



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Medicina

“ESTUDIO DE LAS CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES EN PACIENTES CON LEUCEMIA
GRANULOCÍTICA CRÓNICA TRATADOS CON
IMATINIB”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

LIBB. Laura Gómez Ceja

Directora de Tesis: Dra. Eugenia Flores Figueroa

México, D.F.

Marzo, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de enero de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **GÓMEZ CEJA LAURA** con número de cuenta **300736205** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES EN PACIENTES CON LEUCEMIA GRANULOCÍTICA CRÓNICA TRATADOS CON IMATINIB"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DR. IVAN VELASCO VELÁZQUEZ
Secretario: DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA
Suplente: DR. JESÚS CHIMAL MONROY
Suplente: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de marzo de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo recibido durante estos dos años.
- Al apoyo recibido por parte del CONACYT para la realización de este trabajo.
- A todos los miembros del Comité Tutoral por su tiempo y esfuerzo en la asesoría brindada para la realización del estudio.
- A todos los integrantes del Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Muchas gracias por su amistad, apoyo y aprendizajes obtenidos durante la realización de este trabajo.

- A mi mamá, la persona a la que más quiero y a quien le debo todo lo que soy y todo lo que he logrado hasta ahora.
- A mi papá, mi fan número uno... por siempre.
- A mi hermano, compañero de toda mi vida desde siempre y hasta siempre. Alguien a quien admiro profundamente y me inspira para poner mi mejor esfuerzo para conseguir lo que quiero.
- A Pablo, a quien amo y ha estado conmigo en las buenas y en las malas.
- A mi tía Salo y mi tío Manuel quienes apoyaron mi carrera académica y me alentaron en el camino con su cariño.
- A mi familia, por estar siempre a mi lado.

"No existen conocimientos más elevados o más bajos, sino un conocimiento único que emana de la experimentación."

Leonardo Da Vinci

(1452-1519)

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	5
I. Introducción	7
1. Hematopoyesis.....	7
1.1 Componente hematopoyético.....	7
1.2 Componente vascular.....	10
1.3 Componente mesenquimal.....	12
2. Microambiente hematopoyético.....	14
2.1 Distribución del microambiente hematopoyético.....	18
2.1.1 Zona endosteal.....	20
2.1.1.1 Osteoblastos.....	20
2.1.1.2 Osteoclastos.....	22
2.1.2 Zona media.....	23
2.1.2.1 Macrófagos.....	23
2.1.2.2 Fibroblastos estromales y células troncales mesenquimales...	25
2.1.2.3 Adipocitos.....	28
2.1.3 Zona perivascular.....	30
2.1.3.1 Células endoteliales.....	30
2.2 Homeostasis ósea, el microambiente y la hematopoyesis.....	31
3. Leucemia granulocítica crónica.....	32
3.1 Características clínicas y hematológicas.....	33
3.2 Biología de la leucemia granulocítica crónica.....	34
3.2.1 El cromosoma Filadelfia.....	34
3.2.2 Adhesión e interacción con proteínas del citoesqueleto.....	36
3.2.3 Activación de vías de señalización mitogénicas.....	37
3.2.4 Inhibición de la apoptosis.....	37
3.3 Tratamientos utilizados en el manejo de leucemia granulocítica crónica....	38
4. Imatinib.....	39
4.1 Mecanismo de acción y efectos biológicos.....	39
4.2 Inhibición de otras cinasas y su uso clínico en otros padecimientos.....	41

II. Antecedentes	43
1. Factores de modifican el microambiente hematopoyético.....	43
1.1 Moléculas solubles.....	43
1.2 Enfermedades hematológicas.....	46
1.3 Agentes físicos o químicos.....	47
2. Efectos del Imatinib en el microambiente hematopoyéticos y las CTM.....	49
III. Planteamiento del Problema	52
IV. Hipótesis	52
V. Objetivo General	53
VI. Objetivos Particulares	53
VII. Metodología	55
1. Obtención de las muestras biológicas.....	55
2. Obtención de células troncales mesenquimales.....	55
3. Cultivo de células troncales mesenquimales.....	56
4. Evaluación del fenótipo de células troncales mesenquimales.....	57
5. Estudio de la capacidad de diferenciación.....	58
5.1 Diferenciación condrogénica.....	58
5.1.1 Tinción citoquímica con azul alciano.....	58
5.2 Diferenciación adipogénica.....	59
5.3 Diferenciación osteogénica.....	59
5.3.1 Tinción citoquímica de Von Kossa.....	60
6. Análisis de la presencia del rearreglo BCR-ABL.....	60
7. Ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F).....	62
8. Ensayos de proliferación.....	62
9. Determinación de la expresión de moléculas de adhesión.....	62

10. Cuantificación del potencial de diferenciación.....	63
10.1 Osteogénesis: Análisis de la expresión de osteocalcina.....	63
10.2 Adipogénesis: Cuantificación con rojo oleoso.....	64
10.2.1 Tinción citoquímica con rojo oleoso.....	65
IX. Resultados y Discusión.....	66
1. Muestras biológicas.....	66
2. Obtención de una población de CTM de MON, LGC-V y LGC-IM.....	67
3. Caracterización de las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM.....	68
3.1 Análisis morfológico.....	70
3.2 Determinación del fenotipo.....	72
3.3 Evaluación del potencial de diferenciación de las CTM.....	76
4. Determinación de la presencia del BCR-ABL en las CTM de LGC.....	79
5. Análisis de la frecuencia de CTM en médula ósea de pacientes con LGC.....	81
6. Análisis de la proliferación de CTM de MON, LGC-V y LGC-IM.....	86
7. Determinación de la expresión de moléculas de adhesión en las CTM.....	89
8. Cuantificación del potencial de diferenciación osteogénico y adipogénico.....	94
8.1 Expresión de osteocalcina en las CTM bajo inducción osteogénica.....	94
8.2 Capacidad de diferenciación adipogénica de las CTM.....	98
9. Análisis de la respuesta de las CTM a la estimulación con PDGF.....	101
IX. Discusión General.....	106
X. Conclusiones.....	110
XI. Perspectivas.....	110
XII. Bibliografía.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS

Los términos que se abrevian por sus siglas en inglés son anteceditos por I.

AdipoR1 y 2.- Receptor uno y dos para adiponectina
AGM.- Aorta-gónada-mesonefros
ALBP.- I. Transportador lipídico específico de adipocitos
Ang-1.- Angiopoyetina uno
AraC.- Arabinósido de citosina
ATP.- I. Trifosfato de adenosina
bFGF.- I. Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BMP-2.- I. Proteína morfogenética de hueso dos
BMPR-1a.- I. Receptor tipo uno a de la proteína morfogenética de hueso
BSP.- I. Sialoproteína de hueso
C/EBP.- I. Proteína alfa de unión a CCAAT/potenciador
CFU-F.- I. Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
CMN.- Células mononucleares
CPE.- Células progenitoras endoteliales
CPH.- Células progenitoras hematopoyéticas
CSF.- I. Factores estimulante de colonias
CTH.- Células troncales hematopoyéticas
Cy5.5.- I. Cianina
CTM.- Células troncales mesenquimales
EGF.- I. Factor de crecimiento epidermal
EGF.- I. Factor de crecimiento epidermal
EPO.- Eritropoyetina
FA.- Fosfatasa alcalina
FITC.- I. Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF.- I. Factor estimulante de colonias de granulocitos
GDP.- I. Bifosfato de guanosina
GIST.- I. Tumores estromales gastrointestinales
GM-CSF.- I. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTP.- I. Trifosfato de guanosina
ICAM.- I. Molécula de adhesión intercelular
IFN- α .- Interferón alfa
IFN- β .- Interferón beta
IFN- γ .- Interferón gamma
IL.- Interleucina
LFA.- I. Antígeno asociado a función de linfocitos
LGC.- Leucemia granulocítica crónica
LGC-IM.- Leucemia granulocítica crónica tratada con Imatinib
LGC-V.- Leucemia granulocítica crónica virgen o sin tratamiento
LIF.- I. Factor inhibidor de la leucemia
LNGFR- α .- I. Receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad alfa
LPS.- Lipopolisacárido
LTC-IC.- I. Células iniciadoras de cultivos a largo plazo
LT- β 4.- I. Linfotoxina beta cuatro

M-CSF.- I. Factor estimulante de colonias de macrófagos
MH.- Microambiente hematopoyético
MIP-1 α .- I. Proteína inflamatoria de macrófagos uno alfa
MIP-2.- I. Proteína inflamatoria de macrófagos dos
MON.- Médula ósea normal
OCN.- Osteocalcina
OPN.- Osteopontina
OSX.- Osterix
PDGF.- I. Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGF-R.- I. Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE.- I. Ficoeritrina
PECAM.- I. Molécula de adhesión de plaquetas-endotelio
Ph.- I. Cromosoma filadelfia
PPAR- γ .- I. Receptor activador gamma del proliferador de peroxisomas
RANKL.- I. Ligando de unión al receptor activado de NF κ B
RAR- γ .- I. Receptor gamma del ácido retinóico
Rb.- Proteína del retinoblastoma
SCF.- I. Factor de células troncales
SDF.- I. Factor derivado del estroma
SRC.- I. Células repobladoras de ratones inmunodeficientes
SSEA-1.- I. Antígeno embrionario etapa específico uno
TGF- β .- I. Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α .- I. Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β .- I. Factor de necrosis tumoral beta
TPO.- Trombopoyetina
VCAM-1.- I. Molécula de adhesión celular vascular uno
VEGF.- I. Factor de crecimiento del endotelio vascular
vWF.- I. Factor von Willebrand

RESUMEN

La leucemia granulocítica crónica (LGC) es una enfermedad clonal que se caracteriza por una proliferación excesiva de células mieloides, debido a la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph) y su producto proteico BCR-ABL. Esta proteína tiene actividad de cinasa de tirosina y es capaz de promover las alteraciones celulares que llevan al desarrollo del fenotipo leucémico. Por esta razón, una de las opciones terapéuticas con mayor eficacia en el manejo de esta enfermedad es el Imatinib, el cual funciona como un inhibidor de la actividad de esta proteína.

A pesar de haber sido creado como un inhibidor específico, recientemente, se ha reportado que los pacientes tratados con Imatinib durante largos períodos de tiempo, presentan alteraciones en el metabolismo mineral y un incremento en la masa ósea. Esto se explica en parte, a que el Imatinib tiene efectos en las células troncales mesenquimales (CTM) de médula ósea.

Las CTM dan origen a las células formadoras del hueso (osteoblastos), a fibroblastos estromales, adipocitos y condrocitos. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que el Imatinib tiene un efecto en la proliferación de las CTM y es capaz de incrementar su diferenciación hacia osteoblastos, aumentando así la deposición de matriz ósea. Este efecto se lleva a cabo a través de la inhibición directa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R). Se ha demostrado que el Imatinib tiene efectos sobre las CTM *in vitro*. Sin embargo, hasta el momento no se conoce si el tratamiento con este fármaco es capaz de alterar y sensibilizar a las CTM *in vivo*, y si estos efectos son reversibles y por lo tanto las CTM serían normales una vez que son extraídas del paciente.

Por esta razón, en el presente trabajo, nos propusimos analizar la frecuencia, inmunofenotipo, expresión de moléculas de adhesión, capacidad de proliferación y diferenciación de las CTM de pacientes con LGC tratados con Imatinib. Para esto, obtuvimos CTM de individuos sanos (médula ósea normal, MON), LGC sin tratamiento (virgen de tratamiento, LGC-V) y tratados con Imatinib (LGC-IM). Para comenzar nuestro estudio, corroboramos que las CTM de los tres grupos de

estudio presentaban una morfología fibroblastoide, eran CD45⁻CD14⁻CD31⁻CD90⁺CD105⁺CD73⁺ y eran capaces de diferenciarse a los distintos linajes celulares, lo que nos indicaba que estábamos trabajando con CTM. Tampoco observamos la presencia del rearrreglo BCR-ABL, lo cual demuestra que los cultivos no se encontraban contaminados con macrófagos pertenecientes al linaje hematopoyético y positivos para este rearrreglo. De forma interesante, encontramos que las muestras de médula ósea de LGC-IM presentaron una disminución en la frecuencia de CTM al compararlas con MON. Sin embargo, observamos que estas células, tanto de LGC-V como LGC-IM, proliferaron de forma similar a las de MON y que presentaban un patrón de expresión de moléculas de adhesión que concuerda con lo observado en su contraparte normal. Por último, cuantificamos la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica *in vitro*. Para la osteogénesis, analizamos la expresión de osteocalcina como marcador de osteoblastos y observamos que las muestras de LGC-V y LGC-IM son capaces de diferenciarse a osteoblastos de forma similar a la MON. En cuanto a la adipogénesis, no encontramos diferencias en la formación de adipocitos en los cultivos de CTM de los tres grupos de estudio.

Con este trabajo podemos concluir que las CTM de pacientes con LGC tratados con Imatinib presentan un fenotipo, capacidad de proliferación, expresión de moléculas de adhesión y capacidad de diferenciación normales una vez que se encuentran en cultivo. Esto nos sugiere que el efecto que tiene el Imatinib en las CTM de los pacientes es reversible, y que a pesar de encontrar una frecuencia menor de CTM en la médula ósea de pacientes con LGC tratados con Imatinib, estas tienen la capacidad de expandirse *in vitro*. Lo anterior es relevante ya que las CTM de estos pacientes tienen el potencial de ser utilizadas en trasplantes de médula ósea y en terapia celular. Es necesario realizar más estudios que analicen la capacidad de estas células para soportar la hematopoyesis, de inmunosupresión y de diferenciación a otros linajes.

ABSTRACT

Chronic granulocytic leukemia (CGL) is a clonal disorder characterized by an increased proliferation of myeloid cells caused by the presence of the Philadelphia chromosome and its proteic product BCR-ABL. This protein is a tyrosine kinase which has the ability to alter cellular functions and trigger the leukemic phenotype. For this reason, Imatinib, a drug that functions as a kinase inhibitor of BCR-ABL, is one of the current therapeutic options with higher efficacy for the management of this disease.

In spite of having been designed as a specific inhibitor for this protein, recent data demonstrate that long term treatment of CGL patients with Imatinib results in an altered mineral metabolism and an increase in bone mass. This could be explained by the fact that Imatinib is able to affect bone marrow mesenchymal stem cells (MSC).

MSC can differentiate into bone-forming cells (osteoblasts), stromal fibroblasts, adipocytes and chondrocytes. Many *in vitro* studies have reported that Imatinib inhibits MSC proliferation and enhances differentiation toward osteoblastic lineage by increasing bone matrix deposition. This effect is mediated by direct inhibition of the platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R).

Imatinib has effects on MSC *in vitro*. However, it is unknown if this drug alters MSC *in vivo* or if these effects are reversible and MSC would be normal once obtained from the patient and cultured *in vitro*.

In order to elucidate this, we analyzed the frequency, immunophenotype, adhesion molecules expression, proliferation and differentiation of MSC from healthy donors (normal bone marrow, NBM) and CGL patients untreated and treated with (GCL-IM) (GCL-IM) Imatinib. First, we corroborated that MSC derived from the three study groups had the main characteristics of MSC: a fibroblastic morphology, a CD45⁻CD14⁻CD31⁻CD90⁺CD105⁺CD73⁺ immunophenotype and the ability to differentiate into mesenchymal lineages. We also confirmed the absence of BCR-ABL in these cells. Interestingly, we found that MSC frequency in bone marrow samples derived from CGL was decreased in comparison to their normal

counterparts in regard of the treatment. However, MSC proliferation and the expression of adhesion molecules was not altered in any of the groups. Finally, we performed a quantitative analysis of the osteogenic and adipogenic differentiation potential of these cells *in vitro*. We did not find differences in the ability of MSC to produce osteoblasts and adipocytes in culture between the experimental groups.

We concluded that in spite of the decreased frequency of MSC from CGL patients with and without Imatinib treatment, when they are in culture, they had a similar immunopenotype, proliferative capacity, adhesion molecules expression, and differentiation potential. This suggest that the effect of Imatinib in MSC from these patients is reversible, and although the frequency is altered during the treatment administered *in vivo*, MSC can recover when expanded *in vitro*. This observation has many implications, in the one hand MSC from CGL and CGL-IM could be used in bone marrow transplantation and, in the other hand, they could be used in cellular therapy. However, it still has to be elucidated whether these cells can generate other cell lineages and can support hematopoiesis *in vitro*.

I. INTRODUCCIÓN

1. Hematopoyesis

En el mamífero adulto, la médula ósea es el sitio principal donde ocurre la hematopoyesis, proceso en el cual se generan todas las células sanguíneas. La sangre contiene una gran variedad de tipos celulares, cada uno de los cuales cumple con una función específica e indispensable para la vida de un organismo. Los eritrocitos o glóbulos rojos transportan oxígeno a través del cuerpo; las plaquetas participan en el proceso de coagulación sanguínea; las células blancas tanto linfoides (linfocitos) como mieloides (monocitos y granulocitos) forman parte del sistema inmune y protegen al individuo de agentes extraños e infecciosos o de células propias que sufrieron una transformación maligna. La regulación de estos procesos es sumamente compleja, ya que debe mantener la homeostasis del organismo y responder ante los cambios fisiológicos que se presentan a lo largo de la vida (Abboud y Litchman, 2001).

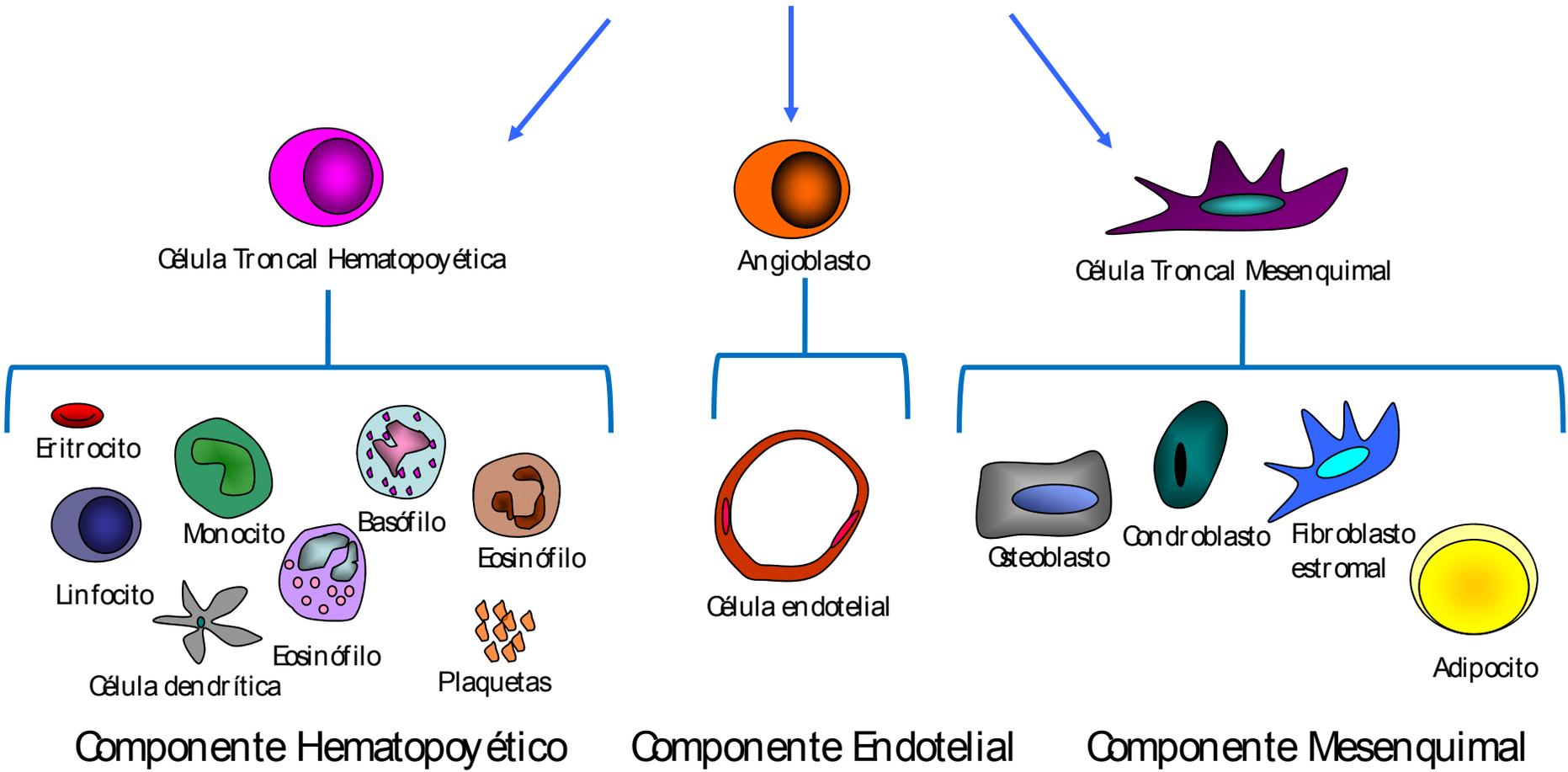
Para que la hematopoyesis se lleve a cabo se requiere de la interacción de tres componentes celulares presentes en la médula ósea: el componente hematopoyético, formado por las células troncales hematopoyéticas y su progenie; el componente vascular generado a partir de los angioblastos o células progenitoras endoteliales; y por último, el componente mesenquimal que surge a partir de las células troncales mesenquimales (Esquema 1).

1.1 *Componente hematopoyético*

Dentro de la médula ósea, el componente hematopoyético ha sido el más estudiado. Se sabe que éste se encuentra jerarquizado y dividido en varios compartimentos. El primero de ellos es el de las células troncales hematopoyéticas (CTH), las cuales, a pesar de no poder ser distinguidas por su morfología, pueden definirse mediante tres características: la autorrenovación, la multipotencialidad y la capacidad de regenerar el tejido hematopoyético. La autorrenovación es el proceso por el cual las CTH pueden producir células



Médula ósea



Esquema 1. Representación de los tres componentes celulares localizados en la médula ósea y que participan en la hematopoyesis

idénticas a ellas mismas; la multipotencialidad se refiere a la capacidad que tienen de diferenciarse a varios tipos celulares dando lugar al linaje linfóide, mieloide y eritroide; y por último, las CTH pueden reconstituir la hematopoyesis en un organismo donde el sistema fue previamente depletado (Mayani et al, 2007).

La frecuencia de CTH en la médula ósea es baja, alrededor del 0.01% del total de células. Sin embargo, a pesar de ser tan escasas son capaces de generar una gran cantidad de células maduras gracias a su elevado potencial de proliferación. A partir de una sola CTH se pueden producir 10^{13} células maduras *in vivo* y 35×10^6 *in vitro* (Metcalfe, 2001).

Para identificar y analizar a las CTH se han diseñado sistemas de estudio tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar las tres características antes mencionadas.

Dentro de los sistemas *in vitro*, el más utilizado es el de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC). Mediante este ensayo es posible detectar CTH evaluando su capacidad de generar colonias en medio semisólido después de cinco semanas de cultivo en medio líquido (Sutherland et al, 1990). El sistema *in vivo* por excelencia es aquel que permite identificar células repobladoras de ratones inmunodeficientes (SRC). Este método consiste en evaluar la capacidad de repoblación de las CTH humanas al ser transplantadas en ratones inmunodeficientes después de haber sido irradiados, para eliminar su sistema hematopoyético. Después de un lapso de tiempo se evalúa la reconstitución de la médula ósea con células humanas de los tres linajes, lo cual corrobora que las células infundidas son CTH (Ebihara et al, 2002).

Además de los ensayos funcionales, las CTH pueden ser identificadas y aisladas por su inmunofenotipo utilizando citometría de flujo y técnicas de selección positiva y negativa. Por un lado, las CTH al ser células inmaduras no expresan antígenos de linaje, entre los que se encuentran marcadores de células eritroides, linfocitos, células NK, plaquetas, monocitos y granulocitos. Esto ha permitido su enriquecimiento mediante técnicas de selección negativa (Flores-Figueroa et al, 2005). Por otro lado, el antígeno CD34 ha sido identificado como marcador de CTH y progenitoras (Bonnet, 2002), por lo que se utiliza para

aislarlas mediante citometría de flujo o selección positiva. El antígeno CD34 es expresado en 1 al 4% de las células nucleadas de médula ósea. Para eliminar a los progenitores hematopoyéticos de esta población se utiliza el marcador CD38, ya que se ha visto que éste no se encuentra o que su expresión es muy baja en las CTH (McKenzie et al, 2007).

Conforme las CTH avanzan en el proceso de maduración, dan origen al segundo compartimiento dentro de la jerarquía hematopoyética, formado por células progenitoras hematopoyéticas (CPH). Esta es una población celular muy heterogénea que constituye el 0.3% del total de las células presentes en la médula ósea (Engelhardt et al, 2002). Fenotípicamente, las CPH adquieren la expresión de los antígenos CD38, CD45RA, y CD71, y mantienen la expresión del antígeno CD34. Funcionalmente, estas células son capaces de formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos, y su potencial proliferativo es variable, pudiendo ser alto, intermedio o bajo (Mayani et al, 2007).

Las CPH a su vez, dan lugar al tercer compartimiento, que incluye a los precursores hematopoyéticos que ya son reconocibles por su morfología. A diferencia de los otros compartimientos, el potencial de proliferación de estas células es más limitado y se encuentran ya comprometidas a un linaje específico, ya sea eritroide, mielóide, megacariocítico o linfoide (Mayani, 2007).

Finalmente, los precursores maduran dando lugar a las células sanguíneas circulantes que conforman el cuarto y último compartimiento. Estas células son eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas capaces de realizar funciones biológicas específicas en el organismo (Mayani, 2007).

1.2 Componente vascular

El componente vascular está integrado por las células endoteliales y sus progenitores, denominados angioblastos o células progenitoras endoteliales (CPE). Estas células se encuentran tanto en médula ósea como en sangre periférica y se ha logrado su aislamiento y caracterización (Asahara et al, 2004). El procedimiento de obtención de las CPE incluye su capacidad de adhesión al

plástico o el uso de selección positiva utilizando anticuerpos contra marcadores como AC133, CD34 o CD31. Después de aislarlas, las células son expandidas en platos de cultivo cubiertos con fibronectina y se utiliza un medio con factores de crecimiento específicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF), que facilitan el crecimiento de células endoteliales. Estas CPE son capaces de diferenciarse a células de linaje endotelial *in vitro* y, en modelos animales de isquemia, estas células se incorporan a sitios activos de neovascularización (Asahara et al, 2004).

Mientras que las CPE derivadas de médula ósea representan células más inmaduras y son AC133⁺CD34⁺VEGFR-2⁺VE-cadherina⁺, las CPE obtenidas de sangre periférica son AC133⁻ y empiezan a diferenciarse gradualmente a células endoteliales maduras (Hristov y Weber, 2004). Se sabe que las CPE de sangre periférica son movilizadas de la médula ósea como una respuesta endógena a la isquemia tisular para posteriormente incorporarse a focos neovasculares y promover la reparación del tejido dañado. De hecho, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que es capaz de inducir la movilización de CTH de médula ósea hacia la circulación, tiene el mismo efecto en las CPE. Además de esta citocina, el VEGF, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), la angiopoyetina-1 (Ang-1) y el factor derivado del estroma (SDF) también contribuyen a la movilización de estas células (Asahara et al, 2004).

El componente vascular y el componente hematopoyético se encuentran estrechamente relacionados durante la ontogenia. De hecho, las CTH y las CPE comparten algunos determinantes antigénicos como Flk-1, Tie-2, c-Kit, CD133 y CD34 (Asahara et al, 2005). Esto sugiere que las células endoteliales y hematopoyéticas surgen a partir de un progenitor común durante el desarrollo embrionario, el cual ha sido denominado hemangioblasto. Sin embargo, este progenitor común no ha sido identificado en el mamífero adulto (Yin y Li, 2006).

1.3 Componente mesenquimal

Además de las CTH, la médula ósea alberga otro tipo de células troncales denominadas células troncales mesenquimales (CTM). Estas células, al igual que las CTH, tienen características de troncalidad como la autorenovación y la multipotencialidad, así como un alto potencial proliferativo.

Las CTM fueron identificadas inicialmente por el grupo de Friedenstein, como células adherentes no fagocíticas derivadas de médula ósea capaces de producir colonias *in vitro* y de generar tejido conectivo al ser transplantadas en ratones (Friedenstein et al, 1968). Estas células fueron llamadas unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Friedenstein et al, 1974) en analogía con las unidades formadoras de colonias hematopoyéticas, ya que en esta época todavía no se acuñaba el nombre de célula troncal mesenquimal.

Morfológicamente, las CTM presentan una forma espigada a manera de huso con un núcleo central alargado que contiene dos o tres nucleolos (Flores-Figueroa et al, 2005) y algunos grupos reportan que los cultivos no son homogéneos. De hecho, se ha enfatizado la existencia de dos tipos de células: uno denominado tipo I que se caracteriza por células pequeñas y fusiformes y otro, llamado tipo II que engloba células más grandes, aplanadas y que proliferan más lentamente (Mets y Verdonk, 1981).

Hasta la fecha, el ensayo de CFU-F es el más utilizado para evaluar la frecuencia de CTM en la médula ósea y consiste en sembrar células mononucleares en densidades muy bajas y cultivarlas durante 14 días para observar la formación de colonias de fibroblastos. En este ensayo cada colonia representa una CTM, lo que permite estimar su frecuencia.

La mayoría de los métodos hasta ahora utilizados en la obtención de CTM a partir de médula ósea se basan en el uso de un gradiente de densidad (Ficoll o Percoll), la adherencia de las células al plástico y el uso de bajas concentraciones de suero y glucosa para eliminar a las células hematopoyéticas (Friedenstein et al, 1974, 1976; Haynesworth, 1992).

Los cultivos basados sólo en la adherencia celular tienen la desventaja de carecer de pureza, ya que en la primeras resiembras también se encuentran células endoteliales y macrófagos que contaminan el cultivo (Flores-Figueroa et al, 2005). Por esta razón, se ha intentado utilizar métodos de selección y purificación más rigurosos que permitan aislar una población más homogénea. Para esto, han surgido técnicas de selección positiva utilizando anticuerpos como Stro-1 (Simmons y Torok-Storb, 1991) y el antígeno embrionario etapa específico (SSEA-4) (Gang et al, 2007). Sin embargo, estos anticuerpos no se encuentran en todas las CTM y además están presentes en otros tipos celulares, lo cual ha limitado su eficiencia.

Por otro lado, algunos grupos han utilizado métodos de selección negativa en los cuales se busca eliminar células con marcadores específicos de membrana ya conocidos, como macrófagos, linfocitos, células endoteliales y megacariocitos. De esta manera, se eliminan las células que podrían contaminar el cultivo, se evita dejar fuera a la población deseada y se favorece la obtención de cultivos más homogéneos (Flores-Figueroa et al, 2005).

Debido a la heterogeneidad en los métodos de obtención y caracterización antes mencionada; en el 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular, estableció los criterios mínimos necesarios para definir a las CTM. Se propusieron tres criterios: adherencia al plástico; que al menos 97% de la población sea positiva para CD105, CD90 y CD73, mientras que menos del 2% sea positiva para CD45/CD34/CD14 o CD11b/CD79 o CD19/HLA-DR; y por último que sean capaces de diferenciarse *in vitro* a al menos tres linajes: osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Dominici et al, 2006).

Como se mencionó con anterioridad, las CTM tienen la capacidad de diferenciarse a varios tipos celulares. Desde los primeros estudios se vio que estas células pueden dar origen a fibroblastos y osteoblastos (Friedenstein et al, 1968, 1970) y posteriormente, se observó que también son capaces de producir condrocitos y tejido conjuntivo (Owen et al, 1988), así como células adiposas o adipocitos. Además, se encontró que la capacidad de diferenciación depende del

microambiente y que no todas la CFU-F tienen el mismo potencial de diferenciación (Pittenger et al, 1999).

La diferenciación de las CTM ha sido cada vez más estudiada gracias al potencial que tienen para ser utilizadas en terapia celular y a la necesidad de estandarizar las condiciones de cultivo para generar los diferentes linajes *in vitro*. Entre los factores osteogénicos más utilizados se encuentran la dexametasona, el β -glicerofosfato y el ácido ascórbico; mientras que las moléculas necesarias para la adipogénesis son la dexametasona en combinación con isobutil-metilxantina e indometacina; y finalmente, se ha logrado obtener diferenciación hacia cartilago utilizando cultivos de alta densidad en forma de pastilla en presencia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Dennis y Charbord, 2002).

Además de esta multipotencialidad, algunos estudios sugieren que las CTM tienen plasticidad, es decir pueden diferenciarse a otros tipos celulares de distinto origen embrionario ya sea endodérmico o ectodérmico. Las CTM pueden producir células musculares y células endoteliales *in vitro* (Caplan et al, 1995; Oswald et al, 2004). También se ha encontrado que las CTM pueden originar células neuronales *in vitro* e *in vivo* produciendo astrocitos, oligodendroglia y neuronas (Sánchez-Ramos et al, 2000; Zhao et al, 2002).

Finalmente, la capacidad de diferenciación de las CTM permite que éstas contribuyan de manera importante a la regulación de la hematopoyesis porque dan origen a osteoblastos, adipocitos y fibroblastos estromales. Estas células son componentes fundamentales dentro de la médula ósea ya que forman un microambiente adecuado dentro del cual interactúan con las células hematopoyéticas y regulan sus procesos de proliferación, diferenciación y maduración.

2. Microambiente hematopoyético

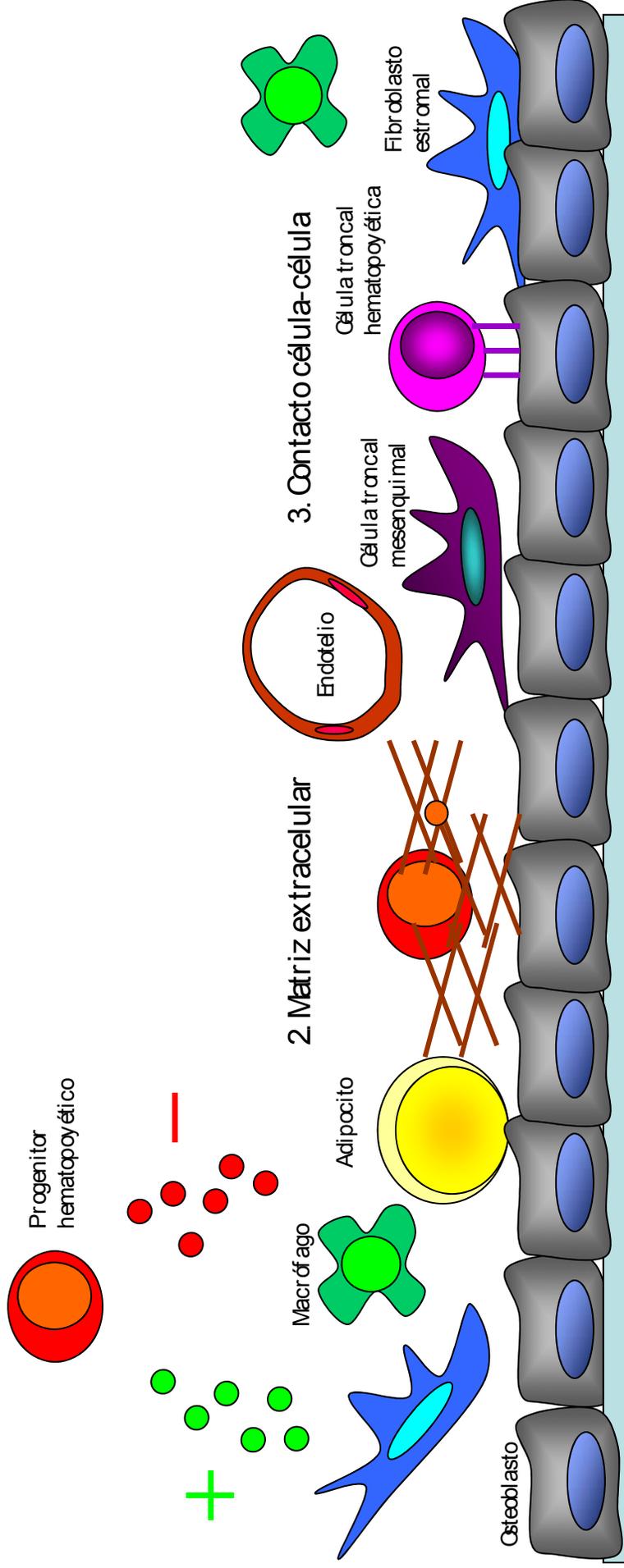
Debido a las altas exigencias de la hematopoyesis, este proceso toma lugar en órganos específicos en el humano, denominados órganos hematopoyéticos. Existen diferentes órganos hematopoyéticos durante el desarrollo embrionario del

organismo, éstos varían dependiendo de la etapa del mismo, y tienen propiedades distintas. Las primeras CTH aparecen en el saco vitelino y, casi simultáneamente se pueden detectar en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) del embrión. Estos dos sitios son capaces de generar CTH *de novo*. Sin embargo, mientras que el saco vitelino sólo promueve la expansión de estas células y la generación de eritrocitos primitivos, la región AGM puede producir progenitores multilinaje pero no soporta su diferenciación. Por esta razón, las CTH deben migrar al hígado y al bazo fetal, donde existe una actividad hematopoyética elevada antes del nacimiento. En estos órganos ya se lleva a cabo la diferenciación mieloeritroide, sin embargo, en cuanto a células linfoides, sólo se pueden generar aquellas pertenecientes al linaje B (McGrath y Palis, 2005). Ya en las últimas etapas del desarrollo fetal y durante la etapa postnatal, más del 90% de la actividad hematopoyética se lleva a cabo en la médula ósea, en la cavidad de los huesos largos y planos del cuerpo y es sólo aquí donde ocurre la hematopoyesis definitiva y la diferenciación a los tres linajes sanguíneos: eritroide, mieloide y linfoide, incluyendo el linaje T (Morrison et al, 1995).

Todos los procesos descritos se pueden dar gracias a que los diferentes órganos cuentan con un microambiente adecuado para los requerimientos específicos de cada etapa y a este microambiente se le ha denominado microambiente hematopoyético (MH). Éste se define como una red de diferentes tipos celulares y sus productos los cuales, en conjunto, ayudan a la regulación de la hematopoyesis de diferentes maneras (Esquema 2).

Las células que forman parte del MH se les denomina genéricamente como células estromales o estroma, que constituyen una población celular capaz de mantener y regular el proceso de hematopoyesis. El estroma tiene un origen heterogéneo y lo conforman distintos tipos celulares, que incluyen a los tres componentes de la médula ósea: macrófagos y osteoclastos (componente hematopoyético); adipocitos, osteoblastos y fibroblastos estromales (componente mesenquimal); y células endoteliales (componente vascular).

1 Factores solubles



Esquema 2. Representación de los diferentes tipos celulares que integran el microambiente hematopoyético y los mecanismos de regulación de la hematopoyesis. (+) moléculas estimuladoras; (-) moléculas inhibidoras. Modificado de Mayani et al, 2007

Las células estromales producen y secretan diversas moléculas que permiten la regulación de la hematopoyesis, dentro de las cuales se encuentran algunas citocinas, quimiocinas y moléculas de matriz extracelular y adhesión celular.

Las citocinas son glicoproteínas solubles que se unen a receptores transmembranales en sus células blanco e inducen la activación de diferentes vías de transducción. Dependiendo del tipo de citocina y el tipo de célula en el que actúa se pueden promover diferentes respuestas celulares como sobrevivencia, proliferación, diferenciación, compromiso, maduración, activación funcional e incluso la muerte celular. Algunos ejemplos de citocinas importantes para la hematopoyesis son algunas interleucinas (IL) como IL-1, IL-3, IL-6, IL-11; factores estimulantes de colonias (CSF), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), entre otras (Charbord, 2001; Metcalf, 2008).

Por otro lado, las células del MH también producen quimiocinas, que son polipéptidos de 70 a 100 aminoácidos de largo y que contienen cuatro residuos de cisteína. Son llamadas así porque son citocinas quimiotácticas. Originalmente, eran consideradas como mediadores inducibles de la inflamación, pero tiempo después, se encontró que los receptores de algunas quimiocinas se expresan constitutivamente en leucocitos y que están involucradas en el tráfico de células hematopoyéticas tanto maduras como CTH y CPH (Campbell y Butcher, 2000).

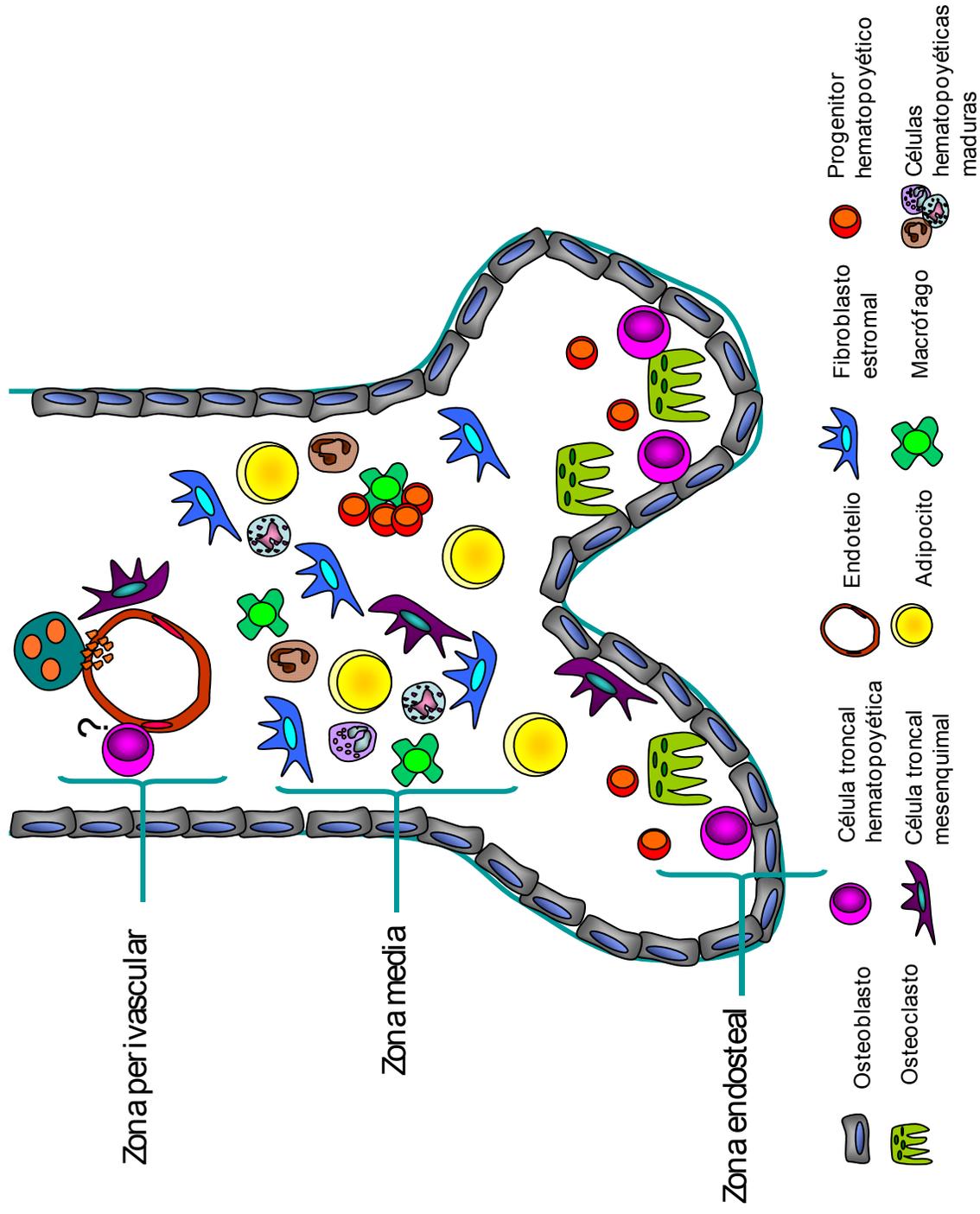
Además, las células del MH son las responsables de la producción y deposición de matriz extracelular formando una red compleja compuesta principalmente por fibronectina, laminina, colágena, hemonectina, trombospondina y proteoglicanos. Estas moléculas, además de servir de sostén para las células residentes en la médula ósea, también juegan un papel importante en la señalización. Esto se debe a que algunas interactúan con sus receptores presentes en las células hematopoyéticas y activan vías de transducción de señales. Así mismo, pueden unir algunas citocinas o factores de crecimiento, favoreciendo su interacción con sus respectivos receptores o permitiendo que ésta sea de mayor duración (Konopleva y Andreeff, 2007).

Finalmente, tanto las células del MH como las células hematopoyéticas son capaces de expresar diferentes tipos de moléculas o receptores de adhesión, las cuales les permiten establecer interacciones intercelulares y con la matriz extracelular. Además de ayudar a la retención de CTH y CPH, la activación de estas proteínas juega un papel muy importante en la regulación de hematopoyesis ya que este tipo de interacciones pueden servir como señales de proliferación y/o supervivencia. De acuerdo a su estructura y función, las moléculas de adhesión pueden clasificarse en varios tipos, como integrinas, cadherinas, selectinas, proteínas tipo mucina, y miembros de la familia de inmunoglobulinas. En particular, las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ establecen interacciones entre las células y componentes de la matriz extracelular como fibronectina, colágena, laminina y trombospondina o con moléculas membranales como la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular (ICAM). Todas estas proteínas involucradas en la adhesión se expresan tanto en las células del MH como en las hematopoyéticas, lo que resulta en una interacción y regulación estrecha entre éstas (Prosper y Verfaillie, 2001).

2.1 Distribución del microambiente hematopoyético

El MH se ha dividido espacial y funcionalmente en tres principales zonas: la zona endosteal, una zona media y la zona perivascular (Esquema 3). Esta disposición facilita que exista una compartimentalización de factores ambientales e interacciones celulares específicas para los diferentes linajes, separando anatómicamente los procesos de diferenciación, maduración y migración de las distintas células hematopoyéticas (Dazzi et al, 2006).

Primero, tenemos la zona endosteal, la cual se encuentra conformada principalmente por osteoblastos y, en menor proporción, por osteoclastos. La zona media ocupa la mayor parte de la cavidad ósea y está constituida por macrófagos, fibroblastos estromales, CTM y adipocitos. Finalmente, tenemos la zona perivascular que comprende los sitios cercanos a los sinusoides sanguíneos cuyo principal componente celular es el endotelio vascular (Dazzi et al, 2006).



Esquema 3. Representación de las zonas del microambiente de la médula ósea en humano. El signo de interrogación en la zona perivascular indica que el nicho endotelial se ha estudiado en ratón , pero no ha sido demostrado su existencia en humano . Modificado de Dazzi et al, 2006.

2.1.1 Zona endosteal

La zona endosteal se encuentra en la cara interna del hueso y está recubierta por osteoblastos capaces de sintetizar matriz mineralizada para la formación ósea. El endosteo también se caracteriza por la presencia de osteoclastos encargados de la reabsorción ósea. Ambas poblaciones celulares juegan un papel muy importante tanto en la remodelación del hueso como en la regulación de las CTH.

Esta zona ha llamado la atención ya que se ha observado que es en esta región donde residen las CTH, por lo que se le ha denominado “nicho hematopoyético”. Dicho término se refiere a una zona específica dentro del microambiente medular encargada de proveer las condiciones necesarias para el mantenimiento de las CTH. El nicho está conformado por células especializadas y estructuras extracelulares que regulan la autorenovación y diferenciación de éstas células primitivas. Por su localización, se ha denominado a esta zona como nicho endosteal (Haylock et al, 2007).

2.1.1.1 Osteoblastos

La principal función de los osteoblastos es la formación de hueso mediante la síntesis de matriz extracelular mineralizada, generando así la estructura de soporte del organismo. Sin embargo, desde hace tiempo se ha visto que las CTH y la hematopoyesis se encuentran en relación estrecha con el hueso. Haylock y colaboradores observaron que en un modelo murino, las CTH en mayor proximidad al endosteo del hueso tienen casi dos veces más potencial proliferativo, así como mayor capacidad de llegar a la médula ósea después de ser infundidas y de reconstituir la hematopoyesis a largo plazo en ensayos de trasplante (Haylock et al, 2007).

Los osteoblastos producen una gran variedad de citocinas que influyen en la hematopoyesis como el G-CSF, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), GM-CSF, IL-1 e IL-6, así como LIF, el factor de necrosis tumoral (TNF) α y

β , VEGF, y TGF- β . La producción de algunas de estas citocinas es basal, y puede ser regulada positivamente por IL-1, TNF α y lipopolisacárido (LPS; Taichman y Emerson, 1998).

Además, los osteoblastos tienen la capacidad de mantener la proliferación de células CD34⁺ en sistemas de cocultivo y estimular preferencialmente a los progenitores de colonias de granulocitos, gracias a la secreción de grandes cantidades de G-CSF (Taichman y Emerson, 1994).

Estudios recientes han mostrado cómo los osteoblastos presentes en el endosteo participan en el mantenimiento de las CTH al expresar factores importantes para la autorrenovación y la quiescencia de las células, lo cual les permite conformar el nicho endosteal. Se ha observado que los osteoblastos expresan en su superficie N-cadherina y de esta forma establecen interacciones homotípicas con las CTH y mantienen su quiescencia. También expresan el ligando de Notch, Jagged-1, y la proteína Ang-1 y a través de estas moléculas, los osteoblastos regulan la activación y quiescencia de las CTH presentes en el nicho (Calvi et al, 2003; Zhang et al 2003; Arai et al, 2004).

Otro grupo de moléculas producidas por los osteoblastos y que son capaces de generar señales de sobrevivencia e inducir un estado quiescente en las CTH son la osteopontina (OPN), la fibronectina y VCAM-1 (Schiozawa et al, 2008).

En particular, se ha observado que la OPN es uno de los reguladores negativos del nicho hematopoyético. Esta molécula es una glicoproteína de matriz extracelular y algunos de sus ligandos como CD44, la integrina α -4 y la integrina β -1 se expresan en las CTH. En ausencia de OPN hay un aumento en el número de CTH, el cual es acompañado por un aumento en la expresión de Jagged-1 y Ang-1 en estas células y por una disminución en la apoptosis de las mismas (Stier et al, 2005). En cambio, la OPN de forma exógena, suprime la proliferación de células hematopoyéticas primitivas *in vitro* (Nilsson et al, 2005). Estos resultados sugieren un papel importante de la OPN en la regulación del número de CTH en forma negativa.

Por último, aunque lo más estudiado hasta el momento es cómo los osteoblastos regulan la hematopoyesis y el nicho de las CTH, recientemente, se observó que las CTH pueden influir en la formación del nicho. El grupo de Taichman observó que al co-cultivar células estromales de médula ósea con células troncales hematopoyéticas obtenidas de ratones que estuvieron bajo algún estrés hematopoyético (sangrado agudo o administración de 5-fluoro-uracilo), el número de progenitores óseos capaces de producir matriz mineralizada aumentaba (Jung et al, 2008). Esto sugiere que las CTH pueden influir en el MH al regular la inducción de células estromales hacia osteoblastos.

Con estas evidencias, se puede decir que existe una interacción recíproca entre las células hematopoyéticas y los osteoblastos del endosteo para mantener la homeostasis del sistema y servir como nicho para las CTH.

2.1.1.2 Osteoclastos

El osteoclasto es una célula de origen hematopoyético que se produce a partir de un progenitor macrófago/monocítico. Posteriormente, se diferencian a osteoclastos mononucleares que se adhieren fuertemente al hueso y se fusionan para formar osteoclastos multinucleares. Estos finalmente se organizan en estructuras especializadas encargadas de la reabsorción ósea, es decir la degradación y digestión de matriz mineralizada promoviendo la remodelación del hueso. Los osteoclastos expresan la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y el receptor de calcitonina, moléculas que han sido utilizadas para su identificación (Miyamoto y Suda, 2003). Hasta hace poco, se creía que a diferencia de los osteoblastos, los osteoclastos no estaban involucrados en la regulación de la hematopoyesis y las CTH. Sin embargo, Kollet y colaboradores (2006), encontraron que podrían tener un papel en la movilización de las CTH de la médula ósea hacia la circulación. En este trabajo, se observó que la movilización inducida por estrés (sangrado o administración de LPS) está acompañada de un aumento en el número de osteoclastos. Además, la presencia del ligando de unión al receptor activado de NFκB (RANKL), molécula indispensable en la generación

de osteoclastos, promueve la salida de CTH al torrente sanguíneo y la reabsorción ósea (Kollet et al, 2006). De manera interesante, RANKL es producido por los osteoblastos por lo que se considera una molécula clave en la interacción entre osteoblastos y osteoclastos para la regulación del metabolismo óseo y ahora también, de las CTH al tener la capacidad de alterar su nicho.

2.1.2 Zona media

La zona media ocupa la mayor proporción de la cavidad ósea y abarca el espacio entre los sinusoides sanguíneos y el endosteo. El estroma en esta zona está conformado principalmente por macrófagos, fibroblastos estromales, CTM y adipocitos. Además, aquí se encuentra la mayoría de células hematopoyéticas en diferentes estadios de diferenciación (Mayani et al, 1992).

2.1.2.1 Macrófagos

Los macrófagos son el segundo tipo celular más abundante en el estroma medular y, junto con los osteoclastos, forma parte de la población estromal derivada del componente hematopoyético de la médula ósea, por lo que son CD45⁺ (Charbord, 2001). *In vitro*, los macrófagos pueden ser más del 40% de las células totales en cultivos a largo plazo, lo cual se mantiene a través de pasajes seriales, y si esta proporción es incrementada experimentalmente, se ve asociado a una disminución en el número de progenitores hematopoyéticos (Awaya et al, 2002).

Los macrófagos se encuentran topográficamente distribuidos y clasificados en tres tipos. Por un lado, tenemos a los macrófagos centrales que forman parte de las islas eritroblásticas y están muy involucrados en la regulación de la producción de células rojas (Mayani et al, 1992). Se ha observado que cuando se induce un estado hipóxico, en el cual se genera un incremento en los eritrocitos, también se observa un incremento en los macrófagos centrales, lo que sugiere que son de vital importancia en la regulación de este tipo celular. Por otro lado,

también se pueden observar macrófagos asociados a los sinusoides medulares, cuyas extensiones citoplasmáticas penetran las uniones endoteliales para fagocitar y eliminar eritrocitos senescentes o defectuosos presentes en la circulación. Por último, también hay macrófagos distribuidos de forma dispersa en la médula ósea entre las células hematopoyéticas en desarrollo (Mayani et al, 1992).

Hay algunos trabajos que resaltan la capacidad que tienen los macrófagos para secretar citocinas que intervienen en la regulación de la hematopoyesis. Se ha reportado que los macrófagos son capaces de producir citocinas inhibitorias de la hematopoyesis como TGF- β , TNF- α , interferón- γ (IFN- γ), la proteína inflamatoria de macrófagos 2 (MIP-2) y linfotoxina β 4 (LT- β 4) y que medio condicionado de cultivos de macrófagos disminuye significativamente el número de colonias de granulocitos y monocitos en cultivos en metil-celulosa (Cheng et al, 2003). Los macrófagos también pueden inhibir al linaje megacariocítico a través de la producción del péptido Nap-2, que es la forma corta de la quimiocina CXCL7. La secreción de este péptido se ve incrementada cuando los macrófagos son cocultivados con células estromales *in vitro* (Pillai et al, 2006).

A pesar de que la mayoría de la regulación hematopoyética que se le atribuye a los macrófagos es inhibitoria, también se ha observado que pueden contribuir a la hematopoyesis de forma positiva cuando son activados por diferentes estímulos. Se sabe que los macrófagos juegan un papel primordial en la respuesta inmune y que una de las formas principales e importantes de activación de éstos es un proceso infeccioso. Una infección induce cambios en la hematopoyesis para poder montar una respuesta inmunológica efectiva y se ha observado que los macrófagos podrían estar involucrados en la promoción de estos cambios. Cotterell et al, en el 2000, reportaron que la infección parasitaria con *Leishmania donovani* afecta la fisiología de los macrófagos. *In vivo*, *L. donovani* tiene como blanco a los macrófagos estromales y se ha visto que esta infección aumenta su capacidad para soportar la mielopoyesis *in vitro*, a través de la inducción de GM-CSF y TNF- α (Cotterell et al, 2000). En presencia de la

quimiocina CCL18, producida por monocitos y eosinófilos, los macrófagos incrementan los niveles de IL-6, IL-15 y SCF en el medio y éstas a su vez intervienen directamente con el aumento en la formación de colonias en cultivos a largo plazo (Wimmer et al, 2006). También se ha demostrado que los macrófagos expresan Jagged-1 y que esta expresión aumenta en respuesta a citocinas como M-CSF, GM-CSF e IL-3. Esta observación sugiere que los macrófagos pueden regular la decisión del destino celular en CTH mediante la activación de Notch, lo cual no había sido considerado con anterioridad (Nomaguchi et al, 2001).

Finalmente, los macrófagos no sólo influyen en las poblaciones hematopoyéticas, sino que también interactúan estrechamente con otros componentes del estroma medular. Los macrófagos pueden producir el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- β , moléculas importantes para la proliferación de fibroblastos, los cuales forman parte del microambiente hematopoyético (Shimokado et al, 1985; Rameshwar et al, 1994). De forma recíproca, los fibroblastos también pueden provocar cambios en los macrófagos. Se ha observado que los fibroblastos estromales al ser cocultivados con macrófagos, pueden inducir en estos últimos la secreción de OPN, la cual forma parte importante en el nicho de las células troncales hematopoyéticas. De forma particular, se encontró que la OPN producida por los macrófagos disminuye la expresión de Notch-1 en células CD34⁺, la cual interviene en la autorenovación de estas células (Iwata et al, 2004; Stier et al, 2005)

Por todos estos resultados, se puede decir que los macrófagos establecen interacciones y redes de regulación tanto con las células de linaje sanguíneo, como estromal de la médula ósea, lo que permite contender con las demandas del organismo.

2.1.2.2 Fibroblastos estromales y células troncales mesenquimales

Una parte importante del microambiente hematopoyético está constituido por fibroblastos estromales. Estas células son CD45⁻ y presentan marcadores de músculo liso vascular como la actina alfa de músculo liso y la metavinculina,

además de expresar fosfatasa alcalina (Charbord, 2001). Las células de linaje fibroblástico y las CTM comparten muchos marcadores y características lo cual ha hecho que en algunas ocasiones sean considerados como el mismo tipo celular (Bianco et al, 2008; Haniffa et al, 2009).

Los fibroblastos estromales pueden secretar una gran cantidad de moléculas de matriz extracelular contribuyendo de manera importante al soporte, adhesión y señalización dentro de la médula ósea. Entre éstas, tenemos a varias glicoproteínas de matriz, fibronectina, laminina $\beta 1$, $\gamma 1$ y $\beta 2$, colágena I, III y IV, trombospondina I, tenascina y tropoelastina, y glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico, condroitin sulfato 4 y 6, dermatan sulfato y heparan sulfato (Charbord, 2001).

Además, estas células sintetizan y secretan citocinas como IL-1, 6, 7, 8 y 11, así como M-CSF, G-CSF, GM-CSF, SCF e IFN- β . Sin embargo, los fibroblastos también producen citocinas inhibitorias como MIP-1 α , MIP-2, IFN- γ y TNF- α , aunque en menores cantidades que las citocinas estimuladoras (Cheng et al, 2003).

La capacidad que tienen los fibroblastos para sintetizar todas estas moléculas, citocinas, quimiocinas y matriz extracelular, les permite contribuir a la formación de un microambiente adecuado para la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células hematopoyéticas.

En sistemas *in vitro*, se ha demostrado que los fibroblastos son capaces de mantener la hematopoyesis. Capas purificadas de fibroblastos estromales permiten el crecimiento de células CD34⁺ y soportan tanto la mielopoyesis como la linfopoyesis B (Moreau et al, 1993). También se ha encontrado que los fibroblastos pueden mantener progenitores hematopoyéticos más inmaduros CD34⁺CD38⁻ y promover su maduración hacia monocitos, macrófagos, linfocitos B, megacariocitos y eritroblastos (Li et al, 1997). Además, se ha reportado que cuando se expone a las CTM CD34⁺CD38⁻ a diferentes citocinas para inducir su diferenciación y se cocultivan con fibroblastos murinos se puede retardar la pérdida de actividad de LTC-IC. Esto sugiere que los fibroblastos contribuyen al

mantenimiento de células hematopoyéticas muy inmaduras (Bennaceur-Griscelli et al, 2001).

En cuanto a las CTM, se ha observado que son capaces de responder ante cambios en la médula ósea y/o señales producidas por las células hematopoyéticas, lo que permite una comunicación recíproca para regular los procesos de forma adecuada. Esto sucede gracias a que las CTM expresan diferentes receptores de factores de crecimiento como los receptores de IL-1, IL-3 α , IL-4, IL-6, e IL-7; el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R), el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad α (LNGFR- α), el receptor de TGF- β 1, los receptores I y II de TNF, de IFN- γ y de transferrina (Pittenger et al, 1999). Además expresan diferentes moléculas de adhesión, entre ellas ICAM 1 y 2, VCAM-1, L-selectina, el antígeno asociado a función de linfocitos (LFA) 3, la molécula de adhesión celular de leucocitos activados (ALCAM), diferentes integrinas como la integrina α 5, α 4, β 1 y α V β 3, lo cual les permite establecer contactos célula-célula o con la matriz extracelular (Docheva et al, 2007; Dottschling et al, 2007). Además, las CTM secretan algunas moléculas de matriz extracelular como hialuronato, colágena I y VI y fibronectina (Pittenger et al, 1999; Minguell et al, 1999). Estas células también secretan citocinas como SCF, Flt-3, GM-CSF, G-CSF, entre otras, que les permite mantener la hematopoyesis en sistemas de co-cultivo (Dazzi et al, 2006; Wagner et al, 2007)

Estas propiedades observadas *in vitro* han sido probadas en modelos *in vivo*. Se ha demostrado que el trasplante conjunto de células hematopoyéticas con CTM, tanto alogénicas como autólogas en un modelo de xenotrasplante en oveja fetal, resulta en un incremento en el injerto a largo plazo, así como en un mayor número de células circulantes del donador durante la gestación y después del nacimiento (Almeida-Porada et al, 2000).

De forma interesante, se ha visto que las CTM además de mantener y regular la hematopoyesis también son capaces de intervenir en otros procesos como la regulación inmunológica. McIntosh y colaboradores encontraron que las

CTM en cultivos mixtos de linfocitos suprimen la proliferación de estos últimos (McIntosh y Bartholomew, 2000). Esto ha sugerido el uso de CTM para tratar la enfermedad de injerto contra hospedero, la cual es mediada principalmente por la activación de linfocitos del donador y el ataque de las células del hospedero (Jones y McTaggart, 2008).

Con las evidencias anteriores vemos cómo tanto los fibroblastos como las CTM comparten muchas características, lo cual ha llevado a la controversia de su identidad (Bianco et al, 2008). Además también se observa que estos tipos celulares están involucrados tanto en eventos tempranos de la hematopoyesis como en etapas en las que las células ya son maduras y pueden regular su funcionalidad.

2.1.2.3 Adipocitos

Los adipocitos constituyen el componente más abundante del estroma medular en el adulto, su papel en la hematopoyesis no ha sido determinado con precisión y se han propuesto algunas hipótesis al respecto. Al principio, se creía que los adipocitos sólo tenían un papel pasivo al ocupar el espacio que ya no era requerido para la hematopoyesis. Después, se propuso que los adipocitos estromales participan en el metabolismo lipídico, almacenando los triglicéridos circulantes (Gimble et al, 1996). También pueden funcionar como un reservorio de energía localizada en caso de situaciones de emergencia que afectan la hematopoyesis o la osteogénesis, como hemorragias o fracturas, respectivamente. Finalmente, se empezó a explorar la posibilidad de que los adipocitos intervinieran directamente en la regulación de la hematopoyesis a través de la secreción de citocinas y otras moléculas (Gimble et al, 1996).

Se sabe que la cantidad de adipocitos presentes en la médula ósea cambia con la edad y ante diferentes tipos de estrés. Por un lado, en modelos de envejecimiento acelerado en ratón, se ha visto que la osteogénesis disminuye, lo que correlaciona con un aumento en la capacidad de mantener la mielopoyesis y con un incremento en el número de adipocitos. Algunas observaciones clínicas

indican que este fenómeno puede extrapolarse al humano. En bebés recién nacidos, la médula contiene pocos adipocitos y se caracteriza por ser eritropoyética (médula roja). Conforme avanza la edad, el número y tamaño de los adipocitos aumenta en forma lineal hasta que eventualmente, la grasa (médula amarilla) ocupa el 50% de la cavidad medular (Gimble et al, 1996). También hay condiciones patológicas o de estrés que pueden alterar la adipogénesis. En animales anémicos o con fracturas óseas, se observa que la eritropoyesis aumenta, mientras los adipocitos disminuyen. Sin embargo, poco se sabe acerca de la regulación de estos fenómenos (Gimble et al, 1996).

In vitro, se ha observado la presencia de adipocitos en cultivos a largo plazo y se ha demostrado que los preadipocitos son capaces de mantener la linfopoyesis y la granulopoyesis (Gimble et al, 1990; 1992).

En particular, los adipocitos secretan un grupo de moléculas que han sido denominadas como adipocinas y algunas de ellas tienen diversos efectos en la hematopoyesis como la adiponectina, las prostaglandinas y la leptina (Bennett et al, 1996; Umemoto et al, 1997; Yocota et al, 2003; DiMascio et al, 2007).

Recientemente, se ha identificado a la adiponectina como una molécula importante para las CTH. Por un lado, se demostró que los receptores para esta molécula, AdipoR1 y AdipoR2, se expresan en CTH y a nivel funcional, la adiponectina es capaz de aumentar la proliferación de estas células y al mismo tiempo retenerlas en un estado inmaduro manteniendo así su capacidad de repoblación a largo plazo (DiMascio et al, 2007). Sin embargo, también se ha reportado que la adiponectina puede tener efectos inhibitorios en células más comprometidas. La adición de adiponectina en cultivos a largo plazo inhibe la linfopoyesis B mediante la inducción de prostaglandinas en el microambiente, lo que promueve la apoptosis de linfocitos. Al mismo tiempo, la adiponectina en estos cultivos aumenta ligeramente la mielopoyesis (Yocota et al, 2003).

La leptina, por su parte, identificada inicialmente como un regulador primordial del peso corporal y el balance energético, también se ha visto involucrada en la regulación hematopoyética. La leptina puede incrementar la

proliferación de progenitores multipotentes, ya que aumenta la mielopoyesis, eritropoyesis y linfopoyesis al mismo tiempo (Bennett et al, 1996; Umemoto et al, 1997). Sin embargo, parece ser de mayor importancia para la linfopoyesis, ya que en ratones donde el receptor está truncado, la linfopoyesis se ve comprometida de forma significativa (Bennett et al, 1996).

A pesar de que las funciones de los adipocitos en la médula ósea no eran tan conocidas en el pasado, con el tiempo se han ido explorando con mayor detalle, lo que ha permitido establecer su importancia en el microambiente medular.

2.1.3 Zona perivascular

En la médula ósea adulta, las células endoteliales forman parte de la zona perivascular, en donde son un componente de los sinusoides medulares. Esta región perivascular es indispensable ya que regula el tráfico de células hematopoyéticas, la megacariopoyesis y la eritropoyesis (Rafii, 2001)

2.1.3.1 Células endoteliales

La microvasculatura de la médula ósea y capas de células endoteliales *in vitro*, expresan el factor von Willebrand (vWF), el antígeno CD34, la molécula de adhesión de plaquetas-endotelio (PECAM), trombospondina, y E-selectina, así como bajos niveles de ICAM-1, VCAM-1 y CD106.

Las células endoteliales regulan la hematopoyesis a través de varios mecanismos que incluyen, la secreción de citocinas como IL-6, IL-11, IL-5, TGF- β , SCF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF y LIF, así como la secreción de moléculas de la matriz extracelular como la fibronectina (Rafii, 2001). Aunado a la secreción de citocinas, es necesario el contacto directo entre las células endoteliales de médula ósea y las células hematopoyéticas primitivas (Rafii et al, 1994).

Además, en esta zona se encuentran las células reticulares adventiciales que están localizadas alrededor de los sinusoides venosos envolviendo parcialmente al endotelio. Esta interacción tan estrecha con el endotelio les permite participar en la

regulación de la migración de células hematopoyéticas maduras de la médula ósea hacia la circulación (Mayani et al, 1992)

Recientemente, las células endoteliales en la médula ósea han llamado la atención de diversos grupos, ya que en ratón, se han identificado como parte de otro nicho, denominado nicho vascular, el cual tiene funciones distintas al nicho endosteal. Mientras el nicho endosteal permite el mantenimiento de las CTH en quiescencia y la regulación de la autorenovación, el nicho vascular promueve la proliferación y diferenciación de las CTH (Kopp et al, 2005). Este modelo propone que este nicho provee de un microambiente más rico en nutrientes y con concentraciones mayores de oxígeno y factores de crecimiento necesarios para que las células maduren y sean finalmente liberadas a la circulación. Sin embargo, esta función como nicho vascular no ha sido corroborada en humanos.

2.2 Homeostasis ósea, el microambiente y la hematopoyesis

Como ya se mencionó, la hematopoyesis se lleva a cabo en el interior de los huesos largos y planos del cuerpo humano. Esto hace que el proceso hematopoyético se encuentre bajo la influencia de cambios en la homeostasis ósea.

En la literatura podemos encontrar diversos trabajos que han contribuido a establecer la relación entre los osteoblastos y las CTH. Calvi et al, en el 2003, demostraron que la frecuencia de CTH aumenta en la médula ósea cuando se promueve la formación de tejido óseo mediante la activación constitutiva o sobreexpresión del receptor de la hormona paratiroidea en los osteoblastos, o cuando la hormona es administrada a ratones irradiados. Esto sugiere que los osteoblastos son capaces de regular la frecuencia de CTH en la médula ósea. Además, se observó que estos osteoblastos producen mayores niveles de IL-6, SCF y SDF-1, lo cual puede contribuir al efecto observado. Sin embargo, también observaron que se requiere de contacto celular para aumentar el número de CTH, por lo que participan factores no difusibles como el ligando de Notch (Jagged-1) (Calvi et al, 2003). En ese mismo año, otro trabajo mostró que la inactivación

condicional de receptor de la proteína morfogenética de hueso tipo 1 A (BMPR-1a) promueve un aumento en el número de osteoblastos N-cadherina⁺, y el porcentaje de hueso trabecular y, esto correlaciona con una mayor frecuencia de CTH, demostrando una vez más, que el hueso puede regular el número de CTH. También se encontró que los osteoblastos N-cadherina⁺ están en la superficie del hueso trabecular y que colocalizan con CTH que también expresan esta proteína, funcionando así como parte del nicho (Zhang et al, 2003; Haylock et al, 2007). Finalmente, la delección de osteoblastos en roedores mediante la expresión condicional de la cinasa de timidina del virus de herpes bajo el promotor de colágena 1 α , se ha correlacionado con alteraciones en la hematopoyesis así como en el número de CTH (Viznjic et al, 2004).

Además de la importancia de los cambios en la homeostasis ósea, también se ha visto que otras alteraciones en el microambiente hematopoyético pueden afectar la hematopoyesis. Por ejemplo, Walkley et al, han demostrado, en modelos murinos, que cuando el microambiente medular carece de la expresión de la proteína del retinoblastoma (Rb) o del receptor gamma del ácido retinóico (RAR- γ) se observa un incremento en la proliferación de CTH y CPH acompañado de una movilización de las mismas hacia sitios extramedulares, produciendo así un fenotipo de mieloproliferación (Walkley et al, 2007). En estos trabajos, se demostró que estas proteínas son capaces de funcionar como reguladores extrínsecos de la hematopoyesis, es decir, que son importantes en la regulación de la misma a través del microambiente hematopoyético. Esto sugiere que el estroma puede contribuir a cambios en la hematopoyesis, influyendo así, en la promoción o progresión de enfermedades mieloproliferativas.

3. Leucemia granulocítica crónica

La leucemia granulocítica crónica (LGC) se define como una enfermedad clonal, que se origina en las CTH y que se caracteriza por un incremento en la proliferación de células hematopoyéticas de linaje mieloide (Jorgensen y Holyoake, 2001).

La incidencia de la LGC en el mundo es de aproximadamente de 1 a 2 casos por cada 100,000 individuos, siendo diagnosticados entre 3500 y 5000 nuevos casos por año en Estados Unidos, lo que provoca que este padecimiento ocupe del 15 al 20% de todas las leucemias presentes en adultos (Deininger y Druker, 2003). En lo referente a la República Mexicana, se ha calculado que existen alrededor de 80,000 casos de leucemia, de los cuales el 10% corresponde a LGC (Góngora-Bianchi et al, 2005).

En la gran mayoría de los pacientes, no se ha identificado un agente etiológico, sin embargo se ha vinculado con la exposición a radiación ionizante. El tipo de leucemia más común después de una exposición de este tipo es la leucemia mieloide aguda, pero la LGC también se ha relacionado con este factor, sobretodo en estudios posteriores a las explosiones de la bomba atómica en Japón en 1945 (Kufe et al, 2003)

3.1 Características clínicas y hematológicas

La edad promedio de diagnóstico de la enfermedad es 50 años y el pico máximo de incidencia se encuentra en la siguiente década. No existe predisposición genética, ni geográfica para este padecimiento y tampoco se ha relacionado con el género. Los síntomas típicos de la LGC incluyen fatiga, anemia, esplenomegalia progresiva y leucocitosis.

Clínicamente, la LGC se desarrolla en tres fases. La primera es una fase crónica donde hay una gran expansión de las células mieloides, las cuales mantienen su capacidad de diferenciación y sus funciones no están alteradas. Durante este periodo, la mayoría de los pacientes son asintomáticos. Esta fase progresa a una fase acelerada después de unos años y en esta etapa hay mayor número de células hematopoyéticas inmaduras en sangre periférica, los síntomas aumentan y disminuye la respuesta a la terapia. Finalmente, aunque la duración de la fase acelerada es muy variable, la enfermedad progresa a una crisis blástica donde las células inmaduras predominan. En esta fase la sobrevida de los

pacientes se reduce a meses e incluso semanas (Epstein, 1999; Lee, 2000; Kufe et al, 2003).

3.2 Biología de la leucemia granulocítica crónica

3.2.1 El cromosoma Filadelfia (Ph)

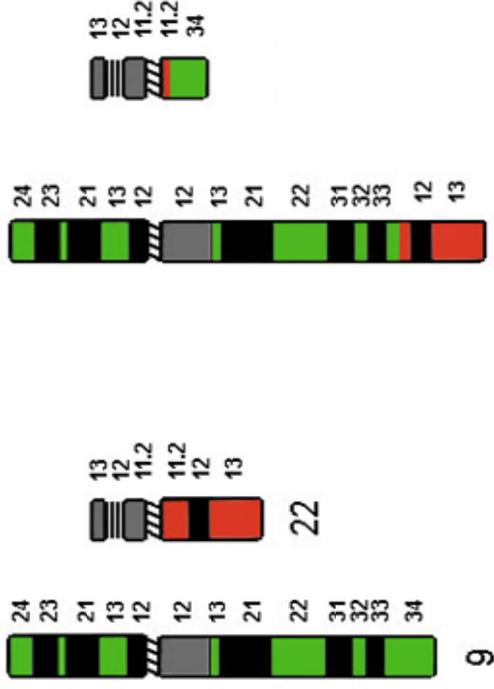
La leucemia granulocítica crónica es el único padecimiento hematológico directamente asociado a la presencia de una anomalía cromosómica, el cromosoma Ph, el cual se encuentra en el 95% de los pacientes. El 5% restante presentan aberraciones cromosómicas que no pueden ser detectadas por análisis citogenéticos rutinarios, o tienen alteraciones complejas que involucran la participación de más de dos cromosomas (Cross y Reiter, 2002).

Desde el punto de vista molecular, el cromosoma Ph es un cromosoma 22 acortado, que resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)] (Esquema 4A). Esto permite la fusión entre segmentos 3' del gen *ABL* (ubicado en el cromosoma 9q34) y segmentos 5' del gen *BCR* (ubicado en el cromosoma 22q11), produciendo un gen *BCR-ABL* que, finalmente, genera una proteína quimérica BCR-ABL con funciones aberrantes (Epstein, 1999).

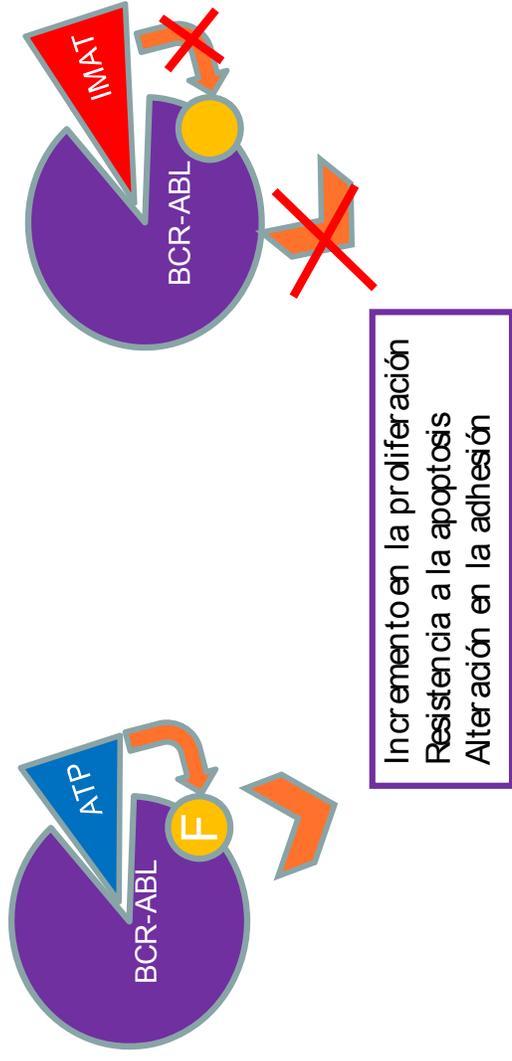
El gen *ABL* normal humano, es el homólogo al oncogen *v-abl* presente en el virus de la leucemia murina de Abelson, y codifica a una proteína citosólica con actividad de cinasa de tirosina. Las funciones celulares de ABL han sido asociadas con apoptosis en respuesta a radiación ionizante y a inductores de daño al ADN. Esto lo hace a través de la activación de señales proapoptóticas inducidas por p73 (una proteína análoga a p53), lo cual ha permitido ubicar a ABL como una molécula reguladora del ciclo celular en respuesta a daño y estrés genotóxico (Wang, 2000).

Por su parte, el gen *BCR* codifica a una proteína ubicua de 160 kDa que posee un dominio amino terminal con actividad de cinasa de serina y treonina. El sustrato identificado hasta el momento es la proteína Bap 1, un miembro de la

A



B



Esquema 4. Cromosoma Filadelfia (Ph) e Imatinib. A, El esquema muestra los cromosomas 9 y 22 normales, así como el segmento del cromosoma 22 adicionado al cromosoma 9 (9q+) y el cromosoma 22 acortado (22q-). B, Representación del modo de acción del Imatinib sobre las funciones de Bcr-Abl. IMAT: Imatinib; F- tirosina fosforilada

familia de proteínas reguladoras del ciclo celular 14-3-3 (Reuther et al, 1994). Además, el dominio central de BCR contiene una región que regula el intercambio de trifosfato de guanosa (GTP) por bifosfato de guanosa (GDP), sirviendo así, como GTPasa para Rac (proteína perteneciente a la superfamilia Ras, que regula la polimerización de actina). Sin embargo, aunque BCR parece estar involucrado en la transducción de señales, su papel biológico específico no ha sido determinado, aunque su participación en leucemias Ph⁺ es clara (Diekmann et al, 1991; Deininger y Druker, 2003).

La proteína ABL silvestre se localiza principalmente en el núcleo, la membrana plasmática y el citoesqueleto, a diferencia de la proteína BCR-ABL la cual se encuentra mayoritariamente soluble en el citoplasma (Wetzler et al, 1993). Esta relocalización le permite tener acceso a otros sustratos y crear nuevas interacciones. Además, BCR-ABL tiene una actividad constitutiva de cinasa de tirosina que resulta de la delección del dominio SH3 de ABL, y tiene como consecuencia la autofosforilación en el residuo de tirosina 177 (Y177) (Pendergast et al, 1993). La expresión ectópica de *BCR-ABL* resulta en una independencia a factores de crecimiento y en la transformación leucémica de líneas celulares hematopoyéticas. Aunado a esto, la expresión transgénica de *BCR-ABL* induce leucemia o enfermedades mieloproliferativas, indicando un papel directo y causal de esta proteína en la LGC (Dash et al, 2002), ya que es capaz de activar numerosas vías de señalización que inducen al fenotipo leucémico. En términos funcionales, BCR-ABL modula potencialmente procesos de adhesión aberrantes, cambios en la señalización intracelular, inhibición de la apoptosis e incremento en la proliferación de células de linaje mieloide.

3.2.2 Adhesión e interacción con proteínas del citoesqueleto.

Uno de los mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación de las CTH es la adhesión al estroma medular, el cual, a través de moléculas de membrana y otras señales mantienen a las células quiescentes y controlan la proliferación.

En la LGC se detectan anomalías en la expresión de selectinas e integrinas, y se ha confirmado que células progenitoras Ph⁺ se unen con menor afinidad al estroma al compararlas con su contraparte normal. También se ha demostrado que las células de LGC presentan una variante de integrina-β1 que no se encuentra en células normales (Marley y Gordon, 2005). Además de lo anterior, se sabe que BCR-ABL es capaz de inducir plegamiento (ruffling) en la membrana, aumentando con ello la movilidad celular, lo que favorece la mayor liberación de células indiferenciadas a la circulación sanguínea (Jorgensen y Holyoake, 2001).

3.2.3 Activación de vías de señalización mitogénicas

El número de vías que puede activar BCR-ABL es extenso ya que sus dominios pueden interactuar con diferentes proteínas adaptadoras involucradas en múltiples cascadas de señalización. Por ejemplo, BCR-ABL puede interactuar con Grb2, Shc, Crkl y Cbl mediando la activación de la vía de Ras, de PI3K y MAPK. Esta activación resulta en un incremento en la proliferación y supervivencia celular (Marley y Gordon, 2005).

3.2.4 Inhibición de la apoptosis

Se ha demostrado que la expresión de BCR-ABL modula la apoptosis de manera negativa y que al ser transfectada en líneas celulares hematopoyéticas les confiere la habilidad para resistir a estímulos apoptóticos como la privación de nutrientes, radiación y agentes citotóxicos (Marley y Gordon, 2005).

Las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x están incrementadas a través de la activación de Ras mediada por BCR-ABL. Además, la activación de la vía PI3K/AKT mencionada anteriormente lleva a la sobreexpresión de NF-κB, que a su vez promueve también el aumento de Bcl-x. Otro elemento involucrado en la inhibición de la apoptosis es la expresión aberrante de Fas/FasL observada en células primarias de LGC (Marley y Gordon, 2005). Todos estos mecanismos

convergen en la resistencia a la apoptosis contribuyendo al aumento en las cuentas mieloides observado en la LGC.

3.3 Tratamientos utilizados en el manejo de la LGC

A lo largo de la historia, han existido y se han desarrollado diferentes opciones terapéuticas para el manejo de la LGC. Entre ellas, tenemos al busulfan, la hidroxiurea, el arabinósido de citosina (AraC), el IFN- α y el trasplante de médula ósea.

A pesar de que la hidroxiurea y AraC han mostrado ser mejores que el busulfan en la prognosis a largo plazo, estos fármacos citotóxicos no inducen remisión citogenética y no previenen la progresión a la fase aguda y crisis blástica de la enfermedad. Sin embargo, debido al bajo costo y relativamente pocos efectos secundarios, la hidroxiurea aún se utiliza para controlar la LGC en fase crónica, sobretodo en pacientes de edad avanzada (Ohno, 2006).

Por otro lado, el IFN- α es capaz de producir una respuesta hematológica en el 80% de los pacientes y una remisión citogenética en el 26% de los mismos, si es empleado durante la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, el IFN- α tiene efectos secundarios como hepatotoxicidad y depresión mental. Además, esta terapia es incapaz de inducir una respuesta molecular completa en la mayoría de los casos y aún en pacientes con respuesta citogenética. Por esto, el IFN- α está indicado para pacientes en fase crónica que no son candidatos a trasplante de médula ósea debido a la edad o a la falta de donador compatible (Ohno, 2006).

Hasta el momento, el único tratamiento capaz de erradicar la enfermedad, es el trasplante alogénico de células hematopoyéticas. La sobrevida libre de enfermedad es del 50 al 80% en la mayoría de los estudios. Sin embargo, el trasplante está limitado a los pacientes que tienen un donador compatible y que están en las condiciones óptimas para ser sometidos al procedimiento, que incluye quimioterapia de dosis altas y radioterapia de cuerpo completo. Alrededor del 60% y el 70% de los pacientes transplantados sobreviven más de 7 años, pero la curva de sobrevida declina gradualmente hasta llegar al 50% en 20 años (Ohno et al,

2006). Esto se debe a que las complicaciones pueden ser muy severas, como el desarrollo de enfermedad de injerto contra hospedero, la cual puede llevar a la muerte del paciente (Deininger y Druker, 2003).

Estas consideraciones han llevado a estudiar otras opciones de tratamiento y se ha intentado generar fármacos más específicos y con menos daños colaterales. Estos fármacos inhiben a la proteína BCR-ABL, cuya actividad lleva al desarrollo de la leucemia, por lo que su inhibición resulta en el control de la enfermedad.

Entre estas moléculas, la primera en surgir fue el STI571 (ahora IMATINIB; Gleevec®, Novartis Pharmaceuticals), el cual es una molécula pequeña, que funciona como un inhibidor de cinasa de tirosina.

Finalmente, otras moléculas de este mismo tipo desarrolladas más recientemente, son el Nilotinib (Novartis Pharmaceuticals) y el Dasatinib (Bristol-Myers-Squibb), los cuales funcionan de forma similar y están indicados en aquellos pacientes que desarrollaron alguna resistencia al Imatinib.

4. Imatinib

4.1 Mecanismo de acción y efectos biológicos

El Imatinib es una 2-fenil amino pirimidina que funciona como un inhibidor competitivo del trifosfato de adenosina (ATP), es decir compite con éste por el sitio de unión presente en BCR-ABL. Esto impide que el grupo fosfato del ATP sea transferido a los sustratos de la cinasa, lo que a su vez bloquea la señalización río abajo y por lo tanto la función de BCR-ABL (Esquema 4B).

Estudios *in vitro* han mostrado que esta molécula es capaz de inhibir el crecimiento de líneas celulares que expresan *BCR-ABL* (Druker et al, 1996). Además, Gambacorti-Passerini et al, en el 2001, demostraron que el Imatinib puede inhibir la proliferación de células mononucleares de LGC, obtenidas tanto en fase crónica como en crisis blástica. Así mismo, es capaz de reducir el número de colonias provenientes de médula ósea y sangre periférica movilizada de pacientes con LGC en fase crónica (Marley et al, 2000), así como de inhibir la

proliferación y el ciclo celular de progenitores primitivos CD34⁺CD38⁻ y células comprometidas CD34⁺CD38⁺ que expresan BCR-ABL (Holtz et al, 2002).

Los estudios clínicos de fase I fueron iniciados en Estados Unidos en 1998 en pacientes que habían sido resistentes a la terapia con IFN- α . Las primeras evaluaciones clínicas mostraron que el 50% de los pacientes con LGC en fase crónica se encontraban en remisión hematológica y en todos los casos se mostraba cierta respuesta citogenética. Aunado a ello, en pacientes con LGC en crisis blástica, se detectó una desaparición del número de blastos en circulación y en infiltrados extramedulares (Goldman, 2000; Sawyers, 2001).

En estudios en fase II con STI571, se ha demostrado que al administrar diariamente 400 mg/kg de peso en pacientes que habían sido refractarios o intolerantes a IFN- α , se presenta una remisión hematológica completa en el 95% de los casos, encontrando respuesta citogenética completa en el 41% de ellos (Clarkson et al, 2003).

Finalmente, los estudios de fase III se iniciaron en el 2000 en pacientes recién diagnosticados con LGC. En estos estudios se comparó la respuesta al tratamiento con Imatinib y con IFN- α más Ara-C, y mostraron que el Imatinib es considerablemente superior con respecto a las tasas de remisión hematológica y citogenética. Además, se observó una diferencia significativa en la progresión hacia fase acelerada o crisis blástica después de 18 meses (Deininger y Druker, 2003).

Basado en todos estos resultados, en Diciembre de 2002, la Administración de Alimentos y Fármacos aprobó el uso del Imatinib como tratamiento de primera línea en pacientes diagnosticados con LGC en Estados Unidos (Deininger y Druker, 2003).

A pesar de su eficiencia en el manejo de la LGC, con el tiempo se ha visto que el Imatinib no es capaz de eliminar por completo a las células leucémicas y que una vez que se interrumpe el tratamiento, los pacientes recaen (Usuki et al, 2005). Esto ha hecho que el uso del Imatinib sea por períodos prolongados de

tiempo para evitar la reaparición de la enfermedad, haciendo importante el estudio de los efectos que pudiera tener el uso del fármaco a largo plazo.

4.2 Inhibición de otras cinasas y su uso clínico en otros padecimientos

Aunque inicialmente el Imatinib fue diseñado para la inhibición específica de BCR-ABL, esta molécula es capaz de alterar la actividad de otras proteínas debido a la similitud que existe entre sus dominios de cinasa. Además de BCR-ABL, el Imatinib puede inhibir la actividad de ABL en forma nativa (Buchdunger et al, 1996), al receptor del SCF (c-Kit), al receptor de PDGF (Buchdunger et al, 2000), al receptor del M-CSF(c-FMS) (Dewar et al, 2005) y la vía de TGF- β (Wang et al, 2005).

De hecho, se ha visto que debido a esta promiscuidad, el Imatinib puede tener algunos efectos secundarios. Bartolovic y colaboradores reportaron que la incubación de células CD34⁺ de individuos normales Ph⁻ resulta en una disminución en la proliferación y en la formación de colonias en forma dosis dependiente y que este efecto es similar a la depleción o inhibición de c-Kit (Bartolovic et al, 2004). Clínicamente, esto se observa en forma de toxicidad hematológica en todos los linajes hematopoyéticos (Kantarjian et al, 2002).

Sin embargo, en algunas circunstancias, esta capacidad para inhibir otras cinasas, ha permitido explorar su uso en otros padecimientos en el que estén involucrados estos receptores.

En estudios *in vivo* y ensayos clínicos se ha utilizado el Imatinib para tratar mielofibrosis y tumores gástricos, donde los principales tipos celulares involucrados son células estromales. Se ha observado, en un modelo murino, que el Imatinib es capaz de disminuir la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, mediante la inhibición de la activación del PDGF-R en los fibroblastos, provocando una disminución en su proliferación (Aono et al, 2005). También se ha reportado que este fármaco es capaz de revertir la mielofibrosis en pacientes con síndrome hipereosinofílico (Klion et al, 2004) y que disminuye la fibrosis medular en pacientes con leucemia mieloide crónica. Esto sucede debido a un decremento en

el número de megacariocitos capaces de secretar TGF- β y PDGF y por la inhibición directa del PDGF-R (Beham-Schmid et al, 2002). Además, el Imatinib ha sido empleado para el tratamiento de tumores estromales gastrointestinales (GIST) ya que éstos se asocian con mutaciones en el receptor c-Kit y el PDGF-R y el tratamiento ha dado resultados dramáticos en el manejo de estos tipos de tumores (Lee et al, 2006; Heinrich et al, 2003).

Además de lo ya mencionado, la inhibición del PDGF-R por el Imatinib, podría ser importante en otros escenarios, por ejemplo, en las CTM y el microambiente de la médula ósea de los pacientes tratados. Esto es de gran relevancia, sobretodo pensando que el uso del fármaco en los pacientes con LGC es continuo y podría tener efectos en estos elementos presentes en la médula ósea.

II. ANTECEDENTES

1. Factores que modifican el microambiente hematopoyético

Como se ha mencionado, las CTM y el microambiente de la médula ósea son de gran importancia para la regulación de la hematopoyesis. Por esta razón, se ha estudiado cómo algunos factores pueden modificar a las CTM y el MH provocando así cambios en la hematopoyesis. Entre algunos de estos factores se encuentran: moléculas solubles como hormonas, citocinas y factores de crecimiento; enfermedades hematológicas como los síndromes mielodisplásicos, el mieloma múltiple, y la leucemia mieloide tanto crónica como aguda; y agentes físicos o químicos como radiación y quimioterapia.

1.1 Moléculas solubles

Las CTM son capaces de responder a estímulos producidos por factores extrínsecos que pueden modificar su comportamiento. En la literatura, está reportado que diferentes moléculas como la hormona paratiroidea, la proteína morfogénica de hueso 2 (BMP-2), el factor de crecimiento epidermal (EGF), FGF-2, TGF- β y PDGF, entre otros, pueden modificar la proliferación y diferenciación de las CTM (Tuan et al, 2002; Chaudhary et al, 2004; Artemenko et al, 2005; Bobis et al, 2006; Ng et al, 2008). Por ejemplo, se ha observado que EGF y FGF inducen la proliferación de células estromales de médula ósea (Kuznetsov et al, 1997). La hormona paratiroidea, BMP-2 y FGF-2 (Tuan et al, 2002; Calvi et al, 2003, Chaudhary et al, 2004; Ng et al, 2008) promueven la diferenciación *in vitro* de las CTM hacia osteoblastos, y la formación de hueso *in vivo*. De forma interesante, también se ha observado que hay factores que regulan los mecanismos de diferenciación en forma negativa e intervienen tanto en la osteogénesis como adipogénesis (Bobis et al, 2006). Se ha observado que el bloqueo del receptor para BMP (BMPR-1a) resulta en un aumento en la diferenciación hacia adipocitos y que, por el contrario, su sobreexpresión inhibe la adipogénesis y promueve la generación de osteoblastos (Chen et al, 1998).

En particular, una de las moléculas más importantes para las CTM, es el PDGF. Este factor de crecimiento es una proteína dimérica que puede estar formada por homo o heterodímeros de moléculas A y B unidas por enlaces disulfuro. De la misma manera, el receptor de PDGF también forma dímeros, los cuales se conforman por cadenas α y β y unen simultáneamente dos moléculas de PDGF, ya sean A ó B. Mientras que el PDGF-R α puede unir tanto moléculas A como B, el PDGF-R β interactúa sólo con las de tipo B (Heldin y Westermark, 1999). Este receptor forma parte de la familia de receptores de cinasa de tirosina tipo III, las cuales son proteínas transmembranales que se caracterizan por la presencia de cinco dominios tipo inmunoglobulina en la porción extracelular y un dominio intracelular con actividad de cinasa. Esta actividad les permite realizar sus funciones biológicas al activar diferentes cascadas de señalización intracelular (Heldin y Westermark, 1999).

El PDGF-R se expresa en células estromales de diferentes tejidos incluyendo las CTM presentes en médula ósea y, la activación de éste mediante la unión de su ligando tiene efectos en la proliferación, supervivencia y migración celular (Heldin y Westermark, 1999). Por un lado, estudios *in vitro* han demostrado que el PDGF junto con el EGF tiene un efecto estimulador en la proliferación de CTM derivadas de médula ósea (Gronthos y Simmons, 1995; Kuznetsov et al, 1997) y que incrementa su potencial para sostener la hematopoyesis. Esto es resultado de la elevación en los niveles de β -catenina y N-cadherina (Miura et al, 2006), las cuales son importantes reguladoras de los nichos hematopoyéticos (Calvi et al, 2003; Zhang et al, 2003). También se ha visto que el PDGF es capaz de modificar la hematopoyesis aumentando tanto la eritropoyesis como la granulopoyesis mediante la estimulación del estroma para producir citocinas necesarias en estos procesos (Delwiche et al, 1985; Yang et al, 2001).

Además, se ha demostrado que el PDGF interviene en los procesos de diferenciación osteogénica y adipogénica de las CTM. Por un lado, se ha observado que esta molécula estimula la proliferación de osteoprogénicos y CTM a expensas de la diferenciación (Hock y Canalis, 1994). Este factor puede inhibir la expresión de fosfatasa alcalina (FA) en los osteoblastos (Kubota et al, 2002;

Chaudhary et al, 2004), además de impedir la producción y deposición de colágena (Hock y Canalis, 1994) y al mismo tiempo disminuir la formación de depósitos de calcio y de hidroxapatita (Chaudhary et al, 2004; O'Sullivan et al, 2007). Aunado a estas alteraciones en la funcionalidad de los osteoblastos, se ha encontrado que el PDGF provoca una disminución en los niveles de factores de transcripción importantes en la osteogénesis, como son Osterix (OSX) y Runx2 (Tokunaga et al, 2008). En este mismo estudio, se reportó que la delección del PDGF-R disminuye la proliferación y migración de CTM de ratón y al inducirlos a osteoblastos, la actividad de FA es más temprana y más intensa que en las células que pueden responder a este factor.

Por otro lado, en cuanto a la adipogénesis, el trabajo publicado por Vaziri y colaboradores muestra cómo la diferenciación terminal de la línea celular murina de fibroblastos preadipocíticos (3T3-L1), va acompañada por una disminución en la expresión de los receptores α y β de PDGF. Esta reducción precede a los cambios morfológicos, la acumulación de vacuolas lipídicas y la expresión de genes adipocíticos (Vaziri et al, 1996). También se ha reportado que el PDGF interviene en la vía activada por la insulina durante la adipogénesis, lo cual resulta en la inhibición de la diferenciación (Ricort et al, 1997). Finalmente, estudios más recientes han demostrado que el PDGF inhibe a los factores de transcripción, PPAR γ (receptor activador gamma del proliferador de peroxisomas) y C/EBP α (proteína alfa de unión a CCAAT/potenciador), los cuales son importantes para la diferenciación de adipocitos, actuando así, como una molécula inhibitoria de la adipogénesis (Artemenko et al, 2005).

De esta forma, el PDGF es una molécula clave capaz de alterar los patrones de proliferación y diferenciación de las CTM, promoviendo así cambios en el MH y las proporciones celulares en el mismo, lo que a su vez modifica el proceso de hematopoyesis.

1.2 Enfermedades hematológicas

En la literatura, hay estudios que demuestran cómo las CTM de la médula ósea pueden estar alteradas en diferentes enfermedades hematológicas, lo cual puede deberse a que se ven afectadas por los mismos factores que provocaron las alteraciones en las células hematopoyéticas o por la interacción con estas últimas.

En leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásicos, se ha reportado que las CTM presentan aberraciones cromosómicas diferentes a las encontradas en las células hematopoyéticas. La presencia de estas alteraciones indica que las CTM de estas enfermedades muestran cierta inestabilidad genética (Flores-Figueroa et al, 2005; Blau et al, 2007). En mieloma múltiple está bien documentado que las CTM no tienen aberraciones cromosómicas, pero sí alteraciones funcionales, ya que presentan un crecimiento deficiente al expresar niveles bajos de receptores de factores de crecimiento (Gaderet et al, 2007), y secretan citocinas como IL-6, TNF- α e IL-1 β en mayor proporción al compararlas con células derivadas de individuos sanos (Wallace et al, 2001; Arnulf et al, 2007).

En LGC, se ha visto la presencia de células Ph⁺ en las capas estromales derivadas de médula ósea, las cuales corresponden a macrófagos que provienen de la clona anormal, y al compararlos con su contraparte normal se ha encontrado que reducen el número de LTC-IC en sistemas de co-cultivo con células hematopoyéticas normales (Bhatia et al, 1995). En cuanto a las CTM de LGC, en el 2006, dos grupos de investigación de manera independiente publicaron estudios sobre las características de estas células. Por un lado, Jootar y colaboradores reportaron que las CTM de estos pacientes no presentan el rearreglo *BCR-ABL*, que tienen un cariotipo normal y que son capaces de expandir células hematopoyéticas primitivas (CD133⁺) de sangre de cordón umbilical (Jootar et al, 2006). Por otro lado, simultáneamente, Zhao y su grupo, también encontraron que las CTM de pacientes con LGC tienen cariotipo normal y no presentan el cromosoma filadelfia. Además, analizaron el potencial de diferenciación y observaron que pueden generar adipocitos, osteoblastos, células neuronales y

gliales. Finalmente, demostraron que son capaces de soportar la hematopoyesis a partir de CMN de médula ósea (Zhao et al, 2006). Poco después, otro estudio se unió a estas evidencias al no encontrar el rearreglo *BCR-ABL* y corroborar el potencial de diferenciación osteogénica y adipogénica de estas células (Carrara et al, 2007). A pesar de que las CTM en esta enfermedad no se encuentran alteradas, sí se ha observado que las células hematopoyéticas leucémicas pueden promover cambios en el microambiente modificando la expresión de citocinas y quimiocinas en el nicho, lo cual provoca cambios en los patrones de migración de las células hematopoyéticas normales (Colmone et al, 2008). Sin embargo, hasta el momento, no se ha estudiado si las CTM puedan ser alteradas al interactuar con células malignas.

Las evidencias anteriores muestran que el microambiente puede modificarse por diversos factores durante el desarrollo y progresión de neoplasias hematopoyéticas. Estas modificaciones pueden ser irreversibles, como en el caso de las aberraciones cromosómicas, donde éstas permanecen en el tiempo; o reversibles, cuando las células del microambiente se encuentran alteradas por la interacción con células malignas y, en el momento en que se pierde o se impide dicha interacción, éstas primeras podrían recuperar sus potenciales y comportarse como su contraparte normal.

1.3 Agentes físicos o químicos

En cuanto a la hematopoyesis, se ha observado que la exposición a diferentes tipos de radiación y quimioterapéuticos, como parte de regímenes de acondicionamiento para trasplante, puede provocar alteraciones hematológicas a largo plazo. Domenech y colaboradores reportaron que el uso de dosis altas de quimioterapia y radiación provoca un desacoplamiento en la reconstitución hematopoyética, donde la recuperación de los diferentes progenitores en la médula ósea requiere de 2 a 4 años para alcanzar las cifras normales (Domenech et al, 1995). Más recientemente, se reportó en modelos murinos, que la radiación y el uso de factores antineoplásicos como la gemcitabina, pueden alterar la

capacidad de repoblación de las células de médula ósea meses después de haber recibido los tratamientos (Grande et al, 2000; Keyes et al, 2001). Estos resultados sugieren que los efectos producidos por la radiación y quimioterapéuticos permanecen y producen alteraciones a largo plazo, las cuales podrían estar mediadas tanto por afecciones en el componente hematopoyético de la médula ósea, como en su microambiente. De hecho, se ha encontrado que las células hematopoyéticas de ratones irradiados pueden recuperarse después de cultivarlas *ex-vivo* en presencia de estroma normal. Estos autores demostraron que si se cultivan CMN de ratones irradiados en presencia de una capa de células endoteliales resulta en un incremento en el número de células y aumenta la capacidad de formación de colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos (Chute et al, 2004). Sin embargo, esta recuperación no se observa *in vivo*, lo cual sugiere que el microambiente también se ve afectado por los tratamientos utilizados y demuestra que éste es muy importante para que las células hematopoyéticas lleven a cabo sus funciones.

De acuerdo a lo anterior, se ha observado, que el tratamiento con radiación y quimioterapia en dosis altas provoca alteraciones en las células estromales de médula ósea. Galotto et al, reportaron que este régimen induce una disminución en la frecuencia de CFU-F acompañada de una reducción en las LTC-IC, lo cual correlaciona con el desarrollo de osteopenia en los pacientes. Además, esta alteración se sigue observando años después de la exposición al acondicionamiento (Galotto et al, 1999). Estos datos sugieren que la radiación y quimioterapia podrían alterar a los osteoblastos provenientes de las CTM, alterando el nicho de las CTH, efecto que permanece a largo plazo en ausencia de tratamiento. En otro reporte, también se encontró que la administración de AraC en ratones, reduce la frecuencia de CTM y retrasa su crecimiento haciendo que el tiempo para llegar a confluencia en cultivo sea prolongado al compararlo con los controles. No obstante, la capacidad que tienen para sostener la hematopoyesis *in vitro* no se altera (Ben-Ishay y Barak, 2001). Sin embargo, hay otros trabajos en donde se observa que también esta capacidad puede verse alterada tras el tratamiento con quimioterapia (Carlo-Stella et al, 1997; Zweegman et al, 2007).

Todas éstas son evidencias de que hay agentes físicos y químicos que modifican el microambiente a largo plazo de forma irreversible, lo cual podría tener implicaciones importantes en la hematopoyesis y su regulación. Por ello, es importante estudiar cómo los diferentes fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades hematológicas podrían alterar el MH y las CTM.

2. Efectos del Imatinib en el microambiente hematopoyético y las CTM

Como se mencionó, el Imatinib es uno de los tratamientos utilizados en el manejo de la leucemia granulocítica crónica y, al igual que el uso de quimioterapia y radioterapia referido anteriormente, se ha observado que éste tiene efectos en el MH y las CTM. Uno de los primeros indicios del posible efecto del Imatinib en el estroma medular, se reportó en el 2002, cuando Beham-Schimid y colaboradores publicaron que el tratamiento con Imatinib provoca la regresión de la mielofibrosis desarrollada en pacientes con LGC. En este trabajo, se sugiere que esto podría deberse a una disminución en el número de megacariocitos que secretan PDGF y TGF- β e influyen en la proliferación de fibroblastos estromales, o por una inhibición directa del PDGF-R en estas células bloqueando así su proliferación.

Además de la influencia en los fibroblastos, recientemente, se han encontrado evidencias de que el Imatinib puede alterar el metabolismo óseo. Berman et al, en el 2006, realizaron un estudio retrospectivo en pacientes con LGC y pacientes con tumores gastrointestinales bajo tratamiento con Imatinib y encontraron que estos pacientes desarrollan hipofosfatemia (bajos niveles de fosfato en suero), presentan valores disminuidos de calcio y un decremento en los niveles de osteocalcina sérica. Todos estos parámetros indican cambios en el metabolismo mineral, sugiriendo alteraciones en el recambio óseo. En ese mismo año, otro estudio también reportó que los pacientes tratados con Imatinib durante un período de tres a seis meses, presentan niveles elevados de marcadores de formación de hueso como son, osteocalcina (OCN) y el propéptido N-terminal de procolágena tipo I. Además, observaron que estos cambios se acompañan de una disminución en los niveles de calcio y fosfato sérico, y el desarrollo de

hiperparatiroidismo secundario (Grey et al, 2006). Aunado a los cambios en el metabolismo óseo, Fitter et al encontraron que los pacientes tratados con Imatinib durante períodos largos de tiempo (2 a 4 años) efectivamente, presentan un aumento en el número de trabéculas óseas y corroboraron que tienen concentraciones bajas de calcio y fosfato en el suero (Fitter et al, 2008).

Al parecer todas estas alteraciones observadas en los pacientes se deben a que el Imatinib puede alterar a los osteoblastos y CTM a través de la inhibición del PDGF-R, lo cual ha sido demostrado en sistemas *in vitro*. O'Sullivan et al (2007), reportaron que en líneas celulares de osteoblastos de rata, el Imatinib incrementa la mineralización de la matriz extracelular y la expresión de marcadores osteoblásticos como la fosfatasa alcalina, la sialoproteína de hueso (BSP) y OCN, en forma dosis dependiente. Por otro lado, encontraron que también puede inhibir la osteoclastogénesis al interferir con la función del receptor del M-CSF (O'Sullivan et al, 2007; Dewar et al, 2005). Estas evidencias indican que el Imatinib es capaz de incrementar la osteogénesis, al contrarrestar el efecto inhibitorio que tiene el PDGF sobre este proceso (O'Sullivan, 2007).

En concordancia con estos resultados, Fitter y colaboradores también encontraron que el Imatinib inhibe la proliferación de CTM de individuos sanos *in vitro*. Asimismo, reportaron que aumenta la deposición de hidroxapatita (cristales de calcio característicos de la matriz ósea) y la expresión de genes osteoblásticos como BMP-2 y OSX en cultivos de explantes óseos bajo condiciones osteogénicas y que induce adipogénesis y genes relacionados a este linaje como el transportador lipídico específico de adipocitos (ALBP), PPAR γ y C/EBP α . También observaron que el PDGF puede inhibir la diferenciación osteogénica y que el Imatinib contrarresta el efecto, aumentándola en forma dosis dependiente (Fitter et al, 2008).

Además del estudio sobre los osteoblastos, hay un trabajo sobre el efecto *in vitro* del Imatinib en CTM derivadas de individuos sanos. En este estudio se reportó que esta molécula inhibe la señalización mediada por PDGF-R y por lo tanto la proliferación de estas células y el número y tamaño de las CFU-F.

También observaron que el tratamiento con Imatinib afecta la capacidad de las CTM para mantener la hematopoyesis *in vitro*. Sin embargo, de forma contradictoria a lo antes descrito, encontraron que el Imatinib inhibe la diferenciación osteogénica disminuyendo la actividad de fosfatasa alcalina, la cual utilizaron como marcador de osteoblastos (Fierro et al, 2007).

Finalmente, estos datos en conjunto demuestran que el Imatinib puede alterar a las CTM y los osteoblastos y de esta manera, podría modificar el microambiente hematopoyético.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con las evidencias referidas anteriormente, podemos decir que, hasta el momento, se sabe que el Imatinib puede modificar las funciones de las CTM *in vitro* y que también tiene efectos *in vivo* que alteran el metabolismo óseo de los pacientes. Estos cambios son mediados, principalmente, a través de la inhibición del PDGF-R. Como se mencionó, el estroma es altamente sensible a la quimioterapia y radiación, de forma que puede ser alterado a largo plazo. Esto no ha sido estudiado en las CTM de pacientes con LGC tratados con Imatinib. Por esta razón, el presente trabajo pretende caracterizar a las CTM derivadas de estos pacientes con la finalidad de evaluar si el tratamiento produce un efecto reversible o irreversible, haciendo que las alteraciones se mantengan o se pierdan *in vitro*. En particular, se analizará la frecuencia de las CTM en la médula ósea, así como su potencial de proliferación y su capacidad de diferenciación.

IV. HIPÓTESIS

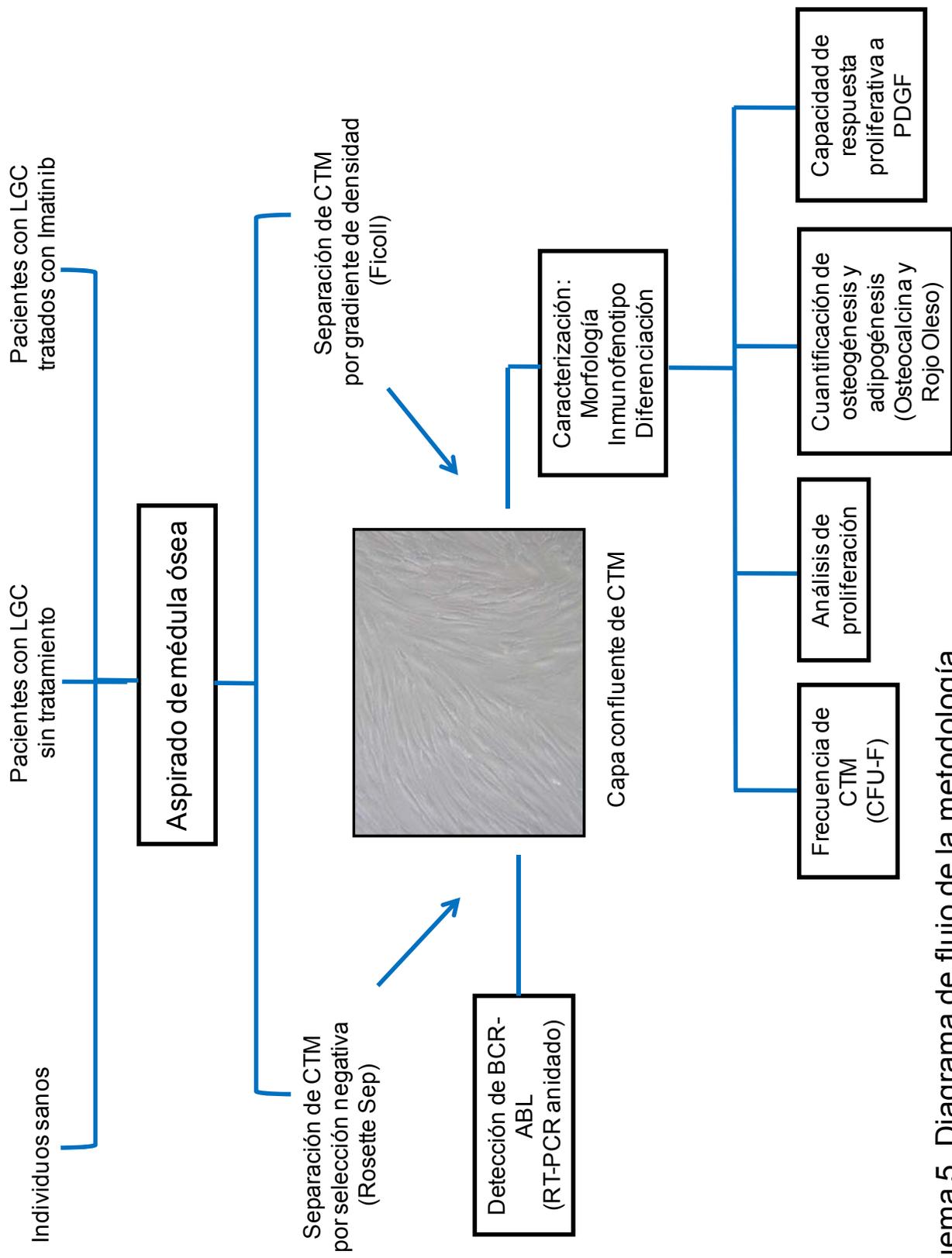
El tratamiento con Imatinib en pacientes con LGC para inhibir a la clona hematopoyética anormal afecta y sensibiliza *in vivo* a las CTM de estos pacientes, de modo que altera su proliferación y diferenciación *in vitro*.

V. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a las células troncales mesenquimales de pacientes con leucemia granulocítica crónica, tanto vírgenes de tratamiento, como tratados con Imatinib

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y caracterizar poblaciones puras de CTM derivadas de médula ósea de pacientes con LGC al momento del diagnóstico vírgenes de tratamiento, tratados con Imatinib y de médula ósea normal como control.
2. Analizar la presencia del rearrreglo *BCR-ABL* en las CTM de LGC sin tratamiento, tratadas con Imatinib y de médula ósea normal.
3. Evaluar el número de células troncales mesenquimales presentes en cada muestra de LGC al momento del diagnóstico sin tratamiento, tratados con Imatinib y de médula ósea normal como control.
4. Estudiar el potencial de proliferación de las CTM derivadas de pacientes de LGC sin y con tratamiento con Imatinib, así como de médula ósea normal.
5. Determinar el patrón de expresión de algunas moléculas de adhesión tanto de LGC sin tratamiento como tratadas con Imatinib y médula ósea normal.
6. Cuantificar la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica de las CTM de pacientes de LGC sin y con tratamiento con Imatinib, así como de médula ósea normal.
7. Evaluar la capacidad de respuesta al estímulo mitogénico mediado por PDGF en las CTM tanto de LGC sin tratamiento como tratadas con Imatinib y médula ósea normal.



Esquema 5. Diagrama de flujo de la metodología

VII. METODOLOGÍA

1. *Obtención de las muestras biológicas*

Las muestras de pacientes con leucemia granulocítica crónica se obtuvieron del servicio de hematología del Centro Médico Nacional La Raza (Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS). Los pacientes con diagnóstico de LGC fueron sometidos a la toma de un aspirado de médula ósea en la cresta ilíaca postero-superior como parte de las pruebas clínicas de rutina y de cariotipo. Las muestras fueron obtenidas bajo anestesia local, en jeringas de plástico heparinizadas, recolectando entre 3 y 5 ml de muestra para procesarse el mismo día. Las muestras de médula ósea de individuos sanos fueron obtenidas de pacientes del servicio de ortopedia de la Clínica No. 32 (IMSS) y de donadores sanos de médula ósea del servicio de hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) y del Instituto Nacional de Cardiología (Secretaría de Salud; Esquema 5)

2. *Obtención de células troncales mesenquimales*

El aspirado de médula ósea (5 ml) fue diluido 1:1 con buffer de fosfatos (PBS pH 7.4, Gibco) y sometido a un gradiente de densidad (<1.077 g/ml) (Ficoll-Paque®, Pharmacia Biotech). Para ello, se agregaron 5 ml de Ficoll en un tubo de 15 ml para posteriormente agregar cuidadosamente de 3-5 ml de muestra diluida, evitando su mezcla. Después se centrifugó durante 30 minutos a 400 g. Se tomó la interfase donde se encuentran las células mononucleares (CMN) y se lavó con PBS centrifugando durante 8 minutos a 1200 revoluciones por minuto (rpm). Se resuspendió el botón celular en DMEM bajo en glucosa (Gibco) suplementado con suero fetal bovino probado para el crecimiento de células mesenquimales (SFB, Stem Cell Technologies) al 10%, 10 U/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina (Sigma; Medio suplementado). Las CMN se contaron y sembraron en cajas de petri de 100X10mm (Corning) a una densidad de 50×10^6 a 100×10^6 CMN por caja. Las CTM se obtuvieron mediante selección por adhesión, la cual consistió en cultivar las CMN durante 24 horas en medio suplementado para

después retirar las células no adherentes, lavar la caja de petri con PBS y agregar nuevamente medio suplementado fresco. Esto permitió cultivar las células adherentes que corresponden a las CTM. El cambio de medio fue realizado semanalmente.

Para el análisis de la presencia de BCR-ABL, se obtuvo una población de CTM, reduciendo al mínimo la presencia de macrófagos en el cultivo, para lo cual se utilizó un kit comercial basado en la selección negativa de la población (Rosette Sep®, Stem Cell Technologies). Para ello, se tomaron de 0.5 ml a 1 ml del aspirado de médula ósea y se incubaron por 20 minutos con una mezcla de anticuerpos que incluye: glicoforina A, CD3, CD14, CD19, CD38 y CD66b (50µl/ml de muestra). Después de la incubación, se diluyó la muestra 1:1 con PBS/EDTA 1 mM/ 2% SFB para ser sometida a una separación por gradiente de Ficoll (Ficoll-Hypaque Plus) durante 25 minutos a 300 g. Se obtuvo la interfase y se lavó con PBS/EDTA 1 mM/ 2% SFB. Las células se centrifugaron por 8 minutos a 1200 rpm para obtener el botón celular, se contaron y se cultivaron durante dos días en botellas de 25 cm² con 5 ml de medio suplementado (4,000 a 8,000 células/cm²). Después de 48 horas, se retiraron las células no adherentes para cultivar las CTM que se quedaron adheridas a la caja. El cambio de medio se realizó semanalmente.

3. Cultivo de células troncales mesenquimales

Una vez obtenidas, las células adherentes fueron mantenidas en medio suplementado a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, para permitir su expansión. Una vez que llegaron a confluencia, las células se tripsinizaron (Tripsina/EDTA 0.05%, Gibco) durante 8 minutos a 37°C. Todas las tripsinizaciones realizadas en este trabajo se detuvieron con 500 µl de SFB. Posteriormente, las células se centrifugaron por 8 minutos a 1200 rpm y el botón se resuspendió en medio suplementado. En esta primera tripsinización (Resiembra cero, R0) se realizaron los análisis de proliferación celular, cuantificación de osteocalcina y de adipocitos. Los cultivos de las siguientes

resiembras se comenzaron con 50,000 células en cajas de petri de 10X100 mm con 10 ml de medio suplementado y se mantuvieron hasta alcanzar confluencia. Los cultivos se tripsinizaron nuevamente y las células obtenidas en esta primera resiembra (R1) se utilizaron para el análisis de la capacidad de diferenciación como parte de la caracterización. Posteriormente las células, se volvieron a sembrar a la misma densidad y al estar confluentes, se tripsinizaron para estudiar el inmunofenotipo y la expresión de moléculas de adhesión en las células de esta última resiembra (R2).

4. Evaluación del inmunofenotipo de las células troncales mesenquimales

Con la finalidad de establecer la identidad de la población de CTM obtenidas, se realizó un análisis fenotípico mediante citometría de flujo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) o cianina 5.5 (Cy5.5): CD14-PE (1 μ l, Caltag), CD31-FITC (1 μ l, Caltag), CD45-FITC (1 μ l, Caltag) y HLA-DR-PE (1 μ l, Caltag) para descartar la presencia de células hematopoyéticas y endoteliales. También se evaluaron los marcadores de CTM con los anticuerpos CD90-FITC (2 μ l, Becton-Dickinson), CD105-PE (1 μ l, Caltag), CD73-PE (4 μ l, Becton-Dickinson) y CD13 (1 μ l, Caltag). Asimismo, se analizó la expresión de HLA-ABC-FITC (4 μ l, Becton-Dickinson), CD117-Cy5.5 (c-Kit; 1 μ l, Caltag) y CD140b-PE (PDGF-R; 2 μ l, Becton-Dickinson). Para estos estudios, las CTM de la segunda resiembra se resuspendieron en PBS con SFB al 2% y EDTA 1 mM (1×10^5 células en 50 μ l). Se incubaron con el volumen especificado del anticuerpo correspondiente durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente, se incubaron 10 minutos con 250 μ l de solución de lisis (Becton-Dickinson), se agregó 1 ml de PBS y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el botón se resuspendió en 200 μ l de PBS para analizar las muestras en el citómetro de flujo.

Se utilizaron los controles de isotipo de acuerdo al anticuerpo primario usado. Las muestras fueron evaluadas en un citómetro FACS Calibur (Becton-Dickinson) ubicado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, del

Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS). Se analizaron 10,000 eventos por tinción.

5. Estudio de la capacidad de diferenciación

5.1 Diferenciación condrogénica

Para inducir la diferenciación condrogénica se utilizaron 2.5×10^5 CTM de R1, las cuales se colocaron en un tubo de 15 ml de polipropileno y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos para formar el botón celular (micromasa) en el fondo del tubo. Posteriormente, se agregaron 500 μ l de medio condrogénico y se cultivó durante tres semanas, realizando el cambio de medio dos veces por semana.

El medio condrogénico consistió en DMEM-alta glucosa, suplementado con 0.1 μ M de dexametasona, 50 μ g/ml ácido ascórbico, 100 μ g/ml de piruvato de sodio, 40 μ g/ml de prolina, 10 ng/ml de TGF- β 1 y 50 mg/ml de ITS⁺ premix (Becton Dickinson; 6.25 μ g/ml de insulina, 6.25 μ g/ml de transferrina, 6.25 ng/ml de ácido selénico, 1.25 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) y 5.35 mg/ml de ácido linoleico).

Para evaluar la diferenciación, las micromasas fueron fijadas en formaldehído al 4% y deshidratadas en diluciones seriales de etanol durante 30 segundos cada una (Etanol al 80%, etanol al 96%, etanol absoluto y xileno) para ser incluidas en parafina. Se hicieron cortes de 5 μ m con la ayuda de un microtomo y se tiñeron con azul alciano.

5.1.1 Tinción citoquímica con azul alciano

Una vez obtenidos los cortes de las micromasas en las laminillas, éstas se sumergieron en azul alciano al 1% en ácido acético durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en diluciones seriales de etanol (un minuto en etanol al 90%, un minuto en etanol absoluto y 5 minutos en xileno). Finalmente, las laminillas fueron observadas bajo el

microscopio. La muestra se consideró como positiva para la diferenciación condrogénica, al observar la aparición de una coloración azul en la micromasa, la cual indica la producción de mucopolisacárido, característica de las células condrocíticas.

5.2 Diferenciación adipogénica

Para inducir la diferenciación adipogénica se utilizaron CTM de la primera resiembra, las cuales fueron cultivadas en cámaras de 4 pozos (1 cm²) con base desmontable (Nalge Nunc Inter.) a una densidad de 1x10⁴ cel/cm² con 1 ml de medio suplementado. Una vez que los cultivos llegaron al 30% de confluencia, se retiró el medio y se agregó 1 ml de medio adipogénico (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) para cultivar a las células durante 3 semanas. Este medio está suplementado con 10% de SFB, 0.5 mM de isobutil-metilxantina, 1 µM de dexametasona, 10 µM de insulina y 200 µM de indometacina. Los cultivos control se mantuvieron todo el tiempo en medio suplementado. Se realizaron cambios de medio 2 veces por semana. Para corroborar la diferenciación, se analizaron los cultivos bajo el microscopio invertido y se consideró positiva al encontrar alrededor 10% o más de las células con vacuolas lipídicas.

5.3 Diferenciación osteogénica

Para inducir la diferenciación osteogénica, se sembraron CTM de R1 en cámaras de 4 pozos (1 cm²) con base desmontable (Nalge Nunc Inter.) a una densidad de 1x10⁴ cel/cm² con 1 ml de medio suplementado. Una vez que los cultivos llegaron al 30% de confluencia, se retiró el medio y se agregó 1 ml de medio osteogénico. Este medio consistió en DMEM bajo en glucosa con 15% de suplemento osteogénico, dexametasona 10⁻⁷ M y ácido ascórbico 0.2 mM (Stem Cell Technologies). Las células se cultivaron durante 4 semanas, y en la última se agregó β-glicerofostato 10 mM (Stem Cell Technologies) al medio osteogénico. Los cultivos control se mantuvieron todo el tiempo en medio suplementado. Los cambios de medio se realizaron cuidadosamente dos veces por semana para

evitar el desprendimiento de la capa celular. Posteriormente, se desechó el medio, se lavó con PBS y se fijó durante 30 minutos con paraformaldehído al 4%. Para corroborar la diferenciación, las células fueron sometidas a la tinción de Von Kossa, la cual detecta depósitos minerales que indican la diferenciación osteogénica.

5.3.1 Tinción citoquímica de Von Kossa

Una vez que los cultivos fueron fijados, se lavaron con PBS y se agregó 1 ml de nitrato de plata al 5% y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente bajo la luz de una lámpara. Después se lavó con agua destilada y se agregó 1 ml de hiposulfito de sodio al 5% durante 2 minutos. Se lavó nuevamente con agua destilada y los cultivos se observaron bajo el microscopio. La diferenciación osteogénica fue considerada como positiva cuando se presentaba una coloración café en los cultivos, lo cual indica la presencia de matriz mineralizada y la diferenciación hacia osteoblastos. Esta coloración debía ser más intensa a la observada en los cultivos control.

6. Análisis de la presencia del rearreglo BCR-ABL

Para realizar el análisis de la presencia del rearreglo *BCR-ABL*, se obtuvo ácido ribonucleico (ARN) de las diferentes muestras, tanto de células troncales mesenquimales como hematopoyéticas. Para ello, se utilizaron 5×10^5 CTM, las cuales fueron centrifugadas durante 8 minutos a 1200 rpm para obtener una pastilla celular. Ésta fue resuspendida en 750 μ l de TRIPURE (Roche). Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Para proceder a la extracción del ARN, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y enseguida se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitó suavemente durante 15 segundos y las muestras se mantuvieron de 2 a 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C . En este punto se formaron 3 fases: la fase

orgánica inferior que contenía el ácido desoxirribonucléico (ADN), la interfase en la que se encontraban proteínas y la superior en donde se encontraba el ARN. Se recuperó esta última fase y se adicionaron 500 µl de isopropanol. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para enseguida centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y, finalmente decantar el sobrenadante.

El ARN obtenido se lavó, adicionando 750 µl de etanol al 75%, el cual fue mezclado suavemente para posteriormente centrifugar a 12000 rpm, durante 15 minutos a 4°C. Este lavado se repitió 2 veces, se decantó el etanol y se dejó secar el ARN durante máximo 15 minutos al aire.

Una vez obtenido el ARN, éste se disolvió en 20 µl de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, 0.1%) (Roche) y de este volumen se tomó una alícuota de 1 µl para cuantificar el ARN en 9 µl de agua-DEPC y verificar la calidad de la molécula en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. El volumen restante de ARN se utilizó para llevar a cabo la transcripción reversa mediante la técnica de Random Primers (Invitrogen) y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sencilla y el PCR anidado, de acuerdo a la metodología de Chávez-González et al (2006). Los primers y parámetros utilizados en la amplificación se muestran en la siguiente tabla:

Molécula	Juegos de primers	Parámetros de amplificación
ABL	5'-CTTCTGGAAAGGGGTACCTATTA-3' 3'- GGAGTGTTCCTCCAGACTGTTG-5'	96°C-5min, (94°C-30seg, 60°C-1min, 72°C-1min) 35 ciclos y 72°C-10min.
BCR-ABL (1ª reacción)	5'- GGAGTGTTCCTCCAGACTGTTG-3' 3'- GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA-5'	96°C-5min, (94°C-30seg, 61°C-1min, 72°C-1min) 35 ciclos y 72°C-10min
BCR-ABL (anidado)	5'- TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT-3' 3'-GTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG-5'	96°C-5min, (94°C-30seg, 58°C-1min, 72°C-1min) 30 ciclos y 72°C-10min

7. Ensayos de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)

Para cuantificar la frecuencia de progenitores de CTM en cada una de las muestras, se realizó el ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F). Una vez obtenidas las CMN, se sembraron 1.5×10^5 y 3×10^5 células en cajas de petri de 35x10 mm (Corning) con 2 ml de medio suplementado. Las células fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO₂. Después de 14 días, se retiró el medio, se lavó la caja dos veces con PBS y se dejó secando a temperatura ambiente durante toda la noche. Una vez secas, las células se tiñeron con Wright-Giemsa (Gibco) durante 3 minutos, se lavaron con agua corriente y se dejaron secar nuevamente. Se realizó la cuantificación de colonias en un microscopio invertido (Olympus) tomando en cuenta todas aquellas agrupaciones de células que crecían en una misma dirección y con un centro definido. Además del número de colonias, se registró el tamaño de las mismas con la ayuda de una caja de petri cuadrículada y las colonias se clasificaron de acuerdo a su tamaño en colonias de 1 a 2 mm², de 3 a 5 mm² y de más de 5 mm².

8. Ensayos de proliferación

Para evaluar la capacidad de proliferación de las diferentes muestras se utilizaron células de R0. Las CTM se cultivaron en cajas de 24 pozos a una densidad de 2.5×10^3 células por mililitro de medio suplementado. Éstas fueron contadas con azul tripano a los días 3, 6, 9 y 12 de cultivo en ausencia o presencia de PDGF (10 ng/ml), haciendo un cambio de medio en el día 7 de cultivo. Las cuantificaciones se hicieron por duplicado.

9. Determinación de la expresión de moléculas de adhesión

Se analizó la expresión de algunas moléculas de adhesión por citometría de flujo. Se estudiaron diferentes antígenos utilizando los siguientes anticuerpos: CD29-FITC (1 µl, Caltag), CD49b-PE (4 µl, Becton-Dickinson), CD54-PE (1 µl Caltag), CD44-FITC (1 µl Caltag), CD166-PE (4 µl, Becton-Dickinson) y CD58-PE

(4 μ l, Becton-Dickinson). Las CTM de R2 se resuspendieron en PBS con SFB al 2% y EDTA 1mM (1×10^5 células en 50 μ l). Se incubaron con el volumen especificado para el anticuerpo correspondiente durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente se incubaron 10 minutos con 250 μ l de solución de lisis (Becton-Dickinson), se agregó 1 ml de PBS y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 200 μ l de PBS para analizar las muestras en el citómetro de flujo.

Se utilizaron los controles de isotipo de acuerdo al anticuerpo primario usado. Las muestras fueron evaluadas en un citómetro FACS Calibur (Becton-Dickinson) ubicado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS). Se analizaron 10,000 eventos por tinción.

10. Cuantificación del potencial de diferenciación

10.1 Osteogénesis: Análisis de la expresión de osteocalcina

Para tener un análisis más cuantitativo de la capacidad de diferenciación osteogénica de las diferentes muestras, se determinó la expresión de osteocalcina mediante citometría de flujo tanto de los CTM cultivadas en medio osteogénico como de las cultivadas en medio suplementado utilizadas como control. Se sembraron 7.5×10^4 CTM de R0 en cajas de petri de 35x10 mm con 1.5 ml de medio osteogénico (Stem Cells Technologies) o medio suplementado. Los cultivos osteogénicos y control se mantuvieron durante 3 semanas a 37°C y 5% de CO₂ con cambios de medio dos veces por semana, los cuales se hicieron cuidadosamente para evitar el desprendimiento de la capa celular. Los cultivos osteogénicos fueron suplementados con 10 mM de β -glicerofosfato sólo durante la última semana.

Después de las tres semanas de inducción, las células fueron tripsinizadas (Tripsina/EDTA 0.05%, Gibco) durante 10 min a 37°C y posteriormente se despegaron con la ayuda de un rastrillo celular. Las células se resuspendieron en PBS con 2% de SFB y 1 mM de EDTA (1×10^5 células en 50 μ l) y se fijaron con 500

µl de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos. Las células se lavaron con PBS y posteriormente se permeabilizaron con 1 ml de saponina al 0.1% (SAP, Sigma) en solución balanceada de Hank (HBSS, Gibco). Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, se decantó y se adicionaron 100 µl de SAP con 10 µl del anticuerpo contra osteocalcina (R&D Systems). Las células se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se fijó nuevamente con 250 µl buffer de lisis (Beckton-Dickinson) durante 10 minutos, se agregó 1 ml de SAP y se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Finalmente, se decantó y se resuspendió el botón celular en 200 µl PBS para analizar las muestras en el citómetro de flujo.

Se utilizaron los controles de isotipo de acuerdo al anticuerpo primario. Las muestras fueron analizadas en un citómetro FACS Calibur (Becton-Dickinson) ubicado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS). Se analizaron 10,000 eventos por tinción.

10.2 Adipogénesis: Cuantificación con rojo oleoso

Para realizar un análisis más preciso de la capacidad de diferenciación adipogénica de las diferentes muestras, se cuantificó el porcentaje de adipocitos en cada cultivo. Para ello, se sembraron 7.5×10^4 CTM de R0 en cajas de petri de 35x10 mm con 1.5 ml de medio suplementado. Al otro día, se retiró el medio y se agregaron 1.5 ml de medio adipogénico (Gibco). Se cultivó durante una semana y se analizó la presencia de adipocitos. Las células fueron tripsinizadas con 5 ml de tripsina (Tripsina/EDTA 0.05%, Gibco) durante 8 min. Las células se centrifugaron durante 8 min a 1200 rpm y resuspendieron en PBS. Se hicieron frotis con 2×10^4 células con la ayuda de una citocentrífuga y se dejaron secar durante 5 minutos. Finalmente, los frotis fueron teñidos con rojo oleoso para corroborar la presencia de vacuolas lipídicas.

10.2.1 Tinción citoquímica con rojo oleoso

Para cuantificar la diferenciación adipogénica, las células del frotis se fijaron durante 30 minutos con formalina al 10%. Se lavaron con agua destilada y se tiñeron durante 30 minutos con 200 µl de aceite rojo-O al 0.7% en propilenglicol (Sigma-Aldrich) previamente diluido 3:2 en agua destilada y filtrado. A continuación, se lavaron con agua destilada y se incubaron con 200 µl de isopropanol al 60% durante 5 minutos. Se desechó el isopropanol y, sin lavar, se agregaron 200 µl de aceite rojo-O y se mantuvieron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó el colorante y se lavaron con agua destilada para ser contrateñidas con hematoxilina de Meyer durante 2 minutos. Se lavó nuevamente con agua destilada y las laminillas se dejaron secar por 5 min. Finalmente, se agregó propilenglicol para cubrir las laminillas y se observaron al microscopio. Se realizó el conteo de las células positivas a la tinción (células con vacuolas teñidas de color rojo brillante) eligiendo campos al azar y contando 300 células en total (positivas y negativas).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Muestras Biológicas

Para realizar este estudio, se utilizaron muestras de médula ósea de individuos sanos (MON), de pacientes con leucemia granulocítica crónica sin tratamiento (LGC-V) y tratados con Imatinib (LGC-IM). Se obtuvieron 23 muestras de MON en total, de las cuales el 26% fueron CTM descongeladas de individuos sanos obtenidas del banco de células del Laboratorio de Microambiente Hematopoyético (Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS), el 26% eran de pacientes ortopédicos que fueron sometidos a cirugías de cadera y el 48% restante se obtuvieron de donadores sanos de médula ósea. Se lograron obtener CTM de todas las muestras de MON procesadas, sin embargo, sólo se trabajó con 17 de ellas para los cultivos de CTM y los diferentes análisis, ya que algunas muestras se encontraban contaminadas con bacterias. En cuanto a las muestras de LGC-V, se obtuvieron de pacientes con diagnóstico reciente de leucemia granulocítica crónica, positivos para el rearrreglo *BCR-ABL* y que no habían recibido ningún tratamiento. Se recolectaron 38 muestras, de las cuales se utilizaron 29 para los diferentes experimentos, debido a que, a pesar de haber crecimiento celular en todas las muestras, en algunas de ellas se detectó la presencia de bacterias. Para el caso de las muestras de LGC-IM, se recibieron en total 28 muestras, obteniendo CTM de todas ellas, sin embargo, se trabajó con 21 muestras para la realización del estudio, ya que 7 muestras fueron excluidas debido a la presencia de contaminación bacteriana en el cultivo. El tiempo de tratamiento de los pacientes se encontraba en un rango de 3 a 72 meses, donde el 48% de las muestras utilizadas correspondieron a un lapso de tiempo de 3 a 9 meses. Sin embargo, a pesar de estar bajo tratamiento, las células hematopoyéticas aún presentaban el rearrreglo *BCR-ABL*, característico de la enfermedad. Con base en lo anterior, podemos decir que todos los pacientes aún no estaban en remisión molecular. En el estudio no encontramos diferencias entre las CTM obtenidas de pacientes con poco tiempo de tratamiento y los tratados por

largos períodos, por lo que manejamos a todas las muestras de LGC-IM como un solo grupo experimental, independientemente del tiempo de tratamiento.

2. Obtención de CTM de MON, LGC-V y LGC-IM

Para la obtención de CTM se utilizó un gradiente de densidad (Ficoll) mediante el cual, se purificaron CMN a partir de aspirados de médula ósea. El promedio de CMN obtenidas de MON fue de $9.33 \times 10^6 \pm 8.97 \times 10^6$ células por mililitro (cel/ml), mientras que de las muestras de LGC-V, se obtuvieron $75.58 \times 10^6 \pm 75.21 \times 10^6$ cel/ml. Esto es casi un orden de magnitud mayor a lo obtenido de MON, lo cual corroboró el diagnóstico, ya que se observó un aumento en las CMN de médula ósea, el cual podría deberse a la presencia de células leucémicas. Por otro lado, de las muestras de LGC-IM, el número de CMN obtenidas fue de $1.72 \times 10^6 \pm 1.23 \times 10^6$ cel/ml, esto se debe a que el Imatinib puede afectar la hematopoyesis normal (Bartolovic et al, 2004). De hecho, se ha observado que el Imatinib produce efectos hematológicos secundarios en forma dosis dependiente, los cuales afectan a todos los linajes hematopoyéticos (Kantarjian et al, 2002). Dentro de las toxicidades más comunes se encuentra la neutropenia en grados avanzados, que se presenta en el 14% de los pacientes, seguida por la trombocitopenia (8%) y la anemia (3%) (Appel et al, 2005).

Los datos revelan una variabilidad muy grande en el número de CMN obtenidas tanto de MON como de LGC-V y LGC-IM. En las muestras procesadas de MON, es probable que la variabilidad se deba a que éstas provenían de tres fuentes distintas. Por un lado, se utilizaron muestras de pacientes sometidos a cirugías de cadera del servicio de ortopedia de la Clínica 32 (IMSS), en donde la obtención de CMN se realizó a partir de un raspado óseo. Por otro lado, las muestras provenientes de donadores sanos de médula ósea del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), se obtuvieron a través de un aspirado directo de médula ósea, a partir del cual se separaron las CMN. Finalmente, las muestras del Instituto Nacional de Cardiología (Secretaría de Salud) se obtuvieron a través de un aspirado que posteriormente fue

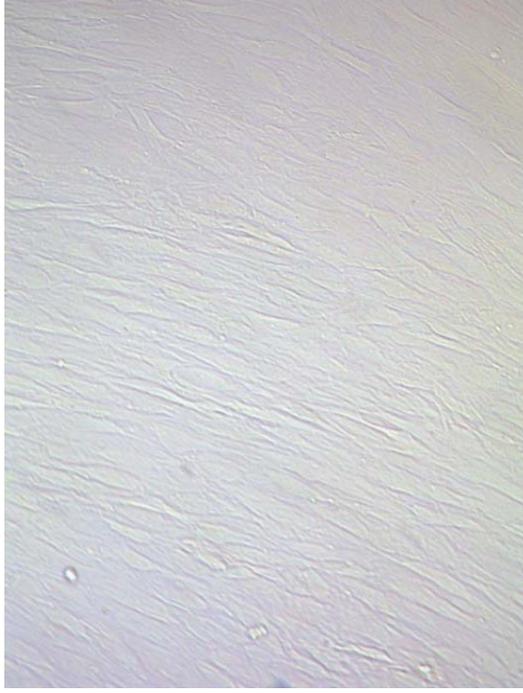
centrifugado y procesado para poder ser aplicado al receptor del trasplante, y fue después de este procesamiento que aislamos las CMN.

En cuanto a las CMN de LGC-V y LGC-IM, todas fueron obtenidas a partir de aspirados de médula ósea, sin embargo la variabilidad observada podría deberse a diferencias en la toma de muestra y en el sitio en el que fue realizada, lo cual provocaría la dilución de la misma. No obstante en este estudio, no analizamos si las muestras recolectadas estaban hemodiluidas, por lo que no podemos confirmar si la variabilidad se debe a esta dilución o si es un fenómeno propio de las muestras debido a la variabilidad intrínseca entre los pacientes.

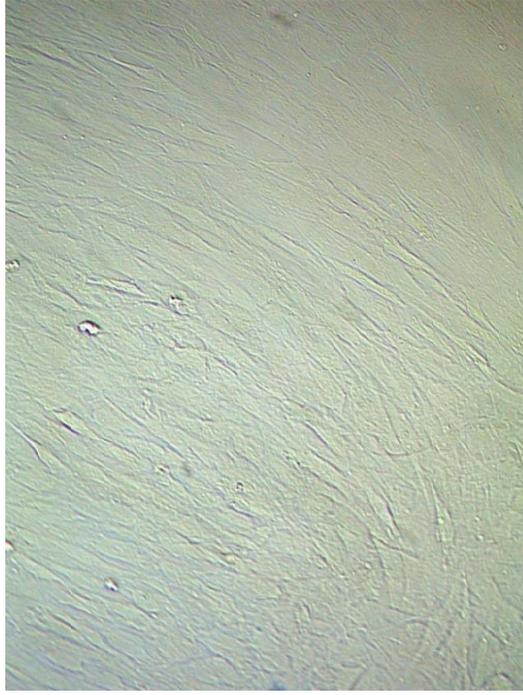
Una vez obtenidas las CMN, éstas se cultivaron en cajas de petri de 10x100 mm a una densidad de 50×10^6 a 100×10^6 por caja, y después de 24 horas, se retiraron las células en suspensión y se expandió la fracción adherente del cultivo. En la Figura 1, se muestran capas celulares representativas de los tres grupos de estudio, donde se observa que se obtuvieron cultivos confluentes de CTM, lo cual fue posible en todas las muestras procesadas. Sin embargo, observamos que mientras las muestras de MON y LGC-V llegaban a un 60% de confluencia al día 7 de cultivo, las de LGC-IM sólo llegaban al 30%. A pesar de esto, durante los siguientes 7 días, los cultivos de LGC-IM proliferaron normalmente y llegaron a confluencia, al igual que los de MON y LGC-V. Fierro y colaboradores reportaron que los cultivos de CTM tratados con Imatinib pierden confluencia debido a una inhibición en la proliferación celular (Fierro et al, 2007). Es probable que las muestras de LGC-IM durante la primera semana se encontraran inhibidas por el tratamiento con Imatinib que se administró a los pacientes. No obstante, durante la siguiente semana los cultivos recuperaron su potencial proliferativo, ya que la exposición a Imatinib no se continuó *in vitro*.

3. Caracterización de las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM

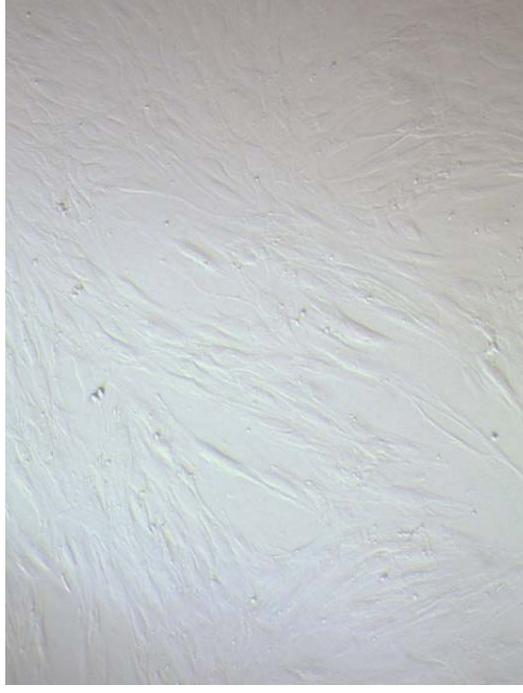
Una vez obtenidos los cultivos confluentes, se evaluaron diferentes parámetros para corroborar que la población obtenida cumpliera con las características propias de las CTM reportadas por la Sociedad Internacional de



A



B



C

Figura 1. Microfotografías de capas confluentes de CTM obtenidas de MON (A), LGC-V (B) y LGC-IM (C). Magnificación 200X

Terapia Celular (Dominici et al, 2006). Para ello, se analizó la morfología, el inmunofenotipo y la capacidad de diferenciación de las células.

3.1 Análisis morfológico

Se analizó la morfología de los cultivos tiñendo a las CTM con colorante Wright-Giemsa, para posteriormente observarlas en el microscopio invertido. Se tomó en cuenta la morfología de las células individuales y la direccionalidad de los cultivos (MON, n=6; LGC-V, n=6; LGC-IM, n=7).

En el Panel A de la Figura 2 se muestra una imagen representativa de un cultivo de CTM de MON teñido con colorante Wright-Giemsa, donde puede observarse que las CTM presentaron una morfología fibroblastoide, alargada con forma de huso. En el Panel B se puede apreciar a las células en un aumento mayor, lo cual permite observar que tienen un núcleo central con dos o tres nucléolos. Esta morfología también se observó en los cultivos de LGC-V y LGC-IM, lo cual corresponde a la morfología característica de las CTM. Sin embargo, como se muestra del Panel C al F de la Figura 2, también observamos algunas células grandes (C, 6%-8%), pequeñas (D, 12%-16%), así como algunas triangulares (E, 14%-17%) y otras en forma neural (F, 4%-7%). Asimismo, encontramos en menor proporción células romboides y algunas que presentaban filopodios y/o lamelopodios (datos no mostrados). Esto se observó consistentemente en los tres grupos sin encontrar diferencias entre ellos.

Aunque algunos autores han reportado que las capas de CTM contienen células homogéneas (Pittenger et al, 1999), existe una mayor evidencia de que los cultivos son heterogéneos y contienen células morfológicamente y al parecer, funcionalmente distintas. El trabajo publicado por Mets y Verdonk enfatiza la presencia de dos tipos celulares, uno denominado tipo I, donde las células son pequeñas y fusiformes; y otro tipo II, en el que las células son más grandes y aplanadas y proliferan más lento (Mets y Verdonk, 1981). Estudios más recientes, han descrito tres poblaciones celulares identificadas mediante citometría de flujo. La primera fue denominada como SR-1, que identifica células pequeñas,

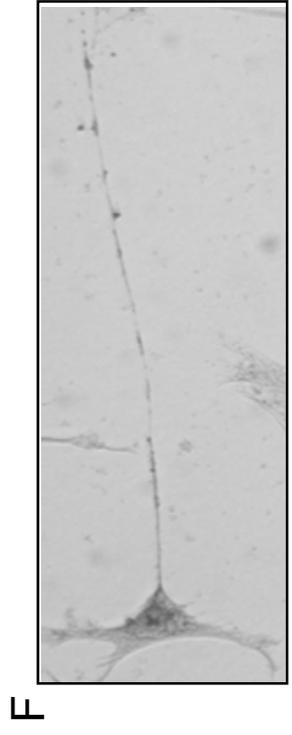
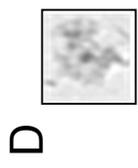
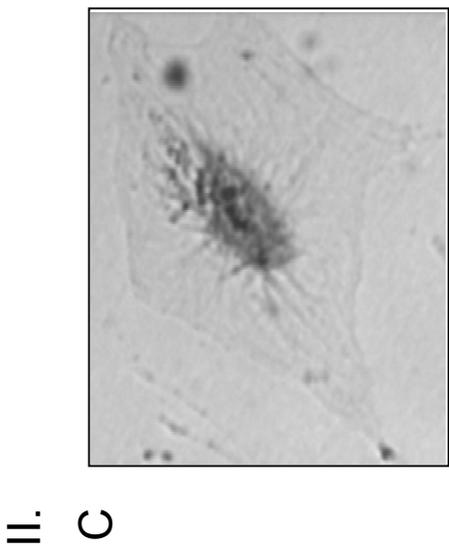
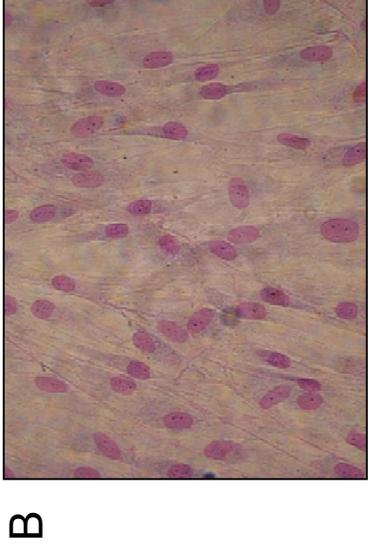
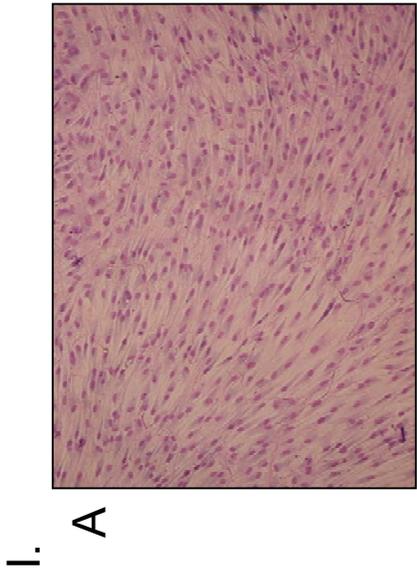


Figura 2. Morfología de las CTM derivadas de médula ósea. I, Capas confluentes teñidas con colorante Wright-Giemsa; 100X (A), 400X (B). Las células presentan morfología fibroblastoide con un núcleo central y dos a tres nucleolos y crecen de forma ordenada. II, Tipos de células presentes en los cultivos: grande (C), pequeña (D), triangular (E) y neural (F). Magnificación 1000X

fusiformes y agranulares; otra llamada SR-2 de células pequeñas y granulares; y, la última, que corresponde a células grandes y granulares, a las que se les llamó CTM maduras (Colter et al, 2001). La presencia de diferentes tipos celulares, también ha sido reportada por nuestro grupo anteriormente, donde se describió la presencia de células alargadas en forma de huso, y otras grandes y triangulares (Flores-Figueroa et al, 2005). En el presente estudio, las células fusiformes y pequeñas podrían corresponder al tipo SR-1 y SR-2, mientras que las grandes y triangulares posiblemente pertenezcan al grupo de CTM maduras. En la literatura referida no se reporta la presencia de células con morfología neural; sin embargo, en un trabajo reciente de nuestro grupo se observó la presencia de células con morfología neural tanto en CTM de médula ósea como de sangre de cordón umbilical y de placenta (Montesinos et al, 2009). Además, se ha observado que las CTM sin diferenciar ya expresan marcadores de células neurales (Tondreau et al, 2004; Montesinos et al, 2009). Asimismo, observamos que los cultivos de MON y LGC-V tendían a crecer en una sola dirección, ordenadamente, en forma contraria a los cultivos de LGC-IM, los cuales presentaron un patrón de crecimiento desordenado sin una dirección específica.

3.2 Determinación del inmunofenotipo

Para corroborar que las células que se obtuvieron además de tener la morfología, expresaban los marcadores propios de las CTM, se evaluó el inmunofenotipo de las células mediante citometría de flujo. Esto se hizo en los tres grupos de estudio: MON (n=13), LGC-V (n=12) y LGC-IM (n=14). Analizamos los siguientes marcadores: CD45, CD14, CD31, CD105, CD90, CD73, CD13, HLA-ABC y HLA-DR. La molécula CD45 es un marcador que se encuentra en todas las células sanguíneas excepto eritrocitos; el antígeno CD14 reconoce al receptor de lipopolisacárido (LPS) presente en las células de linaje mielomonocítico y en menor proporción en células B; CD31 fue utilizado como marcador de células endoteliales y también se expresa en monocitos, plaquetas y granulocitos. Todos estos marcadores no se encuentran en las CTM, por lo que su presencia sería

indicio de que el cultivo está contaminado con otros tipos celulares. Por su parte, CD105 (endoglina), CD90 (Thy-1) y CD73 (5'ecto-nucleotidasa) son marcadores de CTM; CD13 es una metaloproteasa que se expresa tanto en algunas células hematopoyéticas como en CTM; y por último, HLA-ABC es el antígeno mayor de histocompatibilidad tipo I que se expresa en todos los tipos celulares incluyendo las CTM y HLA-DR corresponde al antígeno mayor de histocompatibilidad tipo II que únicamente se expresa en células presentadoras de antígeno y no se espera su expresión en CTM.

Los resultados del análisis fenotípico se muestran en la Figura 3. En el panel A se muestra el tamaño y granularidad de las células. Esta gráfica nos permitió establecer la región de las células a analizar, eliminando células muertas y restos celulares. En el panel B se muestra un histograma representativo de cada tinción con los diferentes anticuerpos. Como podemos observar en el Panel B, las moléculas presentes en células hematopoyéticas y endoteliales no se expresan en los cultivos analizados. De hecho, en la Tabla 1 se muestra que menos del 2% de las CTM de los tres grupos de estudio fueron positivas para CD14, CD45, HLA-DR y CD31, lo cual indica la ausencia de macrófagos, células hematopoyéticas y células endoteliales en los cultivos. Por otra parte, en la mayoría de la población se detectó la expresión de los marcadores de CTM (Figura 3B) donde más del 85% de las CTM obtenidas expresaron niveles altos de CD105, CD90, CD73 y CD13 sin haber diferencias significativas entre los grupos. En particular, como podemos apreciar en la Tabla 1, más del 97% de la población expresó CD105 y CD73 y encontramos que la expresión de CD90 fue más heterogénea y baja, ya que alrededor del 85% de la población lo presentó. HLA-ABC también se expresó de forma homogénea y en niveles altos en las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM.

Estos datos correlacionan con lo publicado anteriormente (Jootar et al, 2006; Zhao et al, 2006), en donde se reportó que las CTM de pacientes con LGC presentan los marcadores de CTM y que lo hacen de forma similar a la MON. Sin embargo, en un trabajo se reportó que las CTM de LGC presentaron una diferencia sutil en la expresión CD105 y HLA-ABC, siendo menor en las células de LGC sin tratamiento (Carrara et al, 2007). Esta diferencia no fue observada en

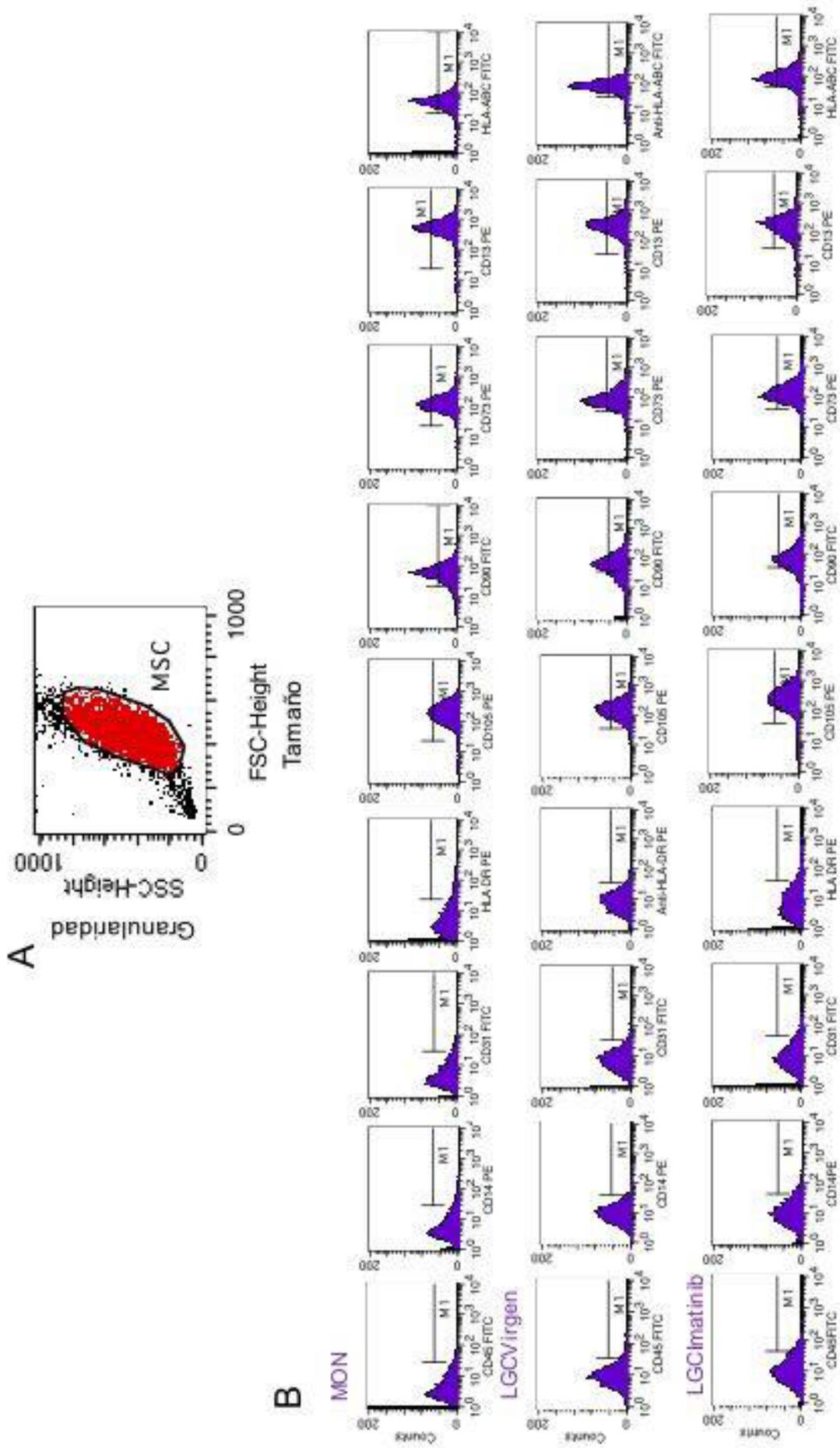


Figura 3. Inmunofenotipo de las CTM de los tres grupos de estudio. A, Gráfica representativa del tamaño y granularidad de las CTM. La región marcada en rojo selecciona a las CTM y excluye a las células muertas. B, Histogramas representativos de los anticuerpos analizados. La región M1 se estableció como positiva a partir de los isotipos correspondientes utilizados como control (datos no mostrados).

Marcador	MON (n=13)	LGC VIRGEN (n=12)	LGC IMATINIB (n=14)
CD45	0.3 ± 0.3	0.28 ± 0.19	0.70 ± 0.74
CD14	1.5 ± 1.8	0.81 ± 0.66	1.81 ± 1.96
CD31	0.2 ± 0.2	0.12 ± 0.21	0.25 ± 0.26
HLA-DR	0.8 ± 1.3	1.48 ± 3.38	0.66 ± 0.94
CD105	96.9 ± 2.0	98.05 ± 1.38	98.48 ± 0.72
CD90	83.9 ± 16.7	85.84 ± 13.51	85.63 ± 15.93
CD73	98.1 ± 1.4	96.33 ± 4.64	97.85 ± 2.63
CD13	97.2 ± 2.3	98.64 ± 0.46	97.14 ± 4.84
HLA-ABC	89.0 ± 9.1	81.57 ± 31.96	93.76 ± 6.63

Tabla 1. Porcentaje de expresión de los antígenos analizados para determinar el inmunofenotipo de las CTM. Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar.

nuestro estudio, lo cual podría deberse a que en el trabajo referido sólo se analizaron tres muestras para la expresión de HLA-ABC y una para la molécula CD105, lo cual no es representativo de la población, por lo que el dato es incompleto. Por otro lado, de forma importante, en nuestro análisis utilizando un número de muestras mayor, encontramos que las CTM de LGC-IM presentaron las mismas características que las de MON y LGC-V, lo cual no había sido reportado con anterioridad (Tabla 1).

3.3 Evaluación del potencial de diferenciación

Además de la presencia y expresión de ciertos marcadores, las CTM deben cumplir con otras características para corroborar su identidad, de acuerdo a lo establecido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici et al, 2006). Entre éstas, se encuentra la capacidad de diferenciarse a condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Por esta razón, como parte de la caracterización de las CTM obtenidas de los tres grupos, analizamos su potencial de diferenciación a estos linajes celulares.

La capacidad condrogénica de las CTM fue determinada después de haberlas inducido con medio de diferenciación durante 4 semanas en un sistema de cultivo de alta densidad (MON, n=6; LGC-V, n=8; LGC-IM, n=8). El potencial condrogénico se evaluó como la capacidad de formar una micromasa en cultivo y producir mucopolisacáridos. La micromasa se observó como un agregado compacto de células visible macroscópicamente, la cual posteriormente fue teñida con azul alciano para evaluar la producción de mucopolisacáridos, lo cual es característico de los condrocitos. En el Panel A de la Figura 4, se muestra un corte representativo de una micromasa de MON, la cual presenta una forma circular regular y fue positiva para la tinción con azul alciano, observándose la aparición de una coloración azul. Esto indica la presencia de mucopolisacáridos y la diferenciación hacia condrocitos. Como se puede observar en el Panel B y C, las muestras de LGC-V y LGC-IM se comportaron de forma similar a las de MON. Con las observaciones realizadas, encontramos que las CTM de los tres grupos

de estudio pudieron formar la micromasa y producir mucopolisacárido de forma similar al ser inducidas, mientras que sin medio de inducción fueron incapaces de formar la micromasa (datos no mostrados).

El potencial de diferenciación hacia adipocitos fue analizado después de haber inducido a las CTM con medio de diferenciación durante una semana (MON, n=11; LGC-V, n=11; LGC-IM, n=12). Como se observa en los paneles D, E y F de la Figura 4, en los cultivos de CTM bajo inducción se observaron células con vacuolas lipídicas refringentes visibles bajo el microscopio invertido, lo cual indica la formación de adipocitos. Todas las muestras analizadas de los tres grupos de estudio fueron capaces de formar adipocitos bajo condiciones de inducción de forma similar, mientras que no se observó la acumulación lipídica en los cultivos control (datos no mostrados).

Por último, se evaluó la diferenciación de las CTM hacia linaje osteoblástico, después de haberlas inducido con medio osteogénico durante 3 semanas (MON, n=8; LGC-V, n=10; LGC-IM, n=8). Este potencial se analizó mediante la tinción citoquímica de Von Kossa que permite la identificación de depósitos de calcio (mineralización) como una coloración café en el cultivo, lo cual se relaciona con la diferenciación hacia osteoblastos. Del Panel G al I de la Figura 4 se muestran los cultivos bajo inducción y se puede observar la aparición de la coloración café, indicando que las CTM fueron capaces de formar depósitos de calcio, lo cual nos permite inferir que pudieron diferenciarse al linaje osteoblástico. Cabe mencionar, que al analizar los cultivos sin inducción, observamos la aparición de coloración café. Sin embargo, esta fue de menor intensidad a la observada en los cultivos bajo inducción osteogénica (datos no mostrados).

En congruencia con nuestras observaciones, en la literatura está reportado que las CTM de LGC son capaces de diferenciarse a linaje osteoblástico y adipocítico de forma similar a su contraparte normal (Zhao et al, 2006; Carrara et al, 2007). Sin embargo, este es el primer estudio en donde se evalúa la capacidad de diferenciación condrogénica de CTM de LGC y nuestros resultados sugieren

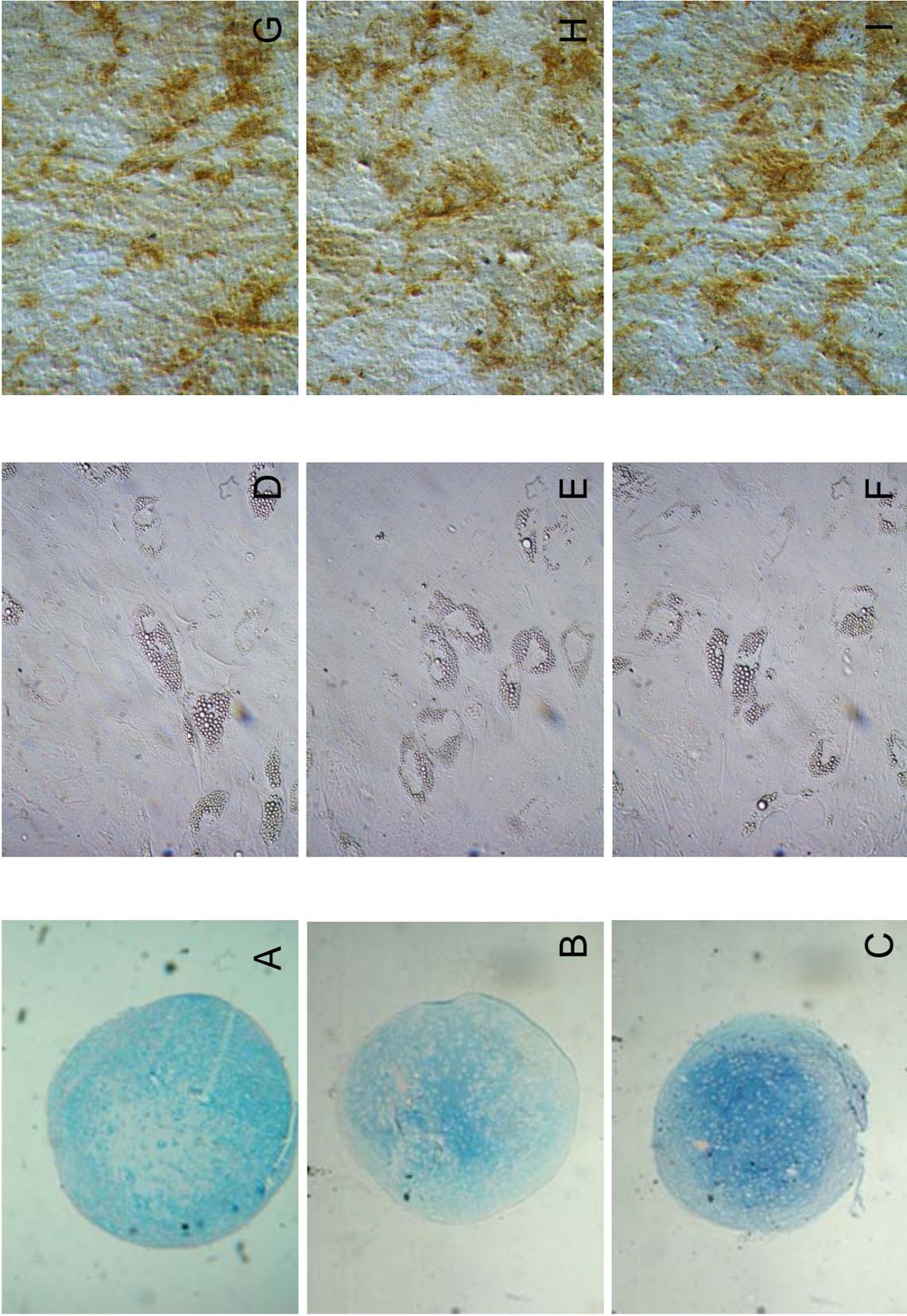


Figura 4. Potencial diferenciación de las CTM. A-C: Condrogénesis. Cortes de micromasas positivas para la tinción de azul alciano, 100X;(A) MON, (B) LGC-V, (C) LGC-IM. D-F: Adipogénesis. Microfotografías de CTM inducidas a adipocitos que se muestran como células con vacuolas lipídicas, 400X; (D) MON, (E) LGC-V, (F) LGC-IM. G-I: Osteogénesis. Cultivos inducidos a osteoblastos positivos para tinción de Von Kossa (coloración café corresponde a depósitos de calcio), 400X; (G) MON, (H) LGC-V, (I) LGC-IM

que tanto las CTM obtenidas de pacientes con LGC sin tratamiento como las obtenidas de pacientes tratados con Imatinib, son capaces de diferenciarse a este linaje celular.

Con estas evidencias, podemos decir que logramos obtener CTM puras de MON, LGC-V y LGC-IM, que cumplen con todas las características propias de este tipo celular, de acuerdo a los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular. Estos incluyen: la adherencia al plástico y presentar una morfología fibroblastoide; ser positivas para CD90, CD105, y CD73 y negativas para CD45, CD14, CD31 y HLA-DR; y por último, ser multipotenciales al poder diferenciarse a condrocitos, adipocitos y osteoblastos (Dominici et al, 2006).

4. Determinación de la presencia de BCR-ABL

Para evaluar la expresión del rearrreglo *BCR-ABL* en las CTM de LGC-V y LGC-IM, se utilizó una técnica de PCR anidado de acuerdo a la metodología de Chávez-González (2006). Las CTM utilizadas para este análisis, se obtuvieron por una técnica de selección negativa o rosetas (RosetteSep, Stem Cell Technologies), la cual permite la eliminación de macrófagos del cultivo. Esto se hizo con la finalidad de reducir al mínimo la posibilidad de tener células hematopoyéticas contaminantes, ya que la presencia de macrófagos podría generar un resultado falso positivo en la expresión de *BCR-ABL*. Se analizaron en total 4 muestras de LGC-V y 6 de LGC-IM y de todas ellas se logró obtener ARN en condiciones adecuadas para la amplificación por RT-PCR. Como control positivo de la técnica, se amplificó el gen *ABL*, cuya expresión es constitutiva tanto en las CTM como en las CTH.

En el panel A de la Figura 5, se muestra la electroforesis donde se observa el producto de la amplificación de *ABL* y la cual pudo ser amplificada en ambos tipos celulares (CTM y CTH), lo que corrobora la eficiencia de la técnica, ya que se logró amplificar el gen obteniendo una banda específica en el peso molecular esperado (450 pares de bases, pb) y con la intensidad suficiente para ser identificada.

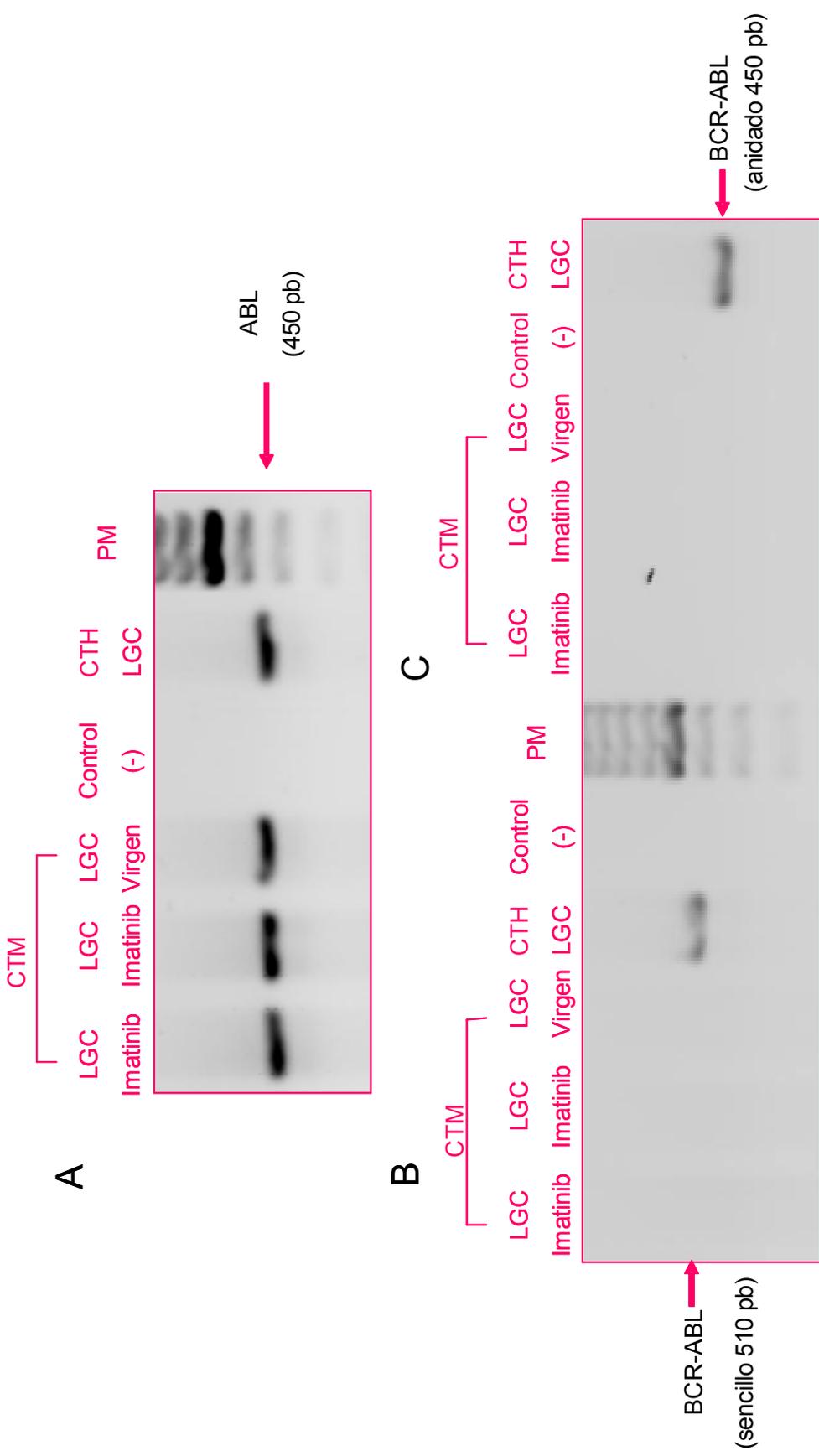


Figura 5. Determinación de la presencia del rearreglo *BCR-ABL* en CTM de pacientes con LGC. A, Electroforesis de un PCR representativo para *ABL* utilizado como control positivo de la técnica. B, Electroforesis de un PCR sencillo del rearreglo *BCR-ABL* (510pb) en células troncales mesenquimales (CTM) y hematopoyéticas (CTH) de leucemia granulocítica crónica (LGC). C, Electroforesis de un PCR anidado a partir de los productos del PCR sencillo (los primers son más internos por lo que el PM es menor: 450pb). Control (-): agua, PM: marcador de peso molecular, pb: pares de bases

En el panel B, se muestra la electroforesis de los productos del RT-PCR para *BCR-ABL* (510 pb), y se observa que, como se esperaba, las CTH de pacientes con LGC expresaron el transcrito del rearreglo *BCR-ABL*. Sin embargo, en las CTM, tanto de pacientes con LGC-V como de LGC-IM, no se detectó la presencia del mismo. Para aumentar la sensibilidad de la técnica, se realizó un PCR anidado a partir de los productos obtenidos en el primer RT-PCR. En el Panel C, se muestra una electroforesis representativa de los productos de esta segunda ronda de amplificación (450 pb), y nuevamente, se observó la amplificación de *BCR-ABL* en las CTH, mientras que en las CTM de los dos grupos no se detectó la expresión. Nuestros resultados coinciden con lo citado en la literatura en donde se reporta que las CTM de pacientes con LGC son cromosoma Filadelfia negativas, lo cual sugiere que no provienen de la clona anormal (Jootar et al, 2006; Zhao et al, 2006; Carrara et al, 2007). En el trabajo publicado por Jootar y colaboradores utilizaron hibridación *in situ* y RT-PCR para la detección del rearreglo, mientras que en los estudios de Zhao et al y Carrara et al, además realizaron análisis de cariotipo. Chávez-González reportó que mediante un RT-PCR sencillo podemos detectar *BCR-ABL* cuando en la muestra se encuentra de 1 célula leucémica en 10 células normales a 1 célula leucémica en 2000 normales. Sin embargo, cuando se utiliza un PCR anidado a partir del RT-PCR sencillo, se puede detectar desde 1 célula tumoral en 10 células normales, hasta 1 célula tumoral en 500,000 normales (Chávez-González et al, 2006). Con base en lo anterior, se decidió utilizar el PCR anidado, ya que a diferencia de las técnicas utilizadas en otros trabajos, esta metodología cuenta con una mayor sensibilidad. Esto nos permitió confirmar con mayor certeza que los trabajos anteriores, que las CTM de pacientes con LGC efectivamente son negativas para *BCR-ABL*.

5. Análisis de la frecuencia de CTM en médula ósea de pacientes con LGC

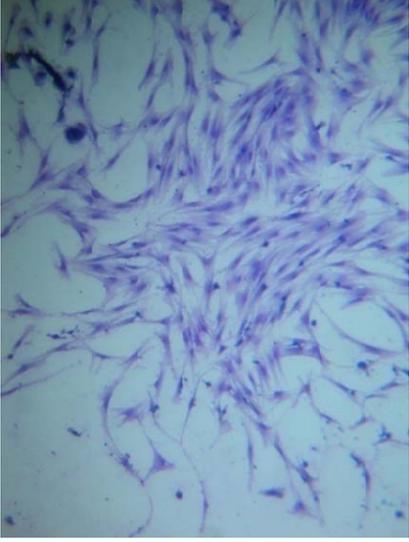
Para analizar la frecuencia de CTM en la médula ósea tanto de MON, LGC-V y LGC-IM, se utilizó la técnica de CFU-F, en la cual se cuantifica el número de colonias obtenidas por cada 150,000 CMN. En este ensayo, cada colonia

representa una CTM, estimando así su frecuencia dentro de la médula ósea. En el Panel A de la Figura 6 se muestra una microfotografía de una colonia derivada de MON, la cual se observa como un conjunto de células fibroblastoides con un centro común y crecimiento ordenado.

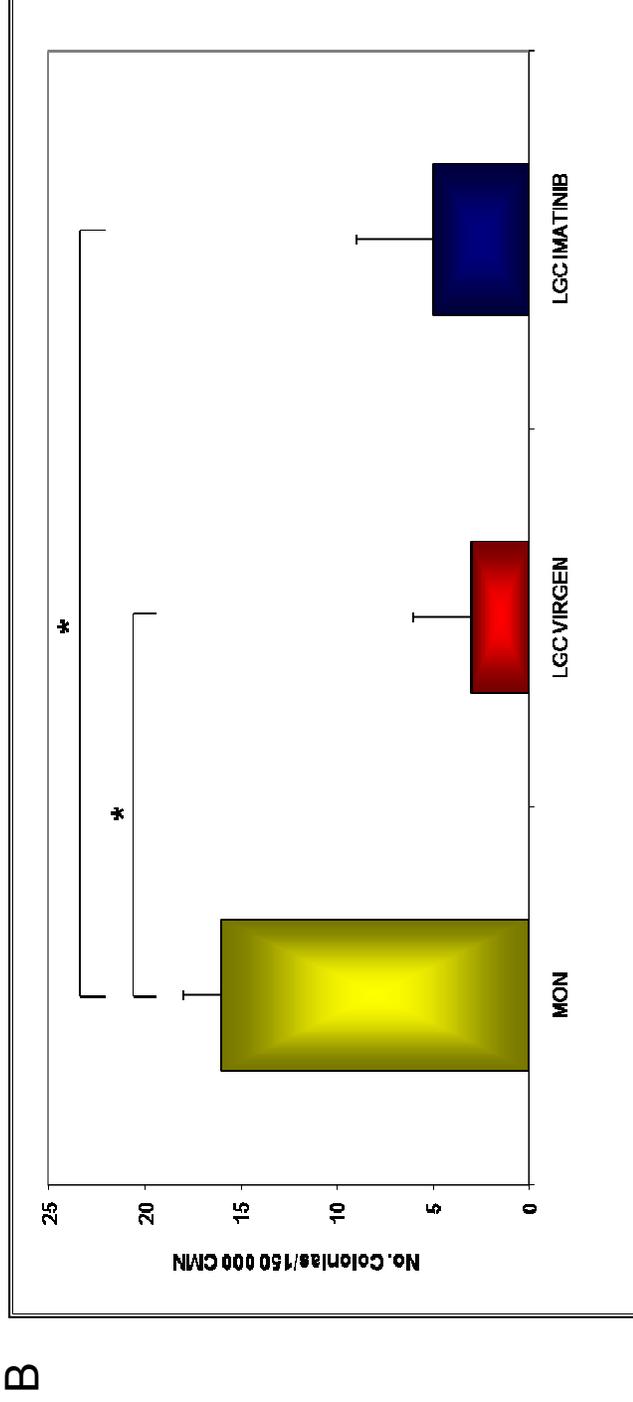
Lo primero que analizamos fue la eficiencia clonogénica, es decir, cuántas muestras de las estudiadas fueron capaces de producir colonias después de 14 días de cultivo. En las muestras de MON, el 94% de ellas generaron colonias (n=16), mientras que las muestras de LGC tanto virgen de tratamiento como tratadas con Imatinib tuvieron una eficiencia menor, siendo del 31% (n=29) y 78% (n=18), respectivamente.

Posteriormente, analizamos cuántas CFU-F se generaban por cultivo en aquellas muestras que fueron capaces de producir colonias. La frecuencia de CTM en las muestras de MON fue de 1:10,000 CMN y en las muestras de LGC-V, observamos una frecuencia menor de 1:37,500 CMN, encontrando un comportamiento similar para las muestras de LGC-IM, al ser de 1:30,000 CMN (Figura 6B). Esta medida nos permitió establecer claras diferencias en la capacidad de iniciar colonias de las CTM de los diferentes grupos estudiados.

En cuanto a las muestras de LGC-V, no esperábamos observar una disminución en la frecuencia de CTM. Para intentar explicar tanto este fenómeno como la baja eficiencia clonogénica en las muestras de LGC-V, comparamos el número de CMN que se obtuvieron de cada muestra para ver si este efecto podría deberse a un exceso de células leucémicas en la médula ósea. De hecho, como se mencionó anteriormente, de las muestras de MON obtuvimos un promedio de 9×10^6 CMN por ml de médula ósea (CMN/ml) y de las de LGC-V se obtuvieron, en promedio, 75×10^6 de CMN/ml.



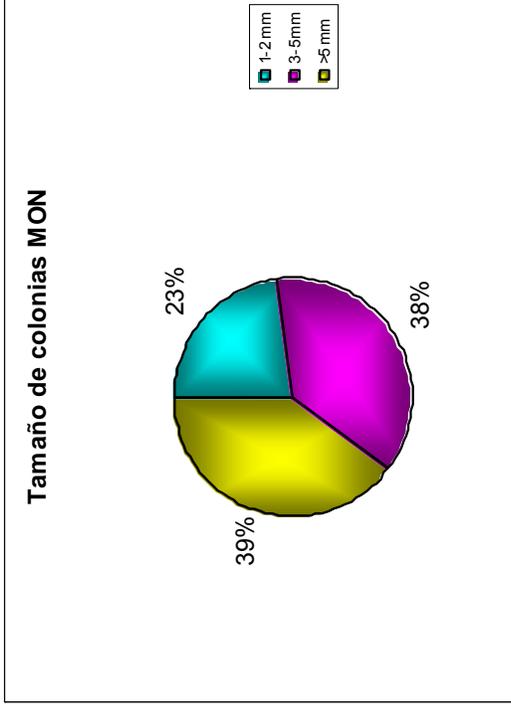
A



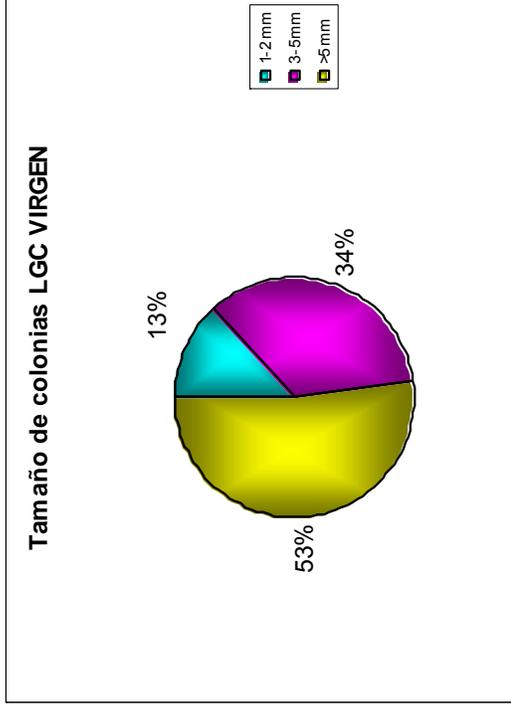
B

Figura 6. Determinación de la frecuencia de CTM en médula ósea. A, Microfotografía representativa de una CFU-F. Magnificación 40X. B, Número de CFU-F obtenidas por cada 150,000 células mononucleares (CMN). * $p < 0.05$.

A



B



C

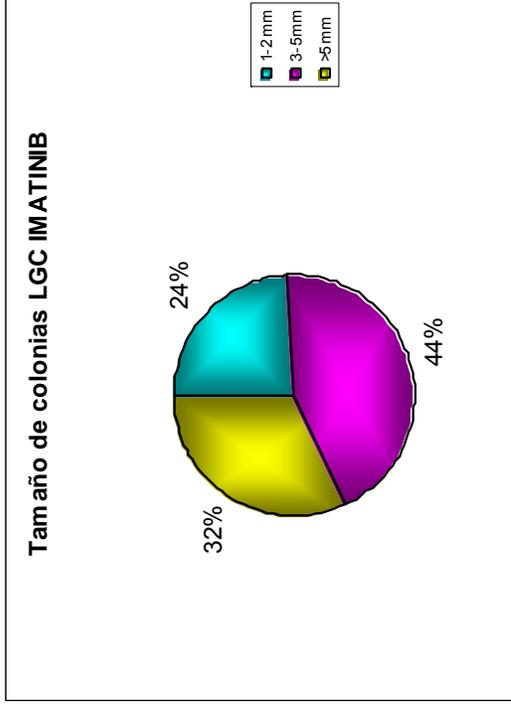


Figura 7. Análisis del tamaño de colonias obtenidas en los ensayos de CFU-F. Colonias pequeñas (1-2mm), medianas (3-5mm) y grandes (más de 5mm). Se muestran los porcentajes obtenidos en las muestras de médula ósea normal (MON), LGC sin (LGC VIRGEN) y con tratamiento con Imatinib (LGC IMATINIB).

Los resultados anteriores sugieren que la baja frecuencia de CTM observada en las muestras de LGC-V podría deberse a la presencia de células leucémicas en la fracción de CMN, esto provocaría que la gran cantidad de estas células en cada ml de médula ósea disminuyera la proporción de CTM que pudiera haber en el volumen de muestra. Sin embargo, esto también produciría una disminución en la generación de colonias hematopoyéticas. En el 2006, Chávez-González et al reportó que el número de colonias obtenidas de CMN de pacientes con LGC sin tratamiento es similar a las obtenidas de muestras de MON. Lo anterior indica que los datos obtenidos podrían deberse a que la frecuencia de CTM sí se encuentra disminuida en pacientes con LGC. De hecho, recientemente, se observó que las células leucémicas pueden promover cambios en el microambiente hematopoyético (Colmone et al, 2008), y aunque hasta el momento no se ha estudiado, es probable que influyan en las CTM.

No obstante, la disminución en la frecuencia encontrada en las muestras de LGC-IM no puede explicarse de la misma manera. En este grupo obtuvimos en promedio 1.7×10^6 CMN/ml. Esto concuerda con la leucopenia que pueden desarrollar los pacientes tratados con Imatinib, lo cual se debe a que este fármaco también tiene cierto efecto inhibitorio en células hematopoyéticas normales, ya que impide la proliferación tanto de las células leucémicas como de la población normal, aunque en una menor proporción (Bartolovic et al, 2004). Nuestros datos sugieren que la frecuencia de CTM también se encuentra disminuida en pacientes con LGC tratados con Imatinib. Además, éstos correlacionan con los datos *in vitro* obtenidos por Fierro y colaboradores. Este grupo reportó que el tratamiento con Imatinib *in vitro* disminuye el número de CFU-F, y por lo tanto de CTM, comparado con los cultivos sin tratar (Fierro et al, 2007). Nuestro estudio complementa estos resultados al encontrar una disminución en el número de CFU-F en pacientes tratados *in vivo*, lo cual no había sido reportado.

Posteriormente, evaluamos el tamaño de las colonias generadas en los ensayos de CFU-F para ver si el tratamiento con Imatinib *in vivo* afecta el potencial proliferativo *in vitro* de las colonias producidas. Las colonias fueron clasificadas en tres grupos, de acuerdo a su tamaño: pequeñas (1-2 mm²), medianas (3-5 mm²) y

grandes (>5 mm²). El 23% de las colonias de MON fueron pequeñas mientras que el 38% y el 39% fueron medianas y grandes, respectivamente (Figura 7A). En las muestras de LGC-V no se encontraron diferencias con las de MON, siendo en un 13% pequeñas, 34% medianas y 53% grandes (Figura 7B). De la misma manera, las colonias de LGC-IM se comportaron de forma similar con respecto a los otros dos grupos, ya que el 24% eran colonias pequeñas, 44% medianas y el 32% grandes (Figura 7C).

Finalmente, a pesar de que existe una disminución en la frecuencia de CTM en las muestras de LGC-V y LGC-IM, su tamaño es similar en los tres grupos. A diferencia de lo que encontramos en este estudio, se ha reportado que el tratamiento *in vitro* con Imatinib produce más colonias pequeñas en los cultivos de CTM de individuos sanos (Fitter et al, 2008), lo cual no fue observado en nuestro trabajo. Es importante resaltar que el sistema utilizado en el estudio referido fue adicionando el fármaco *in vitro*, por lo cual la discrepancia con nuestros resultados podría deberse a que durante los 14 días de cultivo, el efecto del Imatinib administrado *in vivo* se pierde con el tiempo, y es por esto que no observamos diferencias entre las muestras de MON, LGC-V y LGC-IM.

6. Análisis de la proliferación de CTM de MON, LGC-V y LGC-IM

Para determinar si el tratamiento con Imatinib *in vivo* podría alterar el crecimiento de las CTM, una vez que se cultivaran *in vitro* en ausencia del fármaco, estudiamos la proliferación de las células durante 12 días. Para ello, se sembraron 2.5×10^3 CTM/ml en la R0 y se contaron a diferentes días del cultivo (3, 6, 9 y 12 días).

En la Figura 8, se puede observar la cinética de crecimiento de las CTM de los tres grupos. La MON tiene una cinética ascendente hasta el día 12 de cultivo, lo cual indica que no se alcanzaron las condiciones de saturación, ya que las CTM presentan inhibición por contacto. A los 12 días de cultivo, el número de células se incrementó 37.1 veces (rango 14.6-45), lo cual se puede observar en la Figura 9. Por su parte, las CTM de LGC-V presentaron una cinética semejante, a pesar de

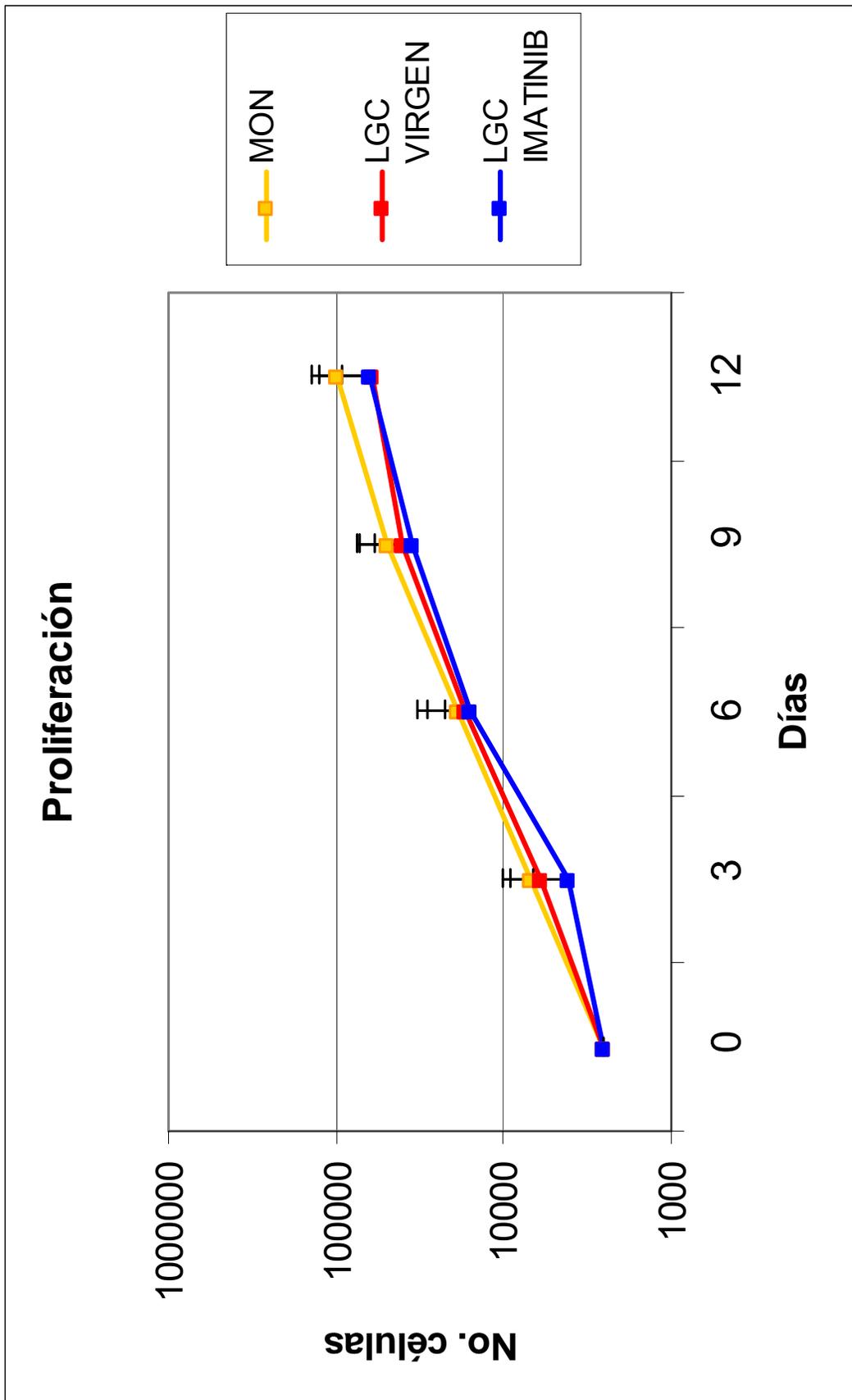


Figura 8. Cinética de proliferación de las células troncales mesenquimales durante 12 días de cultivo.

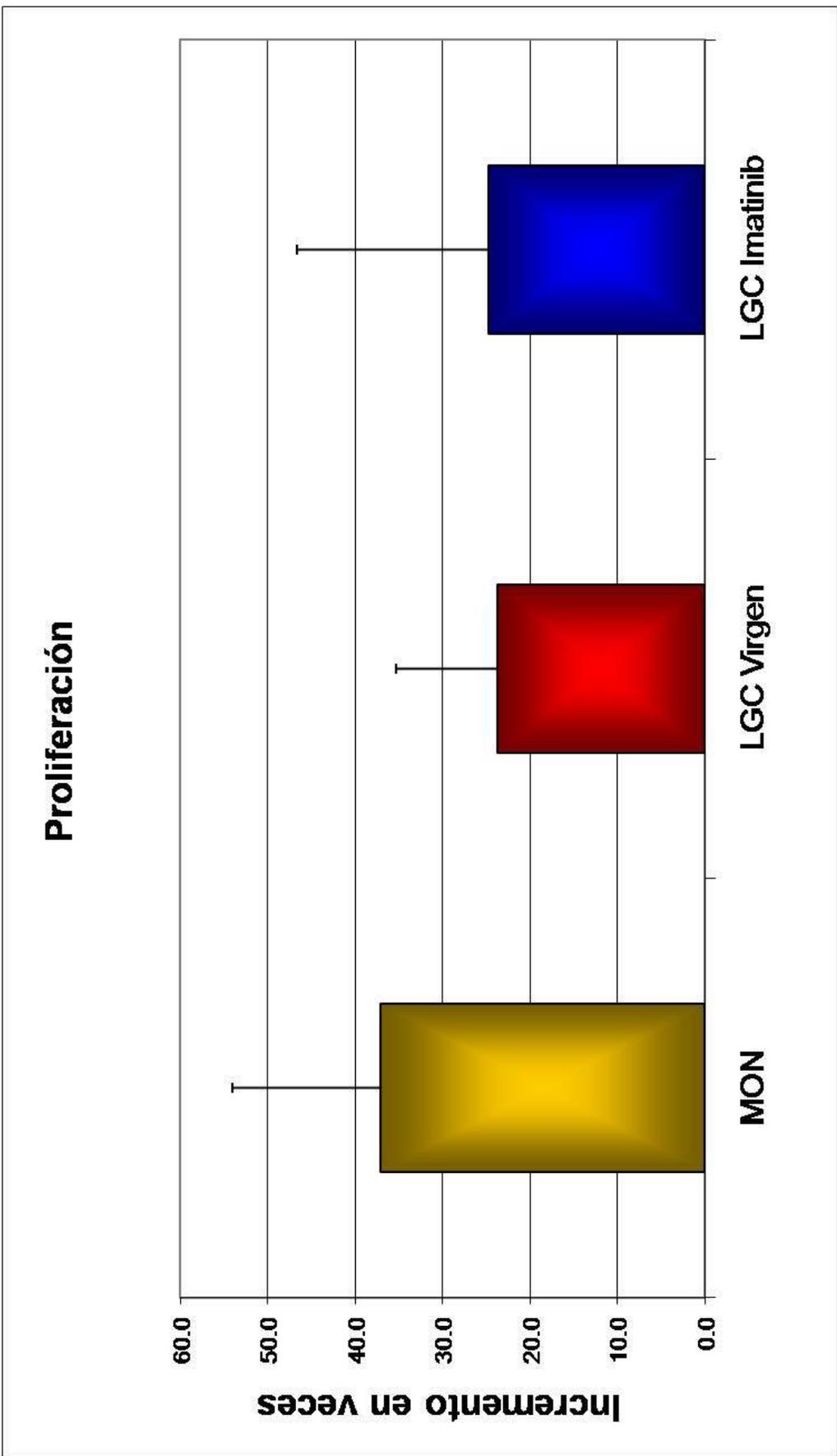


Figura 9. Proliferación en incremento en veces al día 12 de cultivo.

haber alcanzado un incremento menor (23.8 veces, rango 6.7-41), el cual no fue significativo. Finalmente, la cinética de LGC-IM tuvo un incremento celular menor a los tres días de cultivo, el cual conforme transcurrió el cultivo fue aumentando hasta alcanzar, al día 12, un incremento celular semejante al de LGC-V (24.8, rango 0.6-74.7), sin haber encontrado diferencias entre los grupos.

En la literatura está reportado que el Imatinib disminuye la proliferación de CTM *in vitro* en forma dosis dependiente (Fierro et al, 2007; Fitter et al, 2008) y que incluso en algunos casos se mantiene un retraso en la proliferación dos semanas después de haber retirado el fármaco del cultivo (Melzer et al, 2004). En estos trabajos, se observó que la disminución de la proliferación se debe a la inhibición de PDGF-R y sus vías de transducción como ERK1/2 y PI3K/AKT (Fierro et al 2007; Fitter et al, 2008).

Sin embargo estas observaciones fueron realizadas en sistemas *in vitro* donde el Imatinib era adicionado al cultivo. Es posible que tanto el tiempo de expansión que requiere nuestro modelo de estudio, como las dosis en las que se administra el fármaco a los pacientes, permita que el Imatinib que alguna vez estuvo en contacto con las células *in vivo*, se pierda conforme transcurre el cultivo, por lo cual no observamos diferencias. Esto sugiere que las CTM pueden recuperar su capacidad proliferativa una vez que se retira el fármaco.

7. Determinación de la expresión de moléculas de adhesión

Las CTM expresan ciertas moléculas de adhesión que les permiten interactuar tanto con las CTH como con otras células del microambiente medular e incluso entre ellas mismas. Por esta razón, consideramos importante evaluar si este patrón de expresión se encontraba alterado en las CTM de pacientes con LGC sin tratamiento (n=12) y tratados con Imatinib (n=14), en comparación con las de MON (n=13). Las moléculas analizadas mediante citometría de flujo fueron las siguientes: CD29 (integrina β 1), CD49b (integrina α 2), CD44 (HCAM), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), y CD166 (ALCAM).

En la Figura 10 se muestran los histogramas representativos de la expresión de las distintas moléculas de adhesión analizadas. Como observamos en la figura, de las moléculas estudiadas, la más abundante en las CTM de MON fue CD44. En la Tabla 2 encontramos el promedio del porcentaje de expresión, el cual fue de $76.3\% \pm 18.8$ de la población. Para las muestras de LGC sin tratamiento observamos un patrón similar ($72.52\% \pm 27.36\%$) y en las de LGC tratadas con Imatinib el porcentaje de expresión fue mayor, aunque no significativo ($92.09\% \pm 11.89\%$). CD44 es el receptor al ácido hialurónico presente en la matriz extracelular. Esta proteína ya ha sido identificada en las CTM de MON y LGC por otros grupos de investigación (Lee et al, 2004; Tondreau et al, 2005; Kern et al, 2006; Carrara et al, 2007). De hecho, se ha observado que CD44 es muy importante en la adhesión y migración de las CTM. Zhu y colaboradores, reportaron que la adhesión al ácido hialurónico se inhibe en presencia de anticuerpos anti-CD44, lo cual, a su vez, suprime significativamente la migración de CTM en respuesta a PDGF (Zhu et al, 2006). Carrara et al observaron que las CTM de pacientes con LGC sin tratamiento presentan una disminución en la expresión de CD44 (Carrara et al, 2007), sin embargo, nuevamente sólo se realizó en análisis en tres muestras de CTM, lo cual podría no ser representativo de la población. En forma contraria a lo referido, nosotros llevamos a cabo el análisis realizando un muestreo mayor en 12 cultivos de CTM de LGC-V y no encontramos diferencias en la expresión de CD44.

Por otra parte, en la Figura 10 también podemos observar que las moléculas CD166 y CD58 presentaron una expresión similar a la de CD44. Como se muestra en la Tabla 2, encontramos que en MON más del 65% de la población expresa, CD166 y CD58 (68.7 ± 26.3 y 65.0 ± 23.9 , respectivamente), lo cual es similar a lo que se observó en LGC-V y LGC-IM. Estas moléculas ya han sido identificadas en las CTM, por nuestro grupo (Flores-Figueroa et al, 2006) y por otros autores (Mingell et al, 2001; Thalmeier et al, 2001), sin embargo no se habían evaluado en CTM de LGC. En el presente trabajo encontramos que CD166 y CD58 se expresan en las CTM de estos pacientes, al igual que su contraparte normal, lo

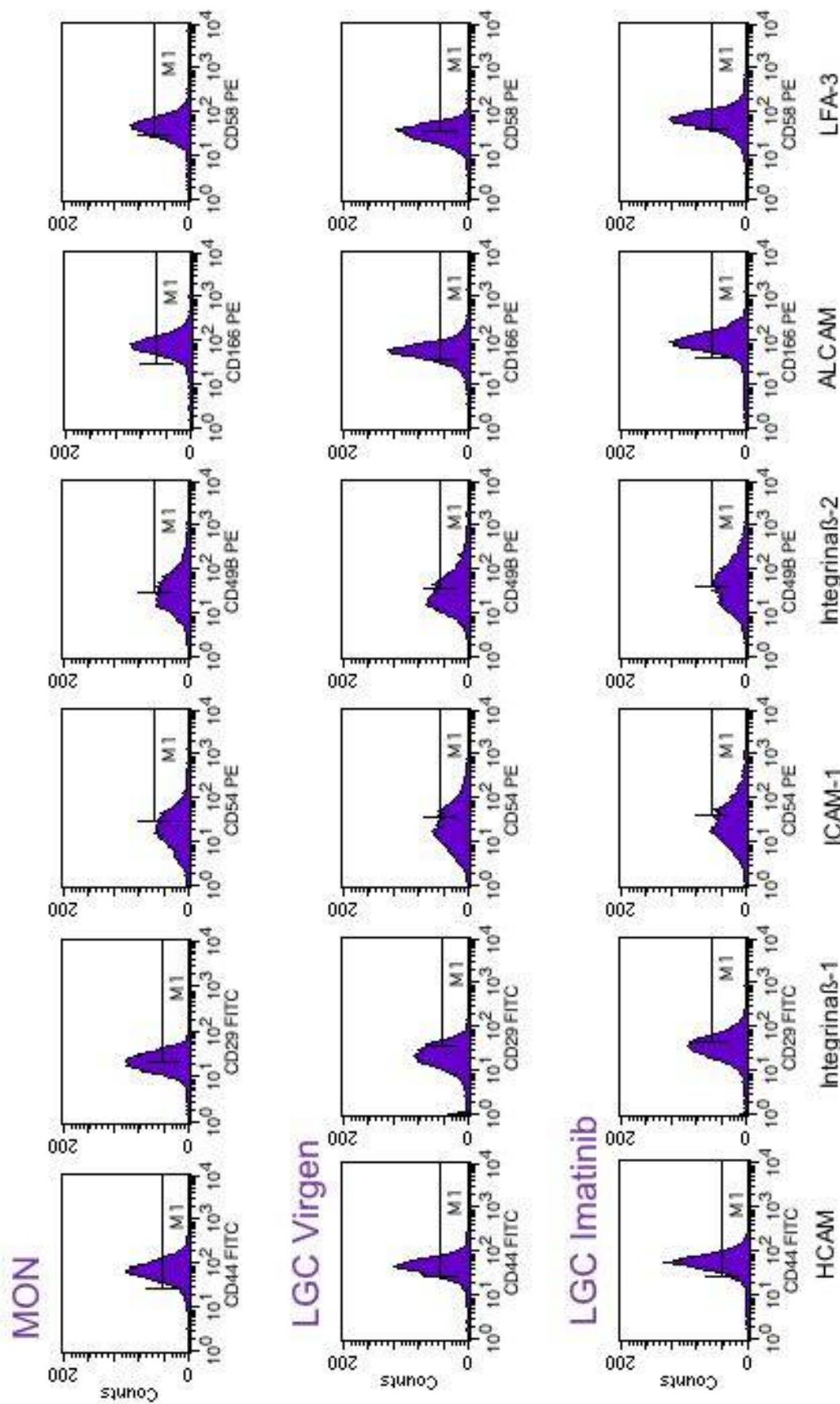


Figura 10. Expresión de moléculas de adhesión en la CTM. Histogramas representativos de los anticuerpos analizados. La región M1 se estableció como positiva a partir de los isotipos correspondientes (no mostrados)

Marcador	MON (n=13)	LGC VIRGEN (n=12)	LGC IMATINIB (n=14)
CD29	63.0 ± 33.0	49.05 ± 39.96	61.18 ± 28.18
CD54	45.5 ± 27.4	43.58 ± 21.00	42.52 ± 17.97
CD44	76.3 ± 18.8	72.52 ± 27.36	92.09 ± 11.89
CD49b	28.1 ± 23.0	24.72 ± 17.33	29.91 ± 19.18
CD166	68.7 ± 26.3	78.56 ± 23.72	84.42 ± 26.35
CD58	65.0 ± 23.9	78.34 ± 19.15	81.90 ± 20.61

Tabla 2. Porcentaje de expresión de los antígenos analizados para determinar el patrón de moléculas de adhesión de las CTM. Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar.

cual se observa tanto en las muestras de pacientes sin tratamiento como tratados con Imatinib

Además, encontramos que otras moléculas de adhesión como CD29, CD54, y CD49b se expresan de forma más heterogénea en las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM. (Figura 10 y Tabla 2). Todas estas proteínas, ya se han reportado expresadas en las CTM, al igual que otras integrinas y moléculas de adhesión y se ha visto que tienen un papel muy importante en el establecimiento de interacciones entre las CTM y su microambiente (Docheva et al, 2007). CD29 se expresó en el $63.0\% \pm 33.0\%$ de las CTM de MON y la expresión fue similar en las CTM de pacientes con LGC sin y con tratamiento. Hay algunos grupos que han reportado que la interacción entre CPH leucémicas y el estroma a través de CD29, puede ser regulada por algunos tratamientos. Aunque CD29 se expresa en forma normal en las CPH leucémicas, se ha demostrado que presentan defectos en la adhesión mediada por esta molécula, pero no se ha estudiado la expresión de CD29 en el microambiente hematopoyético de pacientes con leucemia. En nuestro estudio encontramos que las CTM tanto de LGC-V como LGC-IM expresan CD29 de forma normal. Sin embargo, se podría esperar alteraciones en la expresión de CD29 en las CTM de LGC-IM, de acuerdo a lo reportado en la literatura, ya que se ha observado que el tratamiento de células estromales de médula ósea con IFN- α corrige las alteraciones en la adhesión mediada por CD29 observadas en las células leucémicas (Konopleva et al, 2007). Nuestros datos indican que las CTM de pacientes con LGC sin tratamiento y tratados con Imatinib cultivadas *in vitro* presentan una expresión normal de CD29, pero no se puede descartar que *in vivo* sí se encuentre alterada, ya sea por la presencia de células leucémicas y/o el fármaco. Por su parte, CD54 y CD49b mostraron una expresión un poco más baja, ya que en MON el $45.5\% \pm 27.4\%$ de la población expresó CD54, mientras que CD49b se observó en el $28.1\% \pm 23.0\%$ de las células. La expresión de estos antígenos fue muy similar en los tres grupos, presentándose el mismo patrón en las muestras de LGC-V y LGC-IM al compararlas con su contraparte normal (Tabla 2). Carrara et al, estudiaron la expresión de estas moléculas tanto en CTM de MON como de LGC-V y encontraron un patrón similar al observado en nuestro

estudio (Carrara et al, 2007). Sin embargo, nuestro trabajo es el primero en reportar la expresión de estas moléculas en CTM de pacientes tratados con Imatinib, encontrando que no hay diferencias con las CTM de MON y LGC-V.

Finalmente, en conjunto, nuestros resultados muestran que las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM expresan moléculas de adhesión importantes para las CTM, de acuerdo a lo ya reportado por otros grupos. Además, encontramos que las CTM de pacientes con LGC sin y con tratamiento presentan un patrón similar de expresión al compararlas con su contraparte normal (Tabla 2). Como se mencionó anteriormente, es posible que no hayamos encontrado diferencias entre las CTM de los diferentes grupos, ya que en nuestro modelo de estudio las CTM son aisladas y cultivadas *in vitro*. Por esta razón, no debe descartarse que la expresión de las diversas moléculas de adhesión pueda estar alterada en las CTM de los pacientes, ya que podrían ser modificadas por la interacción tanto con células leucémicas como por la presencia del fármaco *in vivo*.

8. Cuantificación del potencial de diferenciación osteogénico y adipogénico

8.1 Expresión de osteocalcina en las CTM bajo inducción osteogénica

Para tener un análisis cuantitativo de la capacidad de diferenciación osteogénica y poder determinar con mayor precisión el efecto del tratamiento con Imatinib en este proceso, se determinó la expresión de osteocalcina (OCN) mediante citometría de flujo. Esta proteína es sintetizada por los osteoblastos y es utilizada como marcador de estas células (Liu et al, 2003). La cuantificación se realizó en las CTM de los tres grupos, después de haber sido inducidas a osteoblastos durante 3 semanas (MON n=5; LGC-V n=5; LGC-IM n=5).

En el panel A de la Figura 11, se muestran los histogramas representativos de cada grupo de CTM sin inducción, y de forma interesante, se puede observar que las CTM de los tres grupos expresan OCN aun sin haber sido expuestas a medio osteogénico. En el Panel C de la Figura 11 se muestra el promedio y desviación estándar del porcentaje de células positivas para osteocalcina, donde encontramos que en los cultivos de CTM de MON el $13.3\% \pm 8.4\%$ de las células sin inducción expresaron OCN, mientras que en los cultivos de LGC-V y LGC-IM

fue alrededor del $12.9\% \pm 10.7$ y $8.2\% \pm 3.2\%$, respectivamente. Los datos anteriores muestran que no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio. En la literatura, no hay reportes de cómo se expresa la OCN a nivel de proteína en las CTM, sin embargo, sí hay algunos datos a nivel de ARN mensajero. Zhao y colaboradores analizaron la capacidad osteogénica de CTM de pacientes con LGC utilizando como marcador el ARN mensajero de la OCN. En este trabajo se logró amplificar el mensajero sólo en aquellos cultivos que fueron inducidos a osteoblastos y no así en las CTM sin inducción (Zhao et al, 2006). Sin embargo, en este trabajo, las CTM sin diferenciar fueron cultivadas en presencia de PDGF, el cual, como ya se ha mencionado, es capaz de inhibir la expresión de OCN (Tokunaga et al, 2008). Este sistema de cultivo pudo haber alterado la expresión basal de esta proteína en las CTM, la cual sí fue observada en nuestro trabajo, ya que el medio de cultivo utilizado no contenía PDGF.

En el panel B de la Figura 11 se muestran los histogramas representativos las CTM de los tres grupos después de haber sido cultivadas bajo inducción osteogénica. Aquí se observa que en los cultivos de MON en condiciones osteogénicas, el $74.3\% \pm 10.9\%$ de las células fueron positivas para OCN, mientras que para LGC-V, el $65.5\% \pm 23.2\%$ expresaron la proteína después de la inducción y este porcentaje fue similar en las muestras de LGC-IM, siendo del $66.1\% \pm 30.1\%$ (Figura 11C). Estos datos indican que en los cultivos bajo condiciones osteogénicas, la expresión de osteocalcina aumentó significativamente en los tres grupos al compararlos con los cultivos control. Sin embargo no se encontraron diferencias entre las muestras bajo inducción de los tres grupos. Cabe mencionar que en los análisis de diferenciación osteogénica realizados para la caracterización de las CTM, también encontramos que las CTM sin inducción eran capaces de depositar matriz mineralizada, ya que fueron positivas para la tinción de Von Kossa. Sin embargo, la coloración café fue de menor intensidad en comparación con los cultivos bajo condiciones osteogénicas (datos no mostrados). Estas observaciones correlacionan con los datos de la expresión de OCN, donde la inducción de la diferenciación resultó en un incremento en la expresión de la proteína.

En nuestro modelo de estudio encontramos que las CTM de LGC-V se diferencian a osteoblastos de forma similar a las de MON, y lo mismo observamos para las células de LGC-IM. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado con anterioridad se podría esperar un incremento en la expresión de OCN en los cultivos de CTM de pacientes con LGC tratados con Imatinib. Se ha observado que el PDGF tiene efectos inhibitorios en la osteogénesis y que éstos pueden ser contrarrestados por el tratamiento con Imatinib (O'Sullivan et al, 2007). Esto se debe a que el PDGF estimula la proliferación de osteoprogénios y CTM a expensas de la diferenciación, inhibiendo la expresión de marcadores osteoblásticos y la deposición de matriz mineralizada (Hock y Canalis, 1994; Kubota et al, 2002; Chaudhary et al, 2004; O'Sullivan et al, 2007; Tokunaga et al, 2008)

En congruencia con lo anterior, se ha reportado que el tratamiento con Imatinib provoca alteraciones en el metabolismo mineral y un incremento en la masa ósea de pacientes tratados (Grey et al, 2006; Berman et al, 2006; Fitter et al, 2008). Además, estos efectos se deben a que el Imatinib provoca un aumento en la diferenciación y funcionalidad osteoblástica tanto *in vitro* como *in vivo* al inhibir al PDGF-R (O'Sullivan et al, 2007; Fitter et al, 2008). En la literatura, sólo hay un trabajo que reporta que el Imatinib disminuye la diferenciación osteogénica. Fierro y colaboradores reportaron que al cultivar CTM humanas bajo inducción osteogénica en presencia de Imatinib, hay una disminución en la actividad de la fosfatasa alcalina (Fierro et al, 2007). Sin embargo, esto podría deberse a un efecto indirecto, ya que el Imatinib inhibe la proliferación y al cuantificar la actividad global de la fosfatasa alcalina en un cultivo, la reducción en el número de células podría contribuir a la disminución en la actividad enzimática.

Por esta razón, se requiere de cuantificaciones más finas que permitan evaluar la expresión de marcadores en células individuales. Nuestro estudio

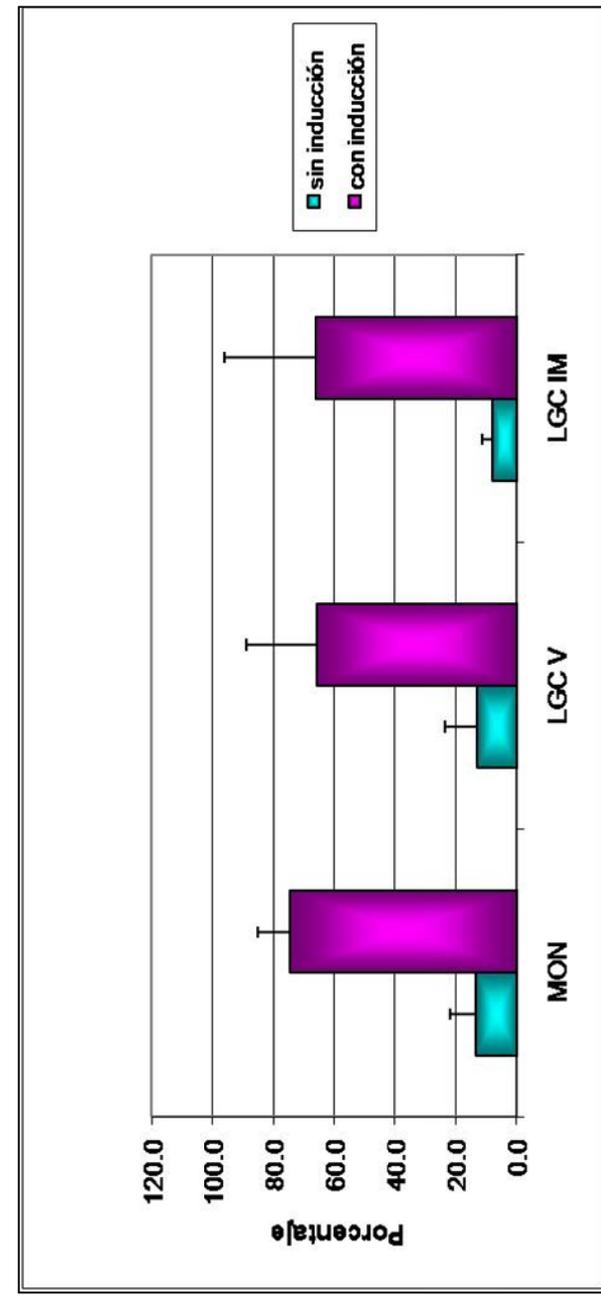
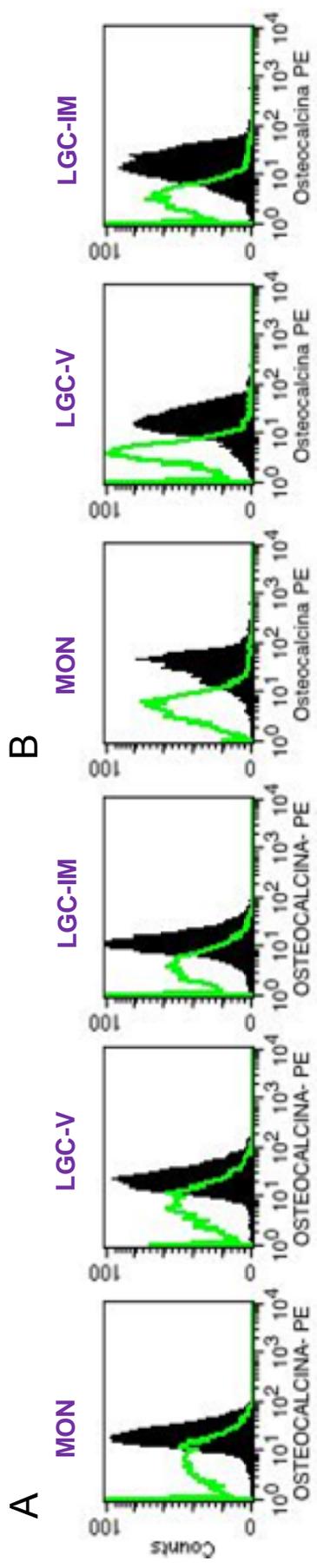


Figura 11. Expresión de osteocalcina (OCN) en cultivos de CTM. Histogramas representativos de la expresión de OCN en CTM sin (A) y con (B) inducción osteogénica. El histograma en contorno verde representa el control de isotipo, mientras que el sombreado representa el anticuerpo contra OCN. Porcentaje de expresión comparando cultivos sin y con inducción (C).

contribuye en este aspecto, ya que demostramos que la cuantificación de OCN mediante citometría de flujo, permite analizar la diferenciación osteogénica, obteniendo un porcentaje de expresión, lo cual genera un dato más específico.

Además, a pesar de que *in vitro* se ha observado una alteración en la diferenciación osteogénica de las CTM cuando se cultivan en presencia de Imatinib y que *in vivo* los pacientes presentan cambios a nivel óseo, en nuestro estudio no encontramos diferencias en la diferenciación de las CTM hacia osteoblastos. Esto podría deberse a que en nuestro modelo los análisis de diferenciación se hicieron en las CTM en cultivo y en ausencia del fármaco.

De forma interesante, encontramos que en algunos cultivos expuestos a medio osteogénico, también se indujo la formación de adipocitos. O'Sullivan y colaboradores, reportaron que en los cultivos osteogénicos tratados con Imatinib *in vitro* era posible observar células con vacuolas lipídicas, por lo que sugieren que el Imatinib además de inducir osteogénesis, es capaz de promover la adipogénesis. Sin embargo, la presencia de adipocitos en los cultivos analizados en nuestro trabajo se presentó tanto en los cultivos de MON como en los de LGC-V y LGC-IM. Por esta razón, analizamos más a detalle la diferenciación adipogénica para ver si hay un efecto o no en la generación de células adiposas.

8.2 Capacidad de diferenciación adipogénica de las CTM

En la determinación de la capacidad adipogénica de las CTM como parte de su caracterización, la metodología utilizada fue sólo cualitativa y para estudiar si esta capacidad se encontraba alterada en las CTM de pacientes con LGC sin y con tratamiento, requeríamos de un análisis más preciso. Con este fin, se estandarizó la cuantificación del potencial adipogénico utilizando la tinción de rojo oleoso, colorante que se une a grasas neutras y tiñe a los lípidos de color rojo brillante. Para esto, se tripsinizaron los cultivos después de una semana bajo inducción adipogénica. Posteriormente, se hicieron frotis con la ayuda de una citocentrífuga y se tiñeron con rojo oleoso para visualizar bajo el microscopio a las células con vacuolas lipídicas. De esta forma, se contaron 300 células en total

(negativas y positivas) en cuadrantes al azar, lo cual permitió calcular el porcentaje de adipocitos presentes en cada muestra. En el Panel A de la Figura 12 se muestra una foto representativa de un frotis de cada grupo y se aprecian células positivas para rojo oleoso, las cuales presentan vacuolas teñidas de color rojo brillante, indicando la presencia de adipocitos. Además, se pueden observar células negativas para la tinción de rojo oleoso contrateñidas con hematoxilina, las cuales no se diferenciaron y no presentaron vacuolas lipídicas.

Como se observa en el Panel B de la Figura 12, en las muestras de MON (n=5) observamos una inducción del 25.3% (rango 12%-43%), mientras que el promedio de las muestras de LGC-V (n=5) y LGC-IM (n=5) fue un poco menor, siendo del 17.4% (rango 2.4%-35.4%) y 19.5% (rango 6.8%-27.5%), respectivamente. A pesar de haber observado una tendencia a la disminución en el potencial adipogénico en las muestras de LGC, la heterogeneidad de los cultivos no permitió observar diferencias y encontramos que el potencial adipogénico de las CTM de LGC-V y LGC-IM es similar al de su contraparte normal.

Nuestros resultados concuerdan con reportes anteriores que muestran que las CTM derivadas de pacientes con LGC son capaces de producir adipocitos identificados mediante la tinción de rojo oleoso, además de expresar moléculas propias de este linaje como la lipasa de lipoproteína (Zhao et al, 2006). Sin embargo, se podría esperar observar diferencias en las CTM de LGC-IM ya que algunos estudios han reportado que este fármaco puede influir en la diferenciación adipogénica de las CTM *in vitro*. Por un lado, se ha encontrado que al cultivar CTM bajo inducción adipogénica en presencia de Imatinib, aumenta el número de células con vacuolas lipídicas (Fierro et al, 2007). Sin embargo, la forma de cuantificación utilizada por este grupo, fue sesgada, ya que sólo se contó el número de adipocitos en un cuadrante del cultivo y eso se extrapoló a todo el cultivo. Nosotros hemos observado que los adipocitos se encuentran concentrados en forma de racimos en algunas zonas del cultivo, y mientras algunas regiones

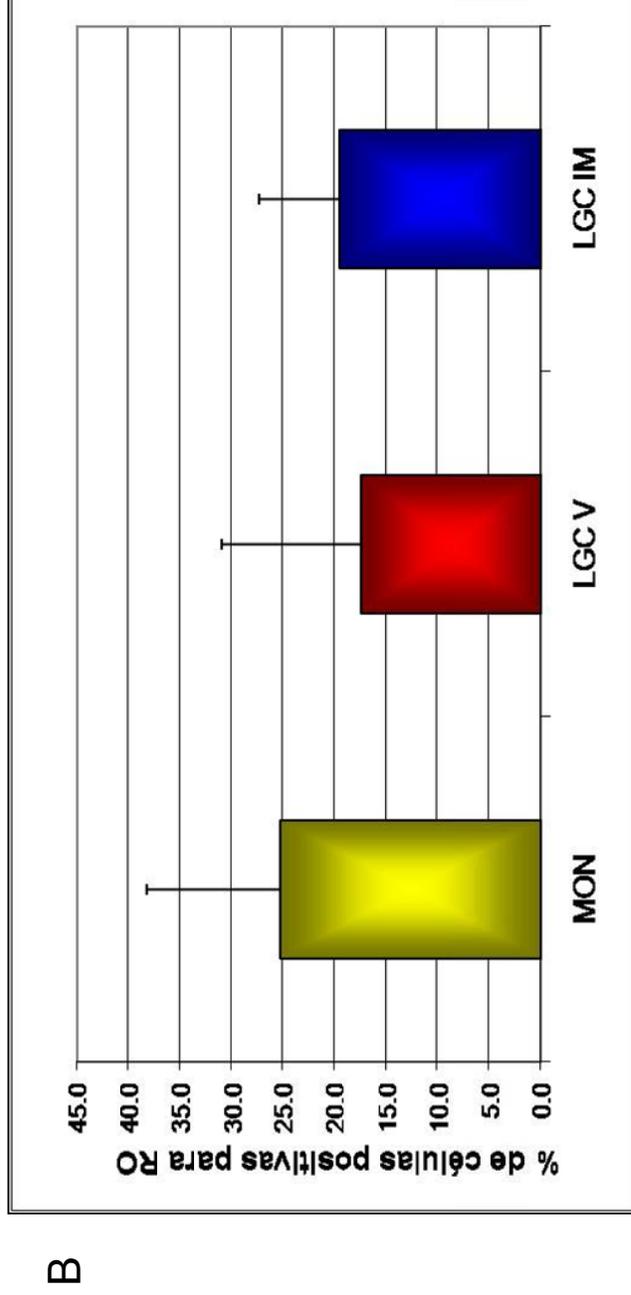
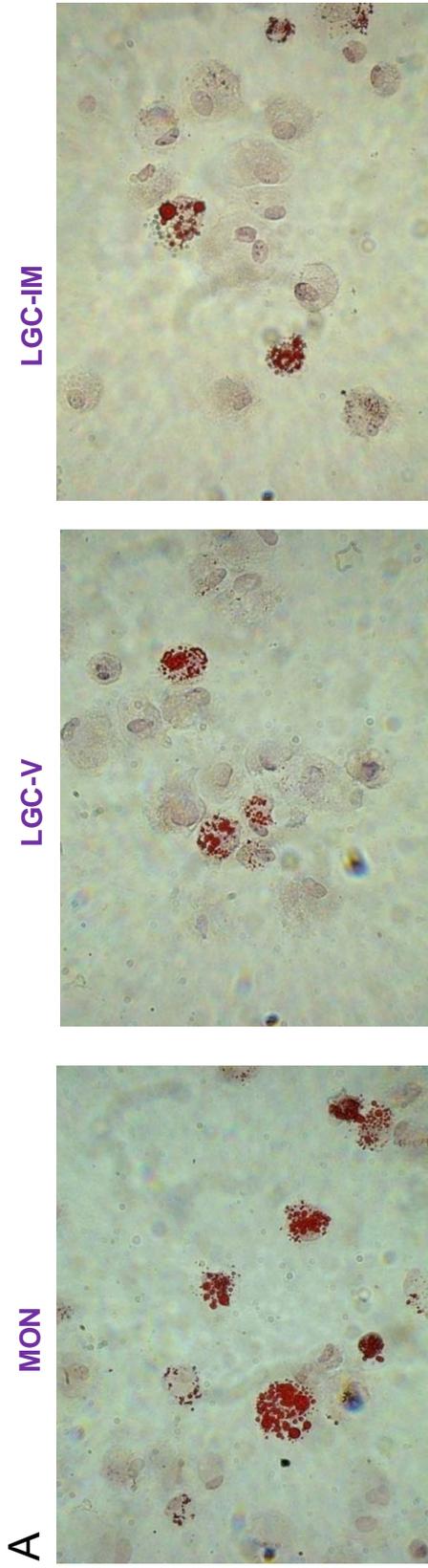


Figura 12. Capacidad de diferenciación adipogénica de las CTM. A, Microfotografías de frotis teñidos con rojo oleoso (400X). Las vacuolas lipídicas se muestran en color rojo brillante. B, Porcentaje de células positivas para la tinción con rojo oleoso,

pueden contener muchos adipocitos, otras pueden no presentarlos. Por esta razón, la metodología de análisis utilizada en nuestro trabajo, permite la cuantificación homogénea de los frotis obtenidos de los cultivos y teñidos con rojo oleoso para corroborar la diferenciación. Por otro lado, se ha reportado que el Imatinib es capaz de aumentar la expresión de marcadores de linaje adipocítico, como los factores de transcripción PPAR γ 2 y C/EBP α , así como ALBP (Fitter et al, 2008). Los cambios reportados en la literatura podrían deberse a que el PDGF es capaz de regular negativamente la diferenciación adipogénica (Vazziri et al, 1996; Riccort et al, 1997; Artemenko et al, 2005), y el Imatinib, al inhibir al receptor de esta citocina, impide su acción y contrarresta sus efectos inhibitorios sobre la adipogénesis, aumentando así la diferenciación de CTM hacia este linaje celular.

En nuestro modelo no observamos diferencias entre las muestras de pacientes sin y con tratamiento con Imatinib, a pesar de que podría esperarse el aumento en la osteogénesis y adipogénesis en las muestras de LGC-IM, de acuerdo a lo referido. Cabe mencionar que los trabajos referidos utilizan modelos en los cuales las CTM son inducidas a osteoblastos y adipocitos en presencia de Imatinib *in vitro*, mientras que en el presente estudio se analizó el potencial de las CTM derivadas de pacientes tratados con el fármaco. Es probable que el efecto del Imatinib se pierda con el tiempo, ya que en nuestro estudio el Imatinib ya no se encuentra presente durante los cultivos de inducción, lo cual sugiere que los efectos que tiene el fármaco sobre la diferenciación osteogénica y adipogénica de las CTM son reversibles. Una vez que las células son cultivadas *in vitro* en ausencia del fármaco, sus potenciales de diferenciación son similares a los de las CTM derivadas de MON y LGC-V.

9. Análisis de la respuesta de las CTM a la estimulación con PDGF

A pesar de la evidencia que apoya el efecto del Imatinib en la proliferación y diferenciación de las CTM tanto *in vitro*, como *in vivo*, nuestros resultados indican que una vez, que las CTM son tomadas del paciente y expandidas *in vitro*, el efecto del fármaco se pierde. Para poder corroborar que el PDGF-R no se encontraba comprometido o bloqueado por el Imatinib, evaluamos de forma

indirecta su estado de activación. Esto lo hicimos determinando si las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM eran capaces de responder al estímulo mitogénico mediado por PDGF. Lo anterior nos permitiría inferir si el PDGF-R se encuentra bloqueado o no por el Imatinib administrado *in vivo*.

Primero, analizamos la presencia de los receptores de citocinas, PDGF-R y c-Kit, ya que sabemos que el Imatinib puede interactuar con ambos y nos interesaba saber cómo se expresan en las CTM de los tres grupos. Como se muestra en la Figura 13, encontramos que el PDGF-R se encuentra expresado en más del 95% de las células sin haber diferencias significativas entre las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM. Esto concuerda con la literatura, ya que se ha reportado que este receptor se expresa en CTM de forma constitutiva y en niveles altos (Tokunaga et al, 2008). Además, a pesar de que el Imatinib es capaz de inhibir la actividad del PDGF-R, se ha observado que no reduce su expresión (Buchdunger et al, 2000). En cuanto, al receptor de SCF (c-Kit), lo observamos en menos del 3% de la población. Colter et al, encontraron que c-Kit se expresa sólo en una subpoblación de CTM, la cual corresponde a un subtipo de células pequeñas con gran potencial de autorenovación (Colter et al, 2001), las cuales podrían representar el 3% que nosotros encontramos como positivas para esta proteína. Lo anterior sugiere que el efecto que pudiera tener el Imatinib en las CTM podría estar mediado principalmente por la inhibición del PDGF-R, ya que la expresión de c-Kit es muy baja.

En la Figura 14 se muestra el incremento en veces en el número de CTM al final del cultivo (día 12) en ausencia o presencia de PDGF (10ng/ml). Este incremento se define como el cociente del número de células obtenidas al día 12 de cultivo y el número de células sembradas en día 0. En la gráfica observamos, que al final del cultivo, los CTM de MON sin inducción alcanzaban a incrementar su número 37.1 ± 16.9 veces, mientras que, en presencia de PDGF, lo hacían 78.2 ± 16.8 veces. Por su parte, las CTM de LGC-V también fueron estimuladas, aumentando de 23.8 ± 11.6 a 66.2 ± 21.3 veces. De forma similar, la células de

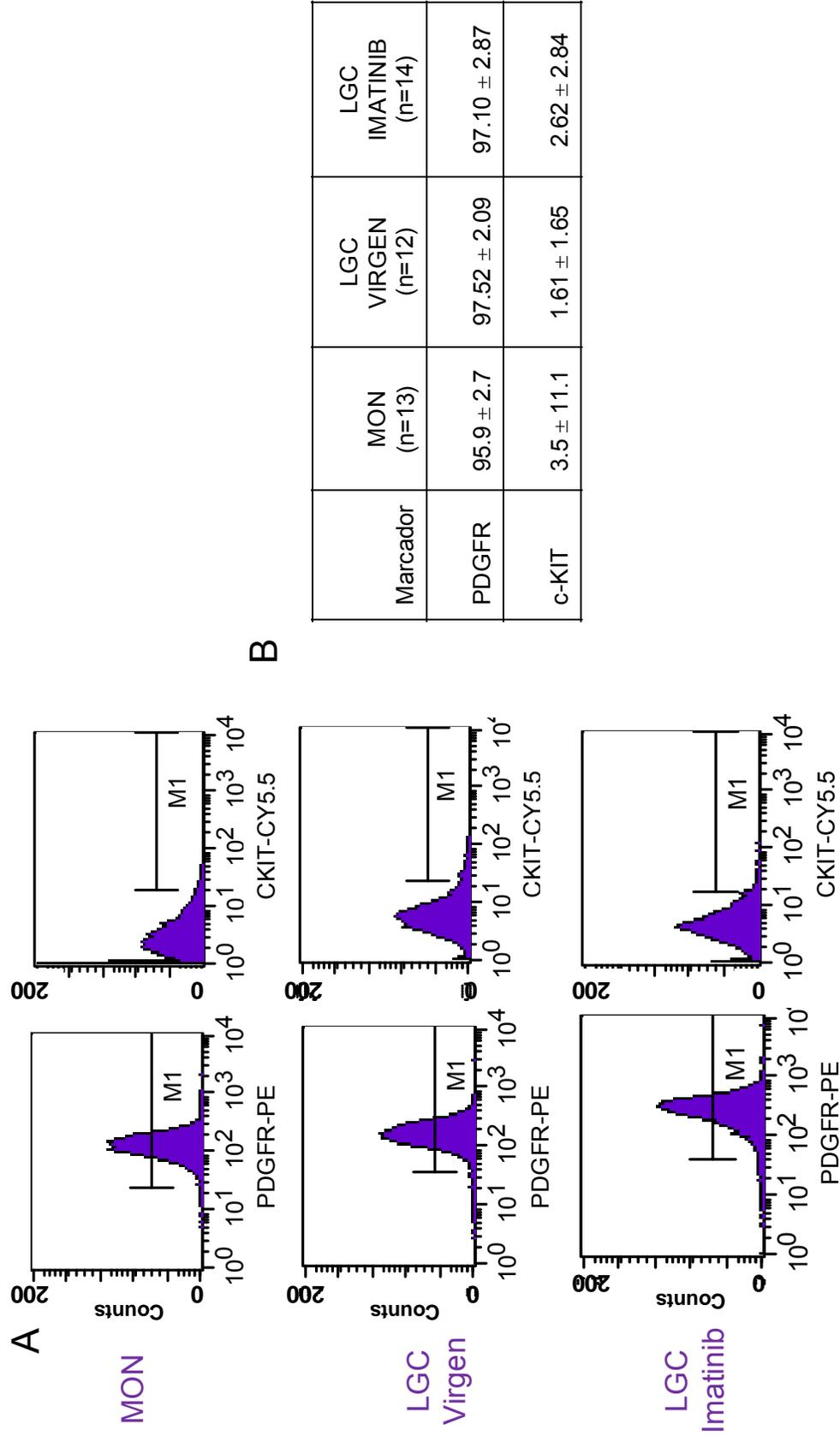


Figura 13. Expresión de PDGFR y c-Kit en las CTM. A, Histogramas representativos de los anticuerpos analizados. La región M1 se estableció como positiva a partir de los isotipos correspondientes utilizados por como control (datos no mostrados). B, Promedio y desviación estándar del porcentaje de expresión de los receptores analizados en los tres grupos de estudio.

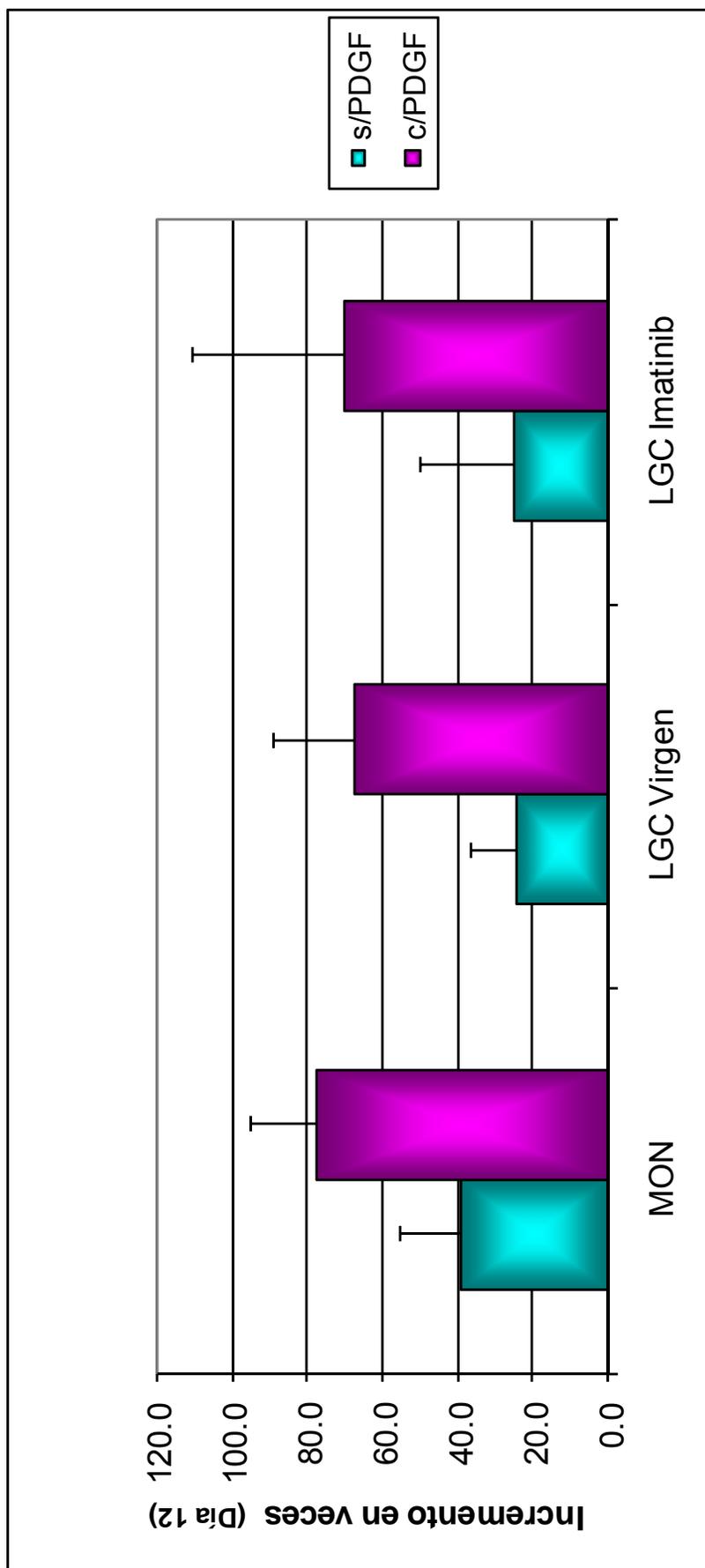


Figura 14. Respuesta proliferativa de las CTM al estímulo con PDGF. Incremento en veces del número de células después de 12 días de cultivo sin y con 10ng/ml de PDGF.

LGC-IM incrementaron su número de 24.8 ± 21.9 a 69.2 ± 36.9 veces. Los resultados concuerdan con lo reportado, ya que se ha visto que al agregar PDGF a cultivos de CTM, éste activa a su receptor y es capaz de aumentar la proliferación de las células (Tokunaga et al, 2008). Estos datos indican que las CTM de los tres grupos de estudio son capaces de responder al PDGF, aumentando su proliferación comparado con los cultivos en ausencia de esta citocina, Lo anterior confirma que en el cultivo, el PDGF-R no se encuentra inhibido por el Imatinib y las CTM son responsivas a su ligando. Los resultados de este análisis explican los datos obtenidos en nuestro estudio, ya que no observamos diferencias en los potenciales proliferativos y de diferenciación de las CTM de MON, LGC-V y LGC-IM, lo cual se debe a que el PDGF-R es funcional y no se encuentra inhibido por el Imatinib.

IX. DISCUSIÓN GENERAL

El presente trabajo es el primero en obtener y estudiar a las CTM de pacientes con LGC tratados con Imatinib y compararlas con CTM de individuos sanos y pacientes con LGC sin tratamiento. Los grupos de investigación que han estudiado a las CTM de LGC, se han enfocado en pacientes sin tratamiento. En el trabajo publicado por Jootar, se estudiaron las CTM de 11 pacientes recién diagnosticados que no habían recibido tratamiento (Jootar et al, 2006). Zhao et al, por su parte, a pesar de haber estudiado a las CTM de pacientes con LGC bajo diferentes tratamientos, los analizaron como un solo grupo experimental (Zhao et al, 2006). En este estudio, se trabajó con 8 pacientes sin tratamiento, 7 bajo tratamiento con hidroxiurea, 3 pacientes que recibieron este fármaco antes del estudio y 2 pacientes que recibieron IFN- α al menos 3 meses antes de realizarlo. Ambos reportes concuerdan con los datos obtenidos en nuestro estudio, donde encontramos que las CTM de pacientes con LGC sin tratamiento tienen un inmunofenotipo normal y mantienen su multipotencialidad, al igual que las CTM de MON.

Además, a través de una técnica altamente sensible, corroboramos que éstas carecen del rearrreglo *BCR-ABL* presente en las células hematopoyéticas de estos pacientes. A diferencia de otras enfermedades hematopoyéticas (síndromes mielodisplásicos, mieloma múltiple y leucemia mieloide aguda) donde se ha observado que las CTM y el microambiente se encuentran alteradas aún en condiciones *in vitro* (Wallace et al, 2001; Flores-Figueroa et al, 2005; Arnulf et al, 2007; Blau et al, 2007; Garderet et al, 2007; Flores-Figueroa et al, 2008), las CTM de LGC presentan características normales en cultivo. Sin embargo, no se debe descartar que *in vivo*, sí puedan ser modificadas, ya que recientemente se encontró que las células hematopoyéticas leucémicas pueden provocar cambios en el microambiente y alterar el comportamiento de células normales (Colmone et al, 2008). De acuerdo a esto, cuando analizamos la frecuencia de CTM en la médula ósea encontramos que en los pacientes con LGC la frecuencia de CTM en médula ósea se encuentra disminuida al compararla con su contraparte normal. Esto es interesante ya que, esta reducción podría deberse a la interacción entre

células leucémicas y CTM *in vivo*, la cual podría alterar el número de CTM en la médula ósea. Los datos obtenidos podrían sugerir que la frecuencia de CTM se encuentra disminuida en pacientes con LGC, sin embargo se requieren más estudios para establecer las causas de esta reducción.

Finalmente, comparamos a las CTM de MON y LGC-V con las de LGC-IM, y encontramos que estas últimas tienen un inmunofenotipo normal y que no presentan el rearrreglo *BCR-ABL*, al igual que las de LGC-V, lo cual no había sido reportado con anterioridad.

Asimismo, encontramos que la frecuencia de CTM en pacientes con LGC tratados con Imatinib se encuentra disminuida, de la misma forma a lo observado en las muestras de LGC-V. Ya que en estas muestras no se esperarían cambios en las poblaciones celulares dentro de la fracción de CMN, esta reducción podría deberse a que el Imatinib puede inhibir la proliferación de las CTM *in vivo*, de forma similar a lo que se ha observado *in vitro* (Fierro et al, 2007; Fitter et al, 2008), lo cual provocaría que su proporción dentro de la médula ósea se reduzca durante el tratamiento. Además, como mencionamos, estos pacientes aún presentan células hematopoyéticas malignas, por lo que también podrían influir en las CTM. Este es el primer reporte que hay respecto al efecto del Imatinib *in vivo* en la frecuencia de CTM.

Por otra parte, observamos que los potenciales de proliferación y diferenciación *in vitro* no se encuentran alterados en las CTM de paciente tratados con Imatinib. En nuestros análisis de proliferación, las CTM de LGC-IM mostraron una capacidad proliferativa similar a las de MON y LGC-V. Por otro lado, para los estudios de diferenciación osteogénica y adipogénica, se utilizaron análisis más cuantitativos, mediante los cuales encontramos que los potenciales de las CTM de LGC-IM son similares a los de MON y LGC-V.

