



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DESCRIBIR LAS CARACTERÍSTICAS
HISTOLÓGICAS E INMUNOFENOTÍPICAS DEL
NICHO HEMATOPOYÉTICO Y RETICULAR DE LA
MÉDULA ÓSEA PEDIÁTRICA.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:
DRA. MARÍA DEL ROSARIO ROMERO ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA ARGELIA ESCOBAR SÁNCHEZ.

ASESOR METODOLÓGICO:
DRA. MARÍA DEL PILAR EGUIA AGUILAR Y DRA. EUGENIA
FLORES FIGUEROA.



Ciudad de México, Febrero 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso


DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE FIRMAS

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO



DRA. MARÍA ARGELIA ESCOBAR SÁNCHEZ
Médico Adscrito al Servicio de Patología del Hospital Infantil de México
Federico Gómez.



DRA. MARÍA DEL PILAR EGUIA AGUILAR Y DRA. EUGENIA FLORES
FIGUEROA
JEFE DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. DEPARTAMENTO DE
INVESTIGACIÓN HIMFG / UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN
ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS.
UMAE HOSPITAL DE ONCOLOGÍA. IMSS SIGLO XXI.

DEDICATORIA.

A Dios, creador de todas las cosas.

A mi familia por brindarme su apoyo.

A la Dra. Reyna Palacios González y Dr. José Mario Pérez-Peña por creer en mí.

A la Dra. María Argelia Escobar Sánchez por sus enseñanzas, tiempo y apoyo para la realización de este proyecto.

A mi asesora Metodológica Dra. María del Pilar Eguía Aguilar por su tiempo y ayuda.

A la Unidad de Investigación Médica del Hospital de Oncología. IMSS. Siglo XXI, en particular a la Dra. Eugenia Flores Figueroa y Dra. Alicia Aguilar Navarro.

A mis adscritos: Dra. María Lourdes Cabrera, Dr. Stanislaw Sadowinski, Dr. Carlos Serrano Bello, Dr. Guillermo Ramón y Dr. Pedro Valencia por compartir sus conocimientos y experiencia.

A mis compañeros de generación y residentes rotantes de la especialidad de Anatomía Patológica.

A todo el personal del servicio de patología, en especial José Luis Segundo Hernández por brindarme su apoyo.

A la secretaría de relaciones exteriores, por haberme becado y así concluir mis estudios.

ÍNDICE

I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCIÓN.	2
III. MARCO TEÓRICO.	3
IV. ANTECEDENTES.....	25
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	28
VII. JUSTIFICACIÓN.	29
VIII. OBJETIVOS.	29
IX. MATERIAL Y MÉTODO.	30
IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	31
X. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
XI. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.....	33
XII. RESULTADOS	40
XIII. DISCUSIÓN.....	41
XIV. CONCLUSIONES.....	44
XV. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.	44
XVI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	45
XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
XVIII. ANEXOS.....	49

I. RESUMEN.

Objetivo: Describir las características histológicas e inmunofenotípicas del nicho hematopoyético y reticular de la médula ósea pediátrica de pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez en el período Enero 2010 a Enero 2011. **Material y Método:** El estudio fue de tipo descriptivo de serie de casos, observacional, retrospectivo, de corte transversal, su población de estudio fueron todos los pacientes pediátricos con reportes de biopsias de médula ósea sin alteraciones y que no presentaran enfermedad hematológica ni tener antecedentes de haber recibido quimioterapia previa durante el período de enero 2010 –enero 2011. Departamento de Anatomía Patológica Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se seleccionaron 120 casos de las biopsias quirúrgicas de médula ósea estudiadas durante el período de estudio, de las cuales 30 cumplieron con los criterios de inclusión. **Resultados:** El grupo etéreo que prevaleció fue de 0-5 años con el 66.66%, la mayoría del sexo masculino en el 70%, el 80% presentaron una celularidad de entre 40-60% con relación mielóide-eritroide entre 1:4 y 1:3 respectivamente con 10%. Todas las trabéculas óseas presentaron osteoblastos y el 93.33% tuvieron trabéculas óseas sin alteraciones. En ninguno de los casos se encontró fibrosis y en la mitad de los casos presentaron hemosiderosis Grado I y II de la OMS. Las reacciones de inmunohistoquímica que se realizaron para caracterizar a los nichos hematopoyéticos y reticular de la médula ósea fueron el NGFR o CD271 y CD10, ambos con patrón de expresión citoplasmático, en su mayoría difuso y de localización de forma mixta (paratrabecular, vascular, reticular/mesenquimal y de membrana en los megacriocitos), con una intensidad fuerte. **Conclusiones:** el principal rango de edad estudiado fue de 0-5 años, la mayoría fueron del sexo masculino, la edad media de 3 años, con edad mínima de 2 años y máxima de 16 años. La celularidad que más prevaleció fue la de 40-60% en las edades de 0-5 años, en ninguno de los casos se encontró fibrosis. En menos de la mitad de los casos presentaron hemosiderosis grado I y II de la OMS. Las reacciones de inmunohistoquímica realizadas fueron el factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NFGR o CD271) y el CD10 o CALLA.

Palabras Clave: CPH, CTH, MSC, Gastrulación, SMD, LMA, MM, Nicho hematopoyético y reticular, OMS, inmunofenotipo., NGFR o CD271 y CD10.

II. INTRODUCCIÓN.

La médula ósea es un tejido esponjoso que se localiza en el interior de los huesos, formado por tres componentes celulares; el componente hematopoyético, el mesenquimal y el endotelial. ¹

El sistema hematopoyético es único en comparación a otros órganos y sistemas, por su localización y restricción a la médula ósea después del nacimiento. La composición depende de la edad del niño, particularmente en las etapas más temprana de la vida, así como en la demanda en el crecimiento del niño el cual difiere de la biopsia de médula ósea del adulto. El conocimiento de estas diferencias necesitan ser consideradas cuando se evalúa una biopsia de médula ósea pediátrica para poder discernir entre el desarrollo normal y los procesos patológicos. ²

El componente hematopoyético, tiene su origen en una célula troncal hematopoyética (CTH), la cual es una célula indiferenciada, con capacidad de auto renovación, alta capacidad de proliferación y diferenciación. Las CTH dan origen a progenitores hematopoyéticos. El componente mesenquimal (reticular) es generado por las células troncales/estromales mesenquimales (MSC; por sus siglas en inglés, *mesenchymal stem/stromal cells*) y forman parte del microambiente de la médula ósea. ¹ Las MSC dan origen a los osteoblastos, adipocitos, condrocitos y forman parte del microambiente medular, tienen una gran capacidad de proliferación y diferenciación, dando origen no solo a células de origen mesenquimatoso sino a células no medulares como miocitos, tenocitos, células nerviosas y células endoteliales, entre otras. ³

Los tres componentes celulares se encuentran distribuidos en la médula ósea en tres zonas distinguibles por su morfología; el parénquima, constituido por todos los elementos hematopoyéticos y cantidades variables de grasa o adipocitos; la zona endosteal y trabecular, integrada por osteocitos y osteoblastos; y la vasculatura, que incluye arteriolas, capilares y sinusoides. ⁴ Finalmente, el componente endotelial tiene su origen en el angioblasto, un progenitor capaz de generar células endoteliales. Éste se encuentra relacionado estrechamente con las CTH desde su origen (el hemangioblasto) y regulan tanto el tráfico como la proliferación de las células hematopoyéticas. ⁵

III. MARCO TEÓRICO.

En el embrión en desarrollo y el feto, la hematopoyesis es un proceso dinámico que comienza en el saco vitelino, continúa en el hígado, y finalmente se estabiliza en la médula ósea y permanecerá allí por el resto de la vida adulta. El papel del bazo en la hematopoyesis fetal es controvertido, comenzando a las 11 semanas de gestación. La hematopoyesis comienza con las células madre multipotentes autorrenovables que dan lugar a células progenitoras comprometidas, que en última instancia se diferencian en las células que circulan en la sangre periférica.

Dado que los elementos de la sangre periférica son de corta duración, la hematopoyesis es un proceso constante con el fin de mantener la homeostasis. La hematopoyesis es un sistema muy complicado que culmina en muchos procesos bien orquestados con la cooperación de las células madre, el microambiente de apoyo, y numerosos factores reguladores que proporcionan señales estimuladoras e inhibitoras.

Embriología

Los sitios primarios de cambio durante la hematopoyesis en el desarrollo humano, inician en el saco vitelino seguido de forma transitoria en el hígado, y finalmente se estabiliza en la médula ósea. Curiosamente, las únicas células hematopoyéticas que se producen en el mismo tejido en todas las etapas del desarrollo humano son las células T, que se desarrollan en el timo.

Poco después de la gastrulación, una red de células mesodérmicas extra-embriónicas sirve como sitio de origen tanto de los sistemas hematopoyéticos como el vascular. Puesto que tanto las células endoteliales y hematopoyéticas se derivan de la misma agrupación de células mesodérmicas, la existencia de un precursor común, el cual se ha propuesto sea llamado hemangioblasto. Estas células mesodérmicas tienen una orientación espacial tal que las células periféricas adquieren morfología y el fenotipo de las células endoteliales y las células centrales desaparecen para formar las primeras luces vasculares. El lugar de origen de la hematopoyesis se encuentra en los grupos derivados del mesodermo de las células hematopoyéticas primitivas, que se refiere como "islas de sangre", que se desarrollan adyacentes al endotelio vascular recién formado en los vasos sanguíneos del saco vitelino en desarrollo. La hematopoyesis comienza con la producción de células rojas primitivas en las islas de sangre del saco vitelino poco

después de la implantación. El saco vitelino es el sitio principal de la eritropoyesis de las semanas 3-6 de la gestación y mantienen la viabilidad del embrión hasta que se establece la hematopoyesis en el hígado. Las islas de sangre están compuestas casi exclusivamente de células eritroides; sin embargo, se han identificado pocos megacariocitos. La eritropoyesis del saco vitelino es megaloblástica y resulta en producción de células rojas nucleadas que contiene tres hemoglobinas embrionarias; Gower I (z2e2), Gower II (a2e2), y Portland I (z2g2), y en embriones de mayor edad, hemoglobina F (a2g2). El inicio de la circulación permite que la yema de los eritrocitos nucleados primitivos derivados del saco se introduzcan en los tejidos embrionarios. El primer órgano colonizado es el hígado, que es el sitio principal de hematopoyesis en el embrión de las semanas 6-22 de gestación. La migración de células madre en el hígado da lugar a la hematopoyesis hepática en donde los focos hematopoyéticos se desarrollan en los cordones hepáticos durante la sexta semana de gestación. El bazo fetal también muestra focos de hematopoyesis poco después que el hígado, aproximadamente en la séptima semana de gestación. Aproximadamente la mitad de las células nucleadas en el hígado son células eritroides, y sólo se identifican algunas células mieloides y megacariocitos. Las células eritroides en esta etapa son normoblastos y producen glóbulos rojos nucleados que contienen hemoