 y CD64 y cultivando éstas células con IMDM y permitiendo su adherencia. El contar con capas purificadas de éstas dos subpoblaciones nos permitirá demostrar si es la población de fibroblastos la que se encuentra alterada o es la interacción fibroblastos – macrófagos y de ser así, cual es la molécula señal y si es necesaria la interacción célula-célula o la interacción es únicamente humoral, por lo que será necesario realizar estudios utilizando membranas que permitan el paso de proteínas pero que no permitan el contacto celular, así como realizar experimentos sobre capas de fibroblastos y variando la cantidad de macrófagos co-cultivados.

Como un proyecto futuro será importante analizar no solamente la producción de citocinas por parte de las células del estroma sino también estudiar la producción y síntesis de moléculas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión. Así como evaluar la capacidad de las capas de estroma para soportar la hematopoyesis normal.

Para poder saber si los fibroblastos provienen de la clona anormal, se deberán de realizar estudios citogenéticos tanto de fibroblastos como de células hematopoyéticas y comparar si presentan las mismas anormalidades. Así como poder evaluar si los fibroblastos se encuentran infectados por algún tipo de virus, enfocándose primeramente a algunos tipos virales como el citomegalovirus que se sabe, puede alterar la secreción de citocinas pero no el crecimiento de los fibroblastos.

Debido a que los macrófagos aislados no producen una mayor cantidad de  $TNF\alpha$ , será necesario realizar experimentos para saber cual es la molécula que los activa *in vivo*, agregando citocinas recombinantes como IL-1, IL-6 y  $TNF\alpha$  a cultivos de macrófagos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams JC, Watt FM. 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117:1183.
2. Aizawa S et al. 1999. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation *in vitro*. *Leukemia Research*. 23:239.
3. Alberts B et al. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3<sup>rd</sup> edition. Garland Publishing Inc. N.Y. & London.
4. Anagnostou A, Dainiak N, Najman A. 1991. Negative Regulators of Hematopoiesis. Studies on their Nature, Action and Potential Role in Cancer Therapy. *Annals New York Academy of Science*, Volume 628. pp 31, 192.
5. Ashekenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*.281:1305-1308.
6. Avalos-Diaz E, Alvarado-Flores E, Herrera-Esparza R. 1999. UV-A irradiation induces transcription of IL-6 and TNF-alpha genes in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Revue Du Rhumatisme*, English Edition. 66(1):13.
7. Axelrad A. 1990. Some Hemopoietic Negative Regulators. *Exp- Hematol*. 18:143.
8. Bartram CR. 1996. Molecular genetic aspects of myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology* 33(2):139.
9. Bathia R et al. 1995. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*.85(12): 3636.
10. Bathia R et al. 1996. Interferon- $\alpha$  restores normal  $\beta 1$  integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 87(9): 3883-3891.
11. Bathia M. et al. 1998. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nature Medicine*. 4(9):1038.
12. Baum CM et al. 1992. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*. 89:2804.
13. Berardi AC. et al. 1995. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science*. 267:104.
14. Bernasconi P. et al. 1994. Karyotype in myelodysplastic syndromes: relations to morphology, clinical evolution and survival . *American Journal of Hematology*. 46:270.
15. Beutler E<sup>a</sup>. et al. 1995. *Clinical Hematology* 8<sup>o</sup> edition. Ley and Fobiger. Philadelphia.
16. Beutler E<sup>b</sup>. et al. 1995. *Williams Hematology* 5<sup>o</sup> edition. Mc Graw Hill. International edition.
17. Bock AT, Brugger W and Kanz L. 1997. *Hematopoietic Stem Cells*. AlphaMed Press. USA.
18. Bogdanovic A, et al 1997. Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment. *Leukemia*. 11:656.
19. Bowen DT et al. 1998. Poor response rate to a continuous schedule of amifostine therapy for low/intermediate risk myelodysplastic syndrome patients. *British Journal of Hematology*. 103:785.
20. Borbenyi Z et al. 1987. The growth of myelodysplastic bone marrow in long-term cultures. *The Macmillan Press Ltd*.
21. Broxmeyer H. et al. 1990. Enhancing and Suppressing Effects of Recombinant Murine Macrophage Inflammatory Proteins on Colony Formation In Vitro by Bone Marrow Myeloid Progenitors Cells. *Blood*. 76(6): 1110.
22. Cariquist JF et al. 1999. Cytomegalovirus induction of interleukine-6 in lung fibroblasts occurs independently of active induction and involves a G protein and the transcription factor, NF- $\kappa$ B. *The Journal of Infectious Diseases* 179:1094.

23. Cashman J, Eaves A, Eaves CJ. 1985. Regulated proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells in long-term human marrow cultures. *Blood*. 66:1002.
24. Castro-Malaspina H et al. 1980. Characterization of human bone marrow fibroblast colony forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56:289.
25. Chapman RS, Gregory CD, Dive C. 1996. Apoptosis in hematopoiesis and leukemogenesis. *Blood Cell Biochemistry*; 7: 151.
26. Clark S y Kamen R. 1987. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236:1229.
27. Cohen JJ. 1993. Apoptosis. *Immunology Today*. 14 (3):126.
28. Coutinho LH et al. 1990. Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). *British Journal of Haematology* 75: 16.
29. Craig W, Kay R, Cutler R, Lansdorp P. 1993. Expression of thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine*.177:1331.
30. Crichton MB. 1996. Expression of transcripts of interleukine-6 and related cytokines by human breast tumors, breast cancer cells, and adipose stromal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*.118:215.
31. Dan K et al. 1993. Megakaryocyte, erythroid and granulocyte-macrophage colony formation in myelodysplastic syndromes. *Ascta Haematol*. 89:113.
32. Deryugina E. Müller-Sieburg.1993. Stromal cells in long-term cultures: keys to the elucidation of hematopoietic development?. *Critical Reviews in Immunology*. 13(2):115.
33. Dexter T and White H. 1990. Growth without inflation. *Nature*. 344:380.
34. Dorshkind K.1990. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Ann Rev. Immunol*. 8:111.
35. Dror Y y Freedman M. 1999. Shwachman-diamond syndrome: an inherited preleukemic bone marrow failure disorder with aberrant hematopoietic progenitors and faulty marrow microenvironment. *Blood*. 94(9):3048.
36. Eaves C, Cashman J, Eaves A.1991. Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. *J.Tiss.Culth.Meth*. 13:55.
37. Ellis ER, Yuan J, Horvitz RH. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev Cell Biol*. 7:663.
38. Flores-Figueroa E, Gutiérrez-Espindola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chavez J, Mayani H. 1999. Hemopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: in vitro growth and long-term proliferation. *Leukemia Research*. 23:385.
39. Ganser A and Hoelzer D. 1996. Clinical use of hematopoietic growth factors in the myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology* 33(3):186.
40. Geis LJ, Dai LY.1996. Cytomegalovirus modulates interleukine-6 gene expression. *Transplantation* 62(5):653.
41. Golde W.1991. The Stem Cell. *Scientific American* 12:86Lansdorp P. 1995. Developmental changes in the function of hemopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 23:187.
42. Goldwasser E. 1984. Erythropoietin and its mode of action. *Blood Cells* 10:147.
43. Gordon MY. 1988. Extracellular matrix of the marrow microenvironment. *British Journal of Haematology*.70:1.
44. Graham GJ. et al. 1990. Identification and Characterization of an inhibitor of hemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344:29.
45. Greaves MF, Barret AJ, Gordon MY. 1993. *Bone Marrow Disorders. The biological basis of treatment*. Second edition. Blackwell Scientific Publications. pp:167.
46. Greenberg BR, Wilson FD, Wou T. 1981. Granulopoietic effects of human bone marrow fibroblastic cells and abnormalities in the granulopoietic microenvironment. *Blood*. 58:557.
47. Greenberg PL, and Beth M. 1979. The preleukemic syndrome. *The American Journal of Medicine*. 66:951.
48. Greenberg PL. 1996. Biological and clinical implications of marrow culture studies in the mielodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology* 33(2):163.

49. Greenberg P et al. 1997. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 89(6): 2079.
50. Gupta P, Mc Carthy J, Verfaillie C. 1996. Stromal fibroblasts heparan sulfate is required for cytokine-mediated ex vivo maintenance of human long-term culture-initiating cells. *Blood* 87(8): 3229.
51. Gutiérrez Rodríguez, Reyes-Maldonado, Mayani H. 2000. Characterization of the adherent cells developed in dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 18:46..
52. Hayase Y et al. 1997. Osteoclast development from hematopoietic stem cells: apparent divergence of the osteoclast lineage prior to macrophage commitment. *Experimental Hematology*. 25:19.
53. Hibi T, Nakajima K y Hirano T. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 74:1-12.
54. Hodgson GS, Bradley TR. 1979. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment:. *Clinical Haematology*. Second edition. Sandoz Atlas.
55. Hoffbrand VA, Petit EJ.1994.Evidence for a pre-CFU-S cell. *Nature*. 281:381.
56. Hofmann WK et al. 1996. Myelodysplastic syndromes: Clinical features. *Seminars in Hematology* 33 (3):177.
57. Huang S y Terstappen L. 1992. Formation of hematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature*. 360: 745.
58. Huan S y Terstappen L. 1994. Formation of hematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells [ retraction of Huang S, Terstappen. *Nature*. 360: 745-749] *Nature* 368 (6472):664.
59. Humphries R, Eaves C, Eaves A. 1981. Self -renewal of hemopoietic stem cells during mixed colony formation *in vitro*. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*.78.3629.
60. Hyde P, Zucker-Franklin D. 1987. Antigenic differences between human platelets and megakaryocytes. *American Journal of Pathology*. 127 (2): 149.
61. Hynes R. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11.
62. Israels LG, Israels ED. 1999. Apoptosis. *Stem Cells*; 17:306.
63. Isumi Y et al. 1999. Adrenomedullin suppresses interleukin-1beta-induced tumor necrosis factor-alpha production in Swiss 3T3 cells. *FEBS letters*. 463(1-2): 110.
64. Jacobs A (1991). Genetic lesions in preleukemic. *Leukemia* 5:277.
65. Juneja H y Gardner F. 1985. Functionally abnormal marrow stromal cells in aplastic anemia. *Experimental Hematology* 13: 194.
66. Kitagawa M et al. 1997. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  and interferon (IFN) - $\gamma$  by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 11:2049.
67. Koeffler HP.1992. *Hematology/Oncology Clinics of North America, Myelodysplastic syndromes*. W:B: Saunders Company.
68. Koenigsmann M et al. 1992. Myeloid and erythroid progenitor cells from normal bone marrow adhere to collagen type I. *Blood*. 79:657.
69. Koudies PA, Bennett JM. 1996. Morphology and classification of the myelodysplastic syndromes and their pathologic variants. *Seminars in Hematology* 33 (2):95.
70. Kouides PA, Bennett JM. 1997. Understanding the Myelodysplastic Syndromes. *The Oncologist*. 2: 389.
71. Koury M y Bondurant M. 1990. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science*.248:378.
72. Lagneaux A et al. 1996. Human cytomegalovirus increases constitutive production of interleukine-6 and leukemia inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *Blood* 84:59.
73. Lansdorp P. 1995. Developmental changes in the function of hemopoietic stem cells. *Experimental Hematology*. 23:187.
74. Leppley P et al. 1996. Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndrome? *British Journal of Haematology*, 95:368.

75. Lerat H et al. 1993. Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures. *Blood* 82(5):1480.
76. Lind M et al. 1998. Effects of particulate debris on macrophage-dependent fibroblast stimulation in coculture. *J Bone Joint Surg Br.* 80-B(924-930).
77. Long W M, Wicha MS. 1993. The hemopoietic Microenvironment. John Hopkins.
78. *Martínez-Jaramillo G, Flores-Figueroa E, Gómez Morales E, Sánchez-Valle E, Mayani H.* (en revisión). Tumor necrosis factor  $\alpha$  levels in long-term marrow cultures from patients with aplastic anemia: modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *American Journal of Hematology.*
79. Mayani H<sup>a</sup>. Las células seminales del sistema hematopoyético (en revisión)
80. Mayani H<sup>b</sup> et al. 1988. In vitro growth of myeloid and erythroid progenitor cells from myelodysplastic patients in response to recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Leukemia* 1:29.
81. Mayani H<sup>c</sup> 1990. Factores de crecimiento hematopoyéticos. *Ciencia y Desarrollo.* VolXVI (92):29-38
82. Mayani H<sup>d</sup> Guilbert L, Janowska-Wiwczonek. 1992. Biology of the hemopoietic microenvironment. *European Journal of Hematology.* 49:225.
83. Mayani H<sup>e</sup> 1992. La producción de las células sanguíneas. A treinta años del primer encuentro con las CFU-S. *Ciencia y Desarrollo.* 104:54.
84. Mayani H<sup>f</sup> et al. 1992. Production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human long-term marrow cultures from normal subjects and patients with acute myelogenous leukemia: effect of recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Leukemia.* 6(11): 1148.
85. Mayani H<sup>g</sup> et al. 1993. Functional characterization of fibroblastic cells in long-term marrow cultures from patients with acute myelogenous leukemia. *Leukemia.* 7(10): 1564.
86. Mayani H<sup>h</sup> 1993. Human Preleukemia: cellular, molecular and clinical aspects. *Archives of Medical Research* 4:317.
87. Mayani H<sup>i</sup> Dragowska W. and Lansdorp PM. 1993. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood.* 81(12): 3252.
88. Mayani H<sup>j</sup> 1996. Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia.* 10:1041.
89. Mayer JR, Canellos GP. 1996. Primary myelodysplastic syndrome and secondary disorders. *Leukemia.* Chapter 26. Sixth edition. Saunders Company.
90. Masters GS et al. 1995. Responsiveness to Stem Cell Factor (SCF) of peripheral blood colony-forming cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research.* 8:561.
91. Mc Mullin MF et al 1998. Long-term bone marrow culture profiles in patients with myelodysplastic syndromes are not explicable by defective apoptosis. *Leukemia Research.* 22:735.
92. Mencoboni M et al. 1996. Production of tumor necrosis factor and granulocyte colony stimulating factor by bone marrow accessory cells in myelodysplastic patients. *European Journal of haematology.* 56:148.
93. Metcalf D, Moore M. 1971. *Haemopoietic Cells.* North-Holland Publishing Co. Amsterdam. pp 550.
94. Morosetti R, Koeffler PH. 1996. Differentiation therapy in myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology* 33 (3):236.
95. Mundle D, et al, 1994. Novel in situ double labeling for simultaneous detection of proliferation and apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 42 (12): 1533.
96. Mundle D, et al. 1996. Indication of an involvement of Interleukine-1 $\beta$  converting enzyme-like protease in intramedullary apoptotic cell death in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 88(7):2640.
97. Murwani R, Armati P. Peripheral nerve fibroblasts as a source of IL-6, TNF-alpha and IL-1 and their modulation by IFN gamma. *Journal of Neurological Sciences.* 161(2):99
98. Nagata S 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355.

99. Nijhoff W et al. 1995. Mechanistic options of erythropoietin-stimulated erythropoiesis. *Experimental Hematology* 23:360.
100. Ogata K et al. 1997. Cell cycle modulation by hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes: Analysis by three-color flow cytometry. *Experimental Hematology* 25: 8.
101. Ogawa M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 81:2844.
102. Ohmori S. et al. 1993. MDS-macrophage derived inhibitory activity on myelopoiesis of MDS abnormal clones. *British Journal of Haematology* 83:388.
103. Okada M et al. 1995. Clonal analysis in MDS (refractory anemia) by FISH and X-chromosome inactivation pattern using PCR. *Proc Am Soc Hematol* 86:799a (abstr.3183).
104. Orlic D, Bodine DM. 1994. What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC. Please stand up!. *Blood*. 84,12:3991.
105. Perkins S and Feishman. 1988. Hematopoietic Microenvironment. *J,Clin.Invest.*81:1072.
106. Plumb M. 1991. Molecular aspects of a negative regulator of haemopoiesis. *Br. J. Cancer.*64: 990.
107. Potts JR. & Campbell LD. 1994. Fibronectin structure and assembly. *Curr. Opin Cell Biol.* 6:648.
108. Rafii S et al. 1994. Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hemopoietic progenitor cell adhesion. *Blood*. 84 (1):10.
109. Rafii S et al. 1995. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood*. 86(9): 3353.
110. Rajapaksa R et al. 1996. Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome bone marrow. *Blood* 88 (11): 4275.
111. Raza A. et al. 1994. Increased apoptosis as the significant cause of ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood*. 84 (10) suppl. 1 (abstr. 2528).
112. Raza A, et al. 1995. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cell in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 86 (1) 268.
113. Raza A et al. 1996. A paradigm shift in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 10:1648.
114. Rosati S, Anastasi J and Vardiman J. 1996. Recurring diagnostic problems in the pathology of the myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology* 33(2):111.
115. Russell S, et al. 1996. Human Osteoblast support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*.87:518.
116. Sawada K et al.1999. Role of physiologic concentrations of stem cell factor in leukemic type growth of myelodysplastic CD34+ cells. *Leukemia Research*. 23:1
117. Smith Brian. 1990. Regulation of hematopoiesis. *The yale journal of biology and medicine* 63:371.
118. Soligo D et al. 1994. CD34 Immunohistochemistry of bone marrow biopsies: prognostic significance in primary myelodysplastic syndrome. *American Journal of Hematology* 46:9.
119. Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445.
120. Sutherland HL et al. 1990. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3584.
121. Szilvassy SJ et al. 1989. Retrovirus-mediated gene transfer to purified hemopoietic stem cells with long repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8789.
122. Taichman RS et al. 1996. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in in vitro bone marrow cultures. *Blood*. 87(2):518.
123. Taichman RS et al.<sup>a</sup> 1997. Infection and replication of human cytomegalovirus in bone marrow stromal cells: effects on the production of IL-6, MIP-1 $\alpha$ , and TGF- $\beta$ . *Bone Marrow Transplantation* 19:471.
124. Taichman RS et al.<sup>b</sup> 1997. Augmented production of interleukine-6 by normal human osteoblasts in response to CD34+ hematopoietic bone marrow cells in vitro. *Blood* 89(4):1165.
125. Tavassoli M. 1991. Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells* 1:269.
126. Testa NG and Molineux G. 1993. Hemopoiesis. A practical approach. Irl Press. Oxford University Press.
127. Thomson AW. 1994. The Cytokine Handbook. Second edition. Academic Press. pp 265-283, 319-337, 441-442.

128. Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. 267(5203):1456.
129. Thompson B E. 1998. The many roles of c-myc in apoptosis. 60:575.
130. Tohyama K et al. 1994. Altered responses of purified blast cells from the myelodysplastic syndromes to colony-stimulating factors in vitro: comparison with normal blast cells. *Experimental Hematology* 22:539.
131. Torok-Storb B. 1988. Cellular Interactions. *The journal of the american society of hematology*. 72(2): 373.
132. Verfaillie CM y Catanzaro P.1996. Direct contact with stroma inhibits proliferation of human long-term culture initiating cells. *Leukemia* 10:498.
133. Visani S et al.1993.Impairment of GM-CSF production in myelodysplastic syndromes.*British Journal of Haematology* 84:227.
134. Visser JW, Van Bekkum. 1990. Purification of pluripotent hemopoietic stem cells: Past and Present. *Experimental Hematology*. 18:248.
135. Vuillet-Gaugler MH et al. 1990. Loss of attachment to fibronectin with terminal human erythroid differentiation. *Blood* 75(4):865.
136. Wetzler M et al. 1995. Cytokine expression in adherent layers from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 19(1):23.
137. Wheatton D, Gordon J. 1996. *Blood Cell Biochemistry 7: hematopoietic cell growth factors and their receptors*. Plenum Press. Chapter 14: stem cell factor. Ian Mc Niece and Robert Bridell.
138. Wineman J et al. 1996. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood* 87(10):4082.
139. Wynter EA et al. 1998. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells*.16:387.
140. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. 1999. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 93 (11): 3587.
141. Yoder MC, Williams DA. 1995. Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* 23: 961.
142. Yoshida Y. 1993. Hypothesis: apoptosis may be responsible for the premature intramedullary cell death in the myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 7:144.
143. Yokoyama T et al. 1999. Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor-alpha in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology*. 276(6Pt2):H1968.
144. Yuan J.1997. Transducing signals of life and death. *Current opinion in cell biology*. 9:247.
145. Zanjani E et al. 1998. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol* 26:353.
146. Zucker-Franklin D, and Petursson S.1984. Thrombocytopoiesis-analysis by membrane tracer and freeze-fracture studies on fresh human and cultured mouse megacaryocytes. *J.Cell.Biol.* 99:390.