Como se ha mencionado, estudios *in vitro* han demostrado que el Imatinib puede modificar la proliferación y diferenciación de las CTM al ser cultivadas en presencia del fármaco (O'Sullivan, 2007; Fierro et al, 2007; Fitter et al, 2008). Además, este efecto también se ha observado *in vivo*, ya que los pacientes tratados con Imatinib presentan alteraciones en el metabolismo mineral y un

incremento en la masa ósea (Grey et al, 2006; Berman et al, 2006, Fitter et al, 2008). En nuestro estudio, no observamos diferencias en los resultados obtenidos de los análisis de proliferación y diferenciación de las CTM. Esto probablemente se deba a que en nuestro modelo, los análisis se llevaron a cabo en ausencia del fármaco, ya que el objetivo principal de nuestro estudio fue determinar si el tratamiento con Imatinib administrado en los pacientes con LGC era capaz de alterar y sensibilizar a las CTM, de forma que modificara su potencial proliferativo y de diferenciación, una vez aisladas y puestas en cultivo. Se ha observado que las CTM son altamente sensibles a los tratamientos basados en quimioterapia y radiación y sufren alteraciones a largo plazo (Galotto et al, 1999; Banfi et al, 2001; Ben-Ishay y Barak, 2001). Las CTM de pacientes con LGC con tratamiento con Imatinib analizadas en nuestro trabajo, no fueron expuestas al fármaco durante el cultivo, lo cual nos permitió determinar si el efecto que pudiera tener *in vivo* es o no reversible.

Con los resultados obtenidos, podemos decir que, efectivamente, el efecto del Imatinib es reversible en cuanto a los parámetros evaluados, ya que las CTM de LGC-IM presentaron un potencial de proliferación y diferenciación parecido a las CTM de MON y LGC-V. Además, al encontrar que las CTM de pacientes tratados con Imatinib eran capaces de responder al estímulo mitogénico de PDGF, se confirmó que el fármaco ya no se encuentra en las células inactivando al receptor de esta citocina, corroborando de forma indirecta, que la inhibición es reversible. En un trabajo publicado por nuestro grupo, se encontró que cuando se aíslan células troncales hematopoyéticas de pacientes con LGC tratados con Imatinib, no es posible detectar el rearrreglo *BCR-ABL*, debido a que el número de células leucémicas en la muestra es muy pequeño. Sin embargo, conforme se mantienen en cultivo, la clona leucémica aparece y es posible amplificar el rearrreglo mediante PCR anidado (Chávez-González et al, 2006). Esto sugiere, que al principio del cultivo, la clona leucémica se encuentra inhibida por el Imatinib, pero con el paso del tiempo en cultivo, el fármaco pierde su efecto y la clona reaparece. Lo anterior concuerda con lo que nosotros observamos en las CTM de estos pacientes, y confirma que el efecto del Imatinib es reversible, tanto en las células

hematopoyéticas como mesenquimales, ya que ambas son capaces de sobreponerse a la inhibición mediada por este fármaco.

Los resultados de nuestro estudio tienen una implicación clínica muy importante. Como ya se ha mencionado, el potencial de diferenciación de las CTM hace que éstas sean una fuente atractiva de células para terapia celular. El hecho de que las CTM de los pacientes de LGC sin y con tratamiento con Imatinib, tengan la capacidad de diferenciarse a condrocitos, adipocitos y osteoblastos, hace que estas células puedan ser utilizadas para terapia celular. Además, el que las CTM de LGC proliferen y se expandan de la misma forma que las derivadas de individuos sanos, permitiría que los pacientes con LGC reciban un trasplante de su propias CTM y sean co-infundidas con células hematopoyéticas alogénicas, lo cual podría incrementar el injerto de estas últimas. Por otra parte, aunque ya se ha observado que las CTM de LGC tienen la capacidad de suprimir la actividad de linfocitos T (Zhao et al, 2008), aún no se sabe si las CTM de LGC-IM se comportan de la misma manera. Si se estudia la capacidad que tienen las CTM de estos pacientes para regular la respuesta inmune y tratar la enfermedad de injerto contra hospedero, también podrían ser utilizadas con este fin, mejorando el éxito del trasplante de médula ósea. Finalmente, todo lo anterior podría contribuir a aumentar la eficiencia y las posibilidades de tratamiento de estos pacientes.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo a los datos obtenidos podemos afirmar que, a pesar de que la frecuencia de las CTM en la médula ósea de pacientes con LGC sin tratamiento se encuentra disminuida, éstas tienen características normales *in vitro*, ya que su inmunofenotipo y su potencial proliferativo y de diferenciación son similares al los de las CTM de médula ósea de individuos sanos. De la misma forma, aunque la frecuencia de CTM en la médula ósea de pacientes con LGC tratados con Imatinib también se encuentra reducida, los patrones de expresión y la capacidad proliferativa y de diferenciación en cultivo son similares a los de las CTM de LGC sin tratamiento y de médula ósea normal. Lo anterior indica que la alteración provocada por el posible efecto de las células leucémicas y/o el tratamiento con Imatinib es reversible, permitiendo que las CTM de pacientes con LGC sin tratamiento y tratados con el fármaco presenten características normales *in vitro*.

XI. PERSPECTIVAS

Es importante hacer énfasis en que los parámetros analizados para evaluar la funcionalidad de las CTM no fueron exhaustivos, por lo que será necesario estudiar otros aspectos.

En cuanto a lo observado en el análisis morfológico, sería interesante analizar si las células con morfología neural observadas en los cultivos expresan marcadores neurales y si hay diferencias en esta expresión entre los diferentes subtipos morfológicos encontrados. Se requiere hacer más estudios para caracterizar con mayor profundidad a los diferentes tipos celulares identificados en nuestro trabajo y realizar ensayos funcionales para ver si son distintos entre ellos.

Sabemos que en el desarrollo y progresión de la LGC están implicadas muchas alteraciones que llevan a una adhesión celular aberrante y una desregulación de la hematopoyesis. A pesar de que, las CTM de LGC estudiadas en nuestro trabajo presentaron un patrón de moléculas de adhesión similar al de MON, sería importante evaluar la capacidad que tienen estas células para interactuar con células hematopoyéticas tanto normales como leucémicas. Además, se podría estudiar la producción de citocinas y moléculas de matriz

extracelular, así como la capacidad de sostener la hematopoyesis *in vitro*. Asimismo, como ya se ha observado que las células leucémicas pueden influir en el microambiente, sería interesante estudiar si la interacción con células malignas altera las características y funciones de las CTM.

Al observar que las CTM de pacientes con LGC tratados con Imatinib responden a PDGF, inferimos que el receptor no se encuentra inhibido por el fármaco y es capaz de ejercer sus funciones. Sin embargo, para corroborar lo anterior, se deben realizar más estudios, en los que se determine de forma más directa el estado de activación del receptor, lo cual podría evaluarse mediante ensayos de fosforilación y análisis de las vías de transducción activadas por el PDGF-R.

Finalmente, en cuanto al posible uso de estas células para terapia celular. En este trabajo, determinamos cuantitativamente que las CTM de LGC sin y con tratamiento pueden diferenciarse a osteoblastos y adipocitos en forma similar a las de MON. No obstante, el análisis de la diferenciación condrogénica fue cualitativo, por lo que deberán hacerse más estudios que permitan establecer de forma más precisa si esta capacidad se encuentra alterada. Además, se podría estudiar el potencial que tienen estas células para inhibir la activación de linfocitos T y de esta manera regular la respuesta inmunológica para ser utilizadas en el tratamiento de enfermedad de injerto contra hospedero.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abboud CN, Lichtman MA. Structure of the bone marrow and the hematopoietic microenvironment. Hematology, Beutler E. Williams. Capítulo 4, sexta edición. Mc Graw Hill.
2. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. (2000) Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*. 95:3620-3627
3. Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugal M, Kishi J, Uehara H, Izumi K, Sone S. (2005) Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 171:1279-1285
4. Appel S, Balbanov S, Brümmendorf TH, Brossart P. (2005) Effects of Imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. *Stem Cells*. 23:1082-1088.
5. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K Ito K, Koh GY, Suda T. (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 118:149–161.
6. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, Larghero J. (2007) Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia*. 21:158-163.
7. Artemenko Y, Gagnon A, Aubin D, Sorisky A. (2005) Anti-adipogenic effect of PDGF is reversed by PKC inhibition. *J Cell Physiol*. 204:646–653
8. Asahara T, Isner JM. (2004) Endothelial progenitor cells. *Stem Cells Handbook*, Sell S. Capítulo 19. Humana Press.
9. Ashton BA, Phil B, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. (1980) Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*. 151:294-307
10. Awaya N, Rupert K, Bryant E, Torok-Storb B. (2002) Failure of adult marrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 30:937-942.

11. Banfi A, Bianchi G, Galotto M, Cancedda R, Quarto R. (2001) Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. *Leuk Lymph.* 42:863-870.
12. Barry F, Boynton R, Haynesworth S, Murphy J, Zaia J. (1999) The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 265:134-139
13. Bartolovic K, Balabanov S, Hartmann U, Komor M, Boehmler AM, Bühring HJ, Möhle R, Hoelzer D, Kanz L, Hofmann WK, Brümmendorf TH. (2004) Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro. *Blood.* 103:523–529.
14. Beham-Schmid C, Apfelbeck U, Sill H, Tsybrovsky O, Höfler G, Haas OA, Linkesch W. (2002) Treatment of chronic myelogenous leucemia with the tyrosine kinase inhibitor STI571 results in marked regression of bone marrow fibrosis. *Blood* 99:381-383
15. Ben-Ishay Z, Barak V. (2001) Bone marrow stromal dysfunction in mice administered cytosine arabinoside. *Eur J Haematol.* 66: 230–237.
16. Bennaceur-Griscelli A, Pondarré C, Schiavon V, Vainchenker W, Coulombel L. (2001) Stromal cells retard the differentiation of CD34(+)CD38(low/neg) human primitive progenitors exposed to cytokines independent of their mitotic history. *Blood.* 97:435-441
17. Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W. (1996) A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol.* 16:1170–1180
18. Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, Demarquay C, Mazurier C, Fouillard L, Bouchet S, Bertho JM, Gourmelon P, Aigueperse J, Charbord P, Gorin NC, Thierry D, Lopez M. (2004) Homing of in vitro expanding STRO-1- or STRO-1+ human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34+ cell engraftment. *Blood.* 103:3313-3319
19. Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. (1995) Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science.* 267:104-108

20. Berman E, Nicolaides M, Maki RG, Fleisher M, Chanel S, Scheu K, Wilson BA, Heller G, Sauter NP. (2006) Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N Eng J Med.* 354:2006-2013.
21. Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, Blazar BR, Verfaillie CM. (1995) Abnormal Function of the Bone Marrow Microenvironment in Chronic Myelogenous Leukemia: Role of Malignant Stromal Macrophages. *Blood.* 85:3636-3645.
22. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. (2008) Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2:313-319.
23. Blau O, Hofmann WK, Baldus CD, Thiel G, Serbent V, Schümann E, Thiel E, Blau IW. (2007) Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol.* 35:221-229.
24. Bobis S, Jarocha D, Majka M. (2006) Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 44:215-230.
25. Bock TA. (2007) Assay systems for hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells.* 15:185-195.
26. Bonnet D. (2002) Haematopoietic stem cells. *J Pathol.* 197: 430-440.
27. Bron D, Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Portier C, Delforge A. (2004) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation.* 72:319-26
28. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Regenass U, and Lydon NB. (1995) Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:2558–2562.
29. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, and Lydon NB. (1996) Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56:100–104.
30. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB. (2000) Abl protein-tyrosine kinase inhibitor sti571 inhibits in vitro signal

- transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 295:139–145.
31. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 425: 841–846.
 32. Campbell JJ, Butcher EC. (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol.* 12: 336–341.
 33. Caplan AI, Dennis JE. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 98:1076-1084.
 34. Carlo-Stella C, Tabilio A, Regazzi E, Garau D, La Tagliata R, Trasarti S, Andrizzi C, Vignetti M, Meloni G. (1997) Effect of chemotherapy for acute myelogenous leukemia on hematopoietic and fibroblast marrow progenitors. *Bone Marrow Transpl.* 20:465–471.
 35. Carrara RCV, Orellana MD, Fontes AM, Palma PVB, Kashima S, Mendes MR, Coutinho MA, Voltarelli JC, Covas DT. (2007) Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. *Braz J Med Biol Res.* 40:57-67.
 36. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. (1980) Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 56: 289-301.
 37. Charbord P. (2001) Microenvironmental cell populations essential for the support of hematopoietic stem cells. *Hematopoiesis. A developmental approach.* Oxford USA. 691-716
 38. Charbord P. (2001) Mediators involved in the control of hematopoiesis by the microenvironment. *Hematopoiesis. A developmental approach.* Oxford USA. 702-717

39. Charbord P. (2001) The hematopoietic stem cell and the stromal microenvironment. *Therapie*. 56:383-384
40. Chaudhary LR, Hofmeister AM, Hruska KA. (2004) Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*. 34:402– 411.
41. Chávez-González A, Ayala-Sánchez M, Sánchez-Valle E, Ruiz-Sánchez E, Arana-Trejo RM, Vela-Ojeda J, Mayani H. (2006) Functional integrity in vitro of hematopoietic progenitor cells from patients with chronic myeloid leukemia that have achieved hematological remission after different therapeutic procedures. *Leuk Res*. 30:286-295.
42. Chen D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE. (1998) Differential roles for bone marrow morphogenic protein (BMP) receptor type 1B and 1A in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol*. 142-295-305.
43. Cheng LM, Yan Y, Wang QR. (2003) Expression of hematopoietic inhibitory factors in mouse fibroblasts, macrophages and endothelial cells. *Cell Biol Inter*. 27:739–745.
44. Chute JP, Fung J, Muramoto G, Erwin R. (2004) Ex vivo culture rescues hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity following harvest from lethally irradiated mice. *Exp Hematol*. 32:308-317.
45. Clarkson B; Strife A, Wisniewski D, Lambek C, Liu C. (2003) Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*. 17:1211-1262.
46. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. (2008) Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 19:1861-1865.
47. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. (2001) Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:7841–7845

48. Cotterell SEJ, Engwerda CR, Kaye PM. (2000) *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- α . *Blood*. 95:1642-1651.
49. Cross N, Reiter A. (2002) Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia* .16:1207-1212.
50. Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, Leof EB. (2004) Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest*. 114:1308–1316.
51. Dash A, Williams I, Kutok J, Tomasson M, Anastasiadou E, Lindahi K, Li S, Van-Etten R, Borrow J, Housman D, Druker, Gilliland G. (2002) A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:7622-7627.
52. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* (2006) 20:161-171
53. Deans RJ, Moseley AB. (2000) Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 28:875-884.
54. Deininger M, Druker B. (2003) Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev*. 55:401-423.
55. Delwiche F, Raines E, Powell J, Ross R, Adamson J. (1985) Platelet-derived growth factor enhances in vitro erythropoiesis via stimulation of mesenchymal cells. *J Clin Invest*. 76:137-142.
56. Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biophys Res Commun*. 282:148-152.
57. Dennis JE, Charbord P. (2002) Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*. 20:205-214.
58. Dewar AL, Zannettino ACW, Hughes TP, Lyons AB. (2005) Inhibition of c-fms by Imatinib. *Cell Cycle*. 417:851-853.
59. Dewar AL, Farrugia AN, Condina MR, To LB, Hughes TP, Roberts MM, Vernon-Roberts B, Zannettino ACW. (2006) Imatinib as a potential antiresorptive therapy for bone disease. *Blood*. 107:4334-4337.

60. Dickman S. (1991) World researchers to take a closer look at Chernobyl. *Nature*.351:4.
61. DiMascio L, Voermans C, Uqoezwa M, Duncan A, Lu D, Wu J, Sankar U, Reya T. (2007) Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J Immunol*. 178:3511–3520.
62. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. (2007) Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med*. 11:21-38.
63. Domenech J, Linassier C, Gihana E, Dayan A, Truglio D, Bout M, Petitdidier C, Delain M, Petit A, Bremond JL, Desbois I, Lamagnere JP, Colombat P, Binet C. (1995) Prolonged impairment of hematopoiesis after high-dose therapy followed by autologous bone marrow transplantation. *Blood*. 85:3320-3327.
64. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315-317.
65. Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK. (2003) Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol*. 31:1284–1291.
66. Druker B, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal G, Fanning S, Zimmermann J, Lydon N. (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 2: 561-566.
67. Druker B. (2001) Signal Transduction Inhibition: Results from Phase I Clinical Trials in Chronic Myeloid Leukemia. *Sem in Hematol*. 38 Suppl 8: 9-14.
68. Ebihara Y, Wada M, Ueda T, Xu MJ, Manabe A, Tanaka R, Ito M, Mugishima H, Asano S, Nakahata T, Tsuji K. (2002) Reconstitution of human haematopoiesis in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice by clonal cells expanded from single CD34+CD38- cells expressing Flk2/Flt3. *Br J Haematol*. 119:525-534.
69. Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y. (2002) CD34+ or CD34-: which is the more primitive? *Leukemia*. 16:1603-1608.

70. Epstein F. (1999) The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N Eng J Med.* 341:164-172.
71. Fierro F, Illmer T, Jing D, Schleye E, Ehninger G, Boxberger S, Bornhäuser M. (2007) Inhibition of platelet-derived growth factor receptor β by imatinib mesylate suppresses proliferation and alters differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Prolif.* 40:355-366.
72. Fitter S, Dewar AL, Kostakis P, To LB, Hughes TP, Roberts MM, Lynch K, Vernon-Roberts B, Zannettino ACW. (2008) Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood.* 111:2538-2547.
73. Flores-Figeroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. (2005) Mesenchymal stem cells in myelodysplastic síndromes: phenotypic and cytogenetic characterizations. *Leuk Res.* 29:215-224.
74. Flores-Figuroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Espíndola G, Arana-Trejo RM, Castillo-Medina S, Pérez-Cabrera A, Hernández-Estévez E, Arriaga L, Mayani H. (2008) Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Res.* 32:1407-1416.
75. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. (1968) Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 6:230-247.
76. Friedenstein AJ, Chailakhan RK, Lalykina KS. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 3:393-403
77. Friedenstein AJ, Derisglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria Ea, Ruadkow IA. (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 2:83-92.
78. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 17:331-340.

79. Friedenstein Aj, Gorskaja JF, Kulagina NN. (1976) Fibroblasts precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 4:267-274.
80. Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R, Quarto R. (1999) Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol.* 27:1460-1466.
81. Gambacorti-Passerini C, Barni R, Marchsi E, Verga M, Rossi F, Pioletti P, Pogliani E, Corneo G. (2001) Sensitivity to the abl inhibitor STI571 in fresh leukaemic cells obtained from chronic myelogenous leukaemia patients in different stages of disease. *Br J Haematol.* 112:972-974.
82. Gang EJ, Bosnkovski D, Figuereido CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 109:1743-1751.
83. Garderet L, Mazurier C, Chapel A, Ernou I, Boutin L, Holy X, Gorin NC, Lopez M, Doucet C, Lataillade JJ. (2007) Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 48:2032-2041.
84. Gimble JM, Dorheim MA, Cheng Q, Medina K, Wang CS, Jones R, Koren E, Pietrangeli C, Kincade PW. (1990) Adipogenesis in a murine bone marrow stromal cell line capable of supporting B lineage lymphocyte growth and proliferation: biochemical and molecular characterization. *Eur J Immunol.* 20:379-387.
85. Gimble JM, Youkhana K, Hua X, Bass H, Medina K, Sullivan M, Greenberger J, Wang CS. (1992) Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem.* 50:73-82.
86. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. (1996) The function of adipocytes in the bone. An update. *Bone.* 19:421-428.
87. Goldman JM. (2000) Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 355:1031-1032.
88. Góngora-Bianchi R, Selva-Pallares J, Gómez-Almaguer D, Meillon-García L, Vela-Ojeda J, Espinosa-Larrañaga F. Grupo Colaborativo AMEH/LMC. (2005)

- Declaración mexicana de posición para el tratamiento de leucemia mieloide crónica. *Revista de Hematología*. 6 (Supl 2): S1-S14.
89. Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, Ho AD. (2007) Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *Stem Cells*. 25:798-806.
 90. Grande T, Varas F, Bueren JA. (2000) Residual damage of lymphohematopoietic repopulating cells after irradiation of mice at different stages of development. *Exp Hematol*. 28:87–95.
 91. Grey A, O’Sullivan S, Reid IR, Browett P. (2006) Imatinib mesylate, increased bone formation and secondary hyperparathyroidism. *N Eng J Med*. 23:2494-2495.
 92. Gronthos S, Simmons PJ. (1995) The growth factor requirements of Stro-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*. 85:929-940.
 93. Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, and Dazzi F. (2009) Mesenchymal stem cells: the fibroblasts’ new clothes? *Haematologica* doi:10.3324/haematol.13699
 94. Haylock DN, Williams B, Johnston HM, Liu MCP, Rutherford KE, Whitty GA, Simmons PJ, Bertonecello I, Nilsson SK. (2007) Hemopoietic stem cells with higher hemopoietic potential reside at the bone marrow endosteum. *Stem Cells*. 25:1062–1069
 95. Haynesworth SE, Goshima H, Golberg VM, Caplan I. (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 13:81-88.
 96. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 13:69-80.
 97. Haynesworth SE, Baber M, Caplan A. (1996) Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 α . *J Cell Physiol*. 166:585-592.
 98. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg

- B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. (2003) Kinase mutations and Imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol.* 21:4342-4349.
99. Heldin CH, Westermark B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 79:1283-1316.
100. Hock JM, Canalis E. (1994) Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology.* 134:1423-1428.
101. Holtz M, Slovak M, Zhang F, Sawyers C, Forman S, Bathia R. (2002) Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood.* 99:3792-3800.
102. Hristov M, Weber C. (2004) Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 4:498-508.
103. Iwata M, Awaya N, Graf L, Kahl C, Torok-Storb B. (2004) Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch1 gene expression in CD34⁺ cells. *Blood.* 103:4496-4502.
104. Jones BJ, McTaggart SJ. (2008) Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol.* 36:733-741.
105. Jootar S, Pornprasertsud N, Petvises S, Rerkamnuaychoke B, Disthanchong S, Pakakasama S, Ungkanont A, Hongeng S. (2006) Bone marrow derived mesenchymal stem cells from chronic myeloid leukemia t(9;22) patients are devoid of Philadelphia chromosome and support cord blood stem cell expansion. *Leuk Res.* 30:1493-1498.
106. Jorgensen H, Holyoake T. (2001) A comparison of normal and leukemic stem cell biology in chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol.* 19:89-106.
107. Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, Havens A, Schneider A, Ge C, Franceschi RT, McCauley LK, Krebsbach PH, Taichman RS. (2008) Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells.* 26:2042-2051.

108. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E; International ST1571 CML Study Group. (2002) Hematologic and cytogenetic responses to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *N Eng J Med.* 346:645-652.
109. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and adipose tissue. *Stem Cells.* 24:1294-1301.
110. Keyes KA, Segovia JC, Bueren JA, Parchment RE, Albella B. (2001) Latent hematopoietic stem cell toxicity associated with protracted drug administration. *Exp Hematol.* 29:286–294.
111. Klion AD, Robyn J, Akin C, Noel P, Brown M, Law M, Metcalfe DD, Dunbar C, Nutman TB. (2004) Molecular remission and reversal of myelofibrosis in response to Imatinib mesylate treatment in patients with myeloproliferative variant of hypereosinophilic syndrome. *Blood.* 103:473-478.
112. Kollet O, Dar A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainber Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. (2006) Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nature Med.* 12:657-665.
113. Konopleva M y Andreeff M. (2007) Targeting the leukemia microenvironment. *Curr Drug Targets.* 8:685-701.
114. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. (2005) The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology.* 20:349–356.
115. Kubota K, Sakikawa C, Katsumata M, Nakamura T, Wakabayasi K. (2002) Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J Bone Miner Res.* 17:257-265.

116. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei III E. (2003) Chronic myeloid leukemia. *Cancer Medicine*. Hamilton (Canada): BC Decker Inc. Capítulo 128.
117. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Gheron Robey P. (1997) Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol*. 97:561-570.
118. Lee JL, Kim JY, Ryu MH, Kang HJ, Chang HM, Kim TW, Lee H, Park JH, Kim HC, Kim JS, Kang YK. (2006) Response to Imatinib in Kit- and PDGFRA-wild type gastrointestinal stromal associated with neurofibromatosis type I. *Dig Dis Sci*. 51:1043-1046.
119. Lee R, Hsu SH, Munoz J, Jung J, Pochampally R, Prockop D. (2006) A subset of human rapidly self-renewing marrow stromal cells preferentially engraft in mice. *Blood*. 107:2153-2161.
120. Lee S. (2000) Chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 111:993-1009.
121. Li K, Sensebé L, Hervé P, Charbord P. (1997) Non transformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrow. III. The maintenance of hematopoiesis from CD34+ cell populations. *Exp Hematol*. 25:582-591.
122. Liu F, Malaval L, Aubin JE. (2003) Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J Cell Sci*. 116:1787-1796.
123. Lotinun S, Evans GL, Turner RT, Oursler MJ. (2005) Deletion of membrane-bound steel factor results in osteopenia in mice. *J Bone Miner Res*. 20:644-652.
124. Marley S, Deininger M, Davidson J, Goldman J, Gordon M. (2000) The tyrosine kinase inhibitor STI561 like interferon alpha preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors from patients with chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 28:551-557.
125. Marley SB, Gordon MY. (2005) Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor driven. *Clin Science*. 109:13-25.

126. Mayani H. (1992) La producción de células sanguíneas. A treinta años del primer encuentro con las CFU-S. *Ciencia y Desarrollo*. 104:54-59.
127. Mayani H, Guilbert LH, Janowska-Wieczorek A. (1992) Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur J Haematol*. 49:225-233.
128. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp P. (1993) Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood*. 82: 2664-2672.
129. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. (2007) Hematopoiesis. *Cancerología*. 2:95-107.
130. McGrath KE, Palis J. (2005) Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol*. 33:1021-1028.
131. McIntosh K, Bartolomew A. (2000) Stromal cell modulation of the immune system. *Graft* 3:324-328.
132. McKenzie JL, Gan OI, Doedens M, Dick JE. (2007) Reversible cell surface expression of CD38 on CD34-positive human hematopoietic repopulating cells. *Exp Hematol*. 35:1429–1436.
133. Melzer D, Neumann U, Ebell W, Seeger K, Neuhau P, Gaedicke G, Brummendorf TH, Scheduling S (2004). Imatinib mesylate (STI571) considerable affects normal human bone marrow stromal cell growth in vitro. *Blood*. 104: 2330.
134. Mets T, Verdonk G. (1981) Variations in the stromal cell population of human bone marrow during aging. *Mech Ageing Dev*. 15:41-49.
135. Metcalf D. (2001) Some general aspects of hematopoietic development. *Hematopoiesis. A developmental approach*. Oxford USA. 3-14.
136. Metcalf D. (2008) Hematopoietic cytokines. *Blood*. 111:485-491
137. Mielcarek M, Roecklein BA, Torok-Storb B. (1996) CD14⁺ cells in granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)–mobilized peripheral blood mononuclear cells induce secretion of interleukin-6 and G-CSF by marrow stroma. *Blood*. 87:574-580.
138. Minguell JJ, Conget PA. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 181:67-73.

139. Minguell JJ, Erices A, Conget PA. (2001) Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 226:507-520.
140. Mitlak BH, Finkelman RD, Hill EL, Li J, Martin B, Smith T, D'Andrea M, Antoniades HN, Lynch SE. (1996) The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. *J Bone Miner Res.* 11:238-247.
141. Miura Y, Gao Z, Miura M, Seo BM, Sonoyama W, Chen W, Gronthos S, Zhang L, Shi S. (2006) Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: An alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells.* 24:2428-2436.
142. Miyamoto T, Suda T. (2003) Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med.* 52:1-7.
143. Montesinos J, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzman P, Hernandez-Estevez E, Fajardo-Orduna G, Orozco S, Mayani H. (2009) Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy.* 16:1-14.
144. Moreau I, Duvert V, Caux C, Galmiche MC, Charbor P, Bancereau J, Sealand S. (1993) Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B lymphoid cells. *Blood.* 82:2396-2405.
145. Morrison S, Uchida N, Weissman I. (1995) The biology of hematopoietic stem cells. *Anu Rev Cell Dev Biol.* 11: 35-71.
146. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. (2008) PDGF, TGF- β and FGF signaling is important for differentiation and growth of MSC: transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSC into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. *Blood.* 112:295-307.
147. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertoncello I, Bendal LJI, Simmons PJ, Haylock DN. (2005) Osteopontin, a key

- component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 106:1232-1239
148. Nomaguchi K, Suzu S, Yamada M, Hayasawa H, Motoyoshi K. (2001) Expression of Jagged1 gene in macrophages and its regulation by hematopoietic growth factors. *Exp Hematol*. 29:850–855.
149. Ohno R. (2006) Treatment of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate. *Int J Clin Oncol*. 11:176-183.
150. O’Sullivan S, Naot D, Callon K, Porteous F, Horne A, Wattie D, Watson M, Cornish J, Browett P, Grey A. (2007) Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms. *J Bone Miner Res*. 22:1679-1689.
151. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger S, Bornhäuser M, Werner C. (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem cells*. 22:377-384.
152. Owen M. (1988) Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Supl*. 10:63-76.
153. Owen M, Friedenstein AJ. (1988) Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposium*. 136:42-60.
154. Pendergast A, Gishizky M, Havlik M, Witte O. (1993) SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol*. 13:1728-1736.
155. Pereira RF, Halford KW, O’Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. (1995) Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4857-4861.
156. Piersman AH, Ploemacher RE, Brockbank KG. (1983) Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Haematol*. 54:285-290.
157. Pillai MM, Iwata M, Awaya N, Graf L, Torok-Storb B. (2006) Monocyte-derived CXCL7 peptides in the marrow microenvironment. *Blood*. 107:3520-3526.

158. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284:143-147.
159. Prosper F, Verfaillie CM. (2001) Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol*. 69:307–316.
160. Rafii S, Shapiro F, Rimarachin J, Nachman RL, Ferris B, Weksler B, Moore MA, Asch AS. (1994) Isolation and characterization of human bone marrow microvascular endothelial cells: hematopoietic progenitor cell adhesion. *Blood*. 84:10-19.
161. Rafii S. (2001) Regulation of hematopoiesis by bone marrow microvascular endothelium. En *Hematopoiesis: developmental approach*. Ed Leonard I Zon. Oxford. Capítulo 64: 774-783.
162. Rameshwar P, Denny TN, Stein D, Gascon P. (1994) Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines. Potential role for interleukin-1 and TGF-beta. *J Immunol*. 153:2819-2830.
163. Reuther G, Fu H, Cripe L, Coller R, Pendergas M. (1994) Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins 14-3-3 family. *Science*. 266: 129-133.
164. Ricort JM, Tanti JF, Obberghen EV, Marchand-Brustel YL. (1997) Cross-talk between the platelet-derived growth factor and the insulin signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 272:19814–19818
165. Robbins S.L. (1999) *Patología Estructural y Funcional*. Sexta Edición. Edit. Interamericana. (España) p. 45.
166. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 164:247-256.
167. Sawyers CL. (2001) Molecular studies in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Semin Hematol*. 38:15-21.

168. Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 4:7–25.
169. Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R. (1985) A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*. 43:277-286.
170. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. (2008) The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. 22:941-950.
171. Simmons PJ, Torok-Storb B. (1991) Identification of stromal cell precursor in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 78:55-62..
172. Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grünewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi L, Rittling SR, Scadden DT. (2005) Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*. 201:1781–1791.
173. Sutherland HJ, Lansdrop PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. (1990) Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:3584-3588.
174. Taichman RS, Emerson SG. (1994) Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 179:1677-1682.
175. Taichman RS, Emerson SG. (1998) The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells*. 16:7-15.
176. Thalmeier K, Meissner P, Moosmann S, Sagebiel S, Wiest I, Huss R. (2001) Mesenchymal differentiation and organ distribution of established human stromal cell lines in NOD/SCID mice. *Acta Haematol*. 105:159-165.
177. Trumpp A, Wilson A. (2006) Bone marrow haematopoietic stem cell niches. *Nature Rev*. 6:93-104.
178. Tsao A, Kantarjian H, Talpaz M. (2002) STI-571 in chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematol*. 119:15-24.

179. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Umezawa A, Kanamori M, Kimura T, Sasahara M. (2008) PDGF receptor β is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res.* 23:1519–1528.
180. Tondreau T, Lagneux L, Dejoneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D. (2004) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation.* 72:319-326.
181. Tuan RS, Boland G, Tuli R. (2003) Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 5:32-45.
182. Umemoto Y, Tsuji K, Yang FC, Ebihara Y, Kaneko A, Furukawa S, Nakahata T. (1997) Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 90:3438-3443.
183. Usuki K, Iijima K, Iki S, Urabe A. (2005) CML cytogenetic relapse after cessation of imatinib therapy. *Leuk Res.* 2:237-238.
184. Vazziri C, Faller DV. (1996) Down-regulation of platelet-derived growth factor receptor expression during terminal differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte fibroblasts. *J Biol Chem.* 271:13642–13648.
185. Verfaillie C, Hurley R, Lundell B, Zhao C, Bathia R. (1997) Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do Bcr/Abl induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors. *Acta Hematol.* 97:40-52.
186. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. (2004) Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 103:3258-3264.
187. Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, Eckstein V, Ho AD. (2007) Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells.* 25:2638-2647.
188. Wagner W, Wein F, Roderburg C, Saffrich R, Diehlmann A, Eckstein V, Ho AD. (2008) Adhesion of human hematopoietic progenitor cells to mesenchymal stromal cells involves CD44. *Cells Tissues Organs.* 188:160-169.

189. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417-1426.
190. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. (2007) Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*. 129:1081-1095.
191. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, Westmoreland SV, Chambon P, Scadden DT, Purton LE. (2007) A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*. 129:1097-1110.
192. Wallace SR, Oken MM, Lunetta KL, Panoskaltsis-Mortari A, Masellis. (2001) Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients. *Cancer*. 91:1219-1230.
193. Wang J. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. (2000) *Oncogene*. 19: 5643-5650.
194. Wang S, Wilkes MC, Leof MB, Hirschberg R. (2005) Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF- β pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *FASEB J*. 19:1-11.
195. Wetzler M, Talpaz M, Van Etten R, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R. (1993) Subcellular localization of Bcr, Abl and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest*. 92:1925-1939.
196. Wimmer A, Khaldoyanidi SK, Judex M, Seroby N, DiScipio RG, Schraufstatter IU. (2006) CCL18/PARC stimulates hematopoiesis in long-term bone marrow cultures indirectly through its effect on monocytes. *Blood*. 108:3722-3729.
197. Yang M, Li K, Lam AC, Yuen PM, Fok TF, Chesterman CN, Chong BH. (2001) Platelet-derived growth factor enhances granulopoiesis via bone marrow stromal cells. *Int J Hematol*. 73:327-334.
198. Yin T, Li L. (2006) The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 116:1195-1201.

199. Yokota T, Reddy Meka TS, Kouro T, Medina KL, Igarashi H, Takahashi M, Oritani K, Funahashi T, Tomiyama Y, Matsuzawa Y, Kincade PW. (2003) Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J Immunol.* 171:5091–5099..
200. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 425: 836–841.
201. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 174:11-20.
202. Zhao Z, Tang X, You Y, Li W, Liu F, Zou P. (2006) Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hematopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 30:993-1003.
203. Zhao ZG, Li WM, Chen ZC, You Y, Zou P. (2008) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with chronic myeloid leukemia. *Immunol Invest.* 37:726-739.
204. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Basky LW, Weinberg Km, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. (2006) The role of hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 24:928-935.
205. Zweegman S, Kessler FL, Kerkhoven RM, Heimerikx M, Celie JWAM, Janssen JJWM, Huijgens PC, Drager AM, van den Born J. (2007) Reduced supportive capacity of bone marrow stroma upon chemotherapy is mediated via changes in glycosaminoglycan profile. *Matrix Biology.* 26:561–571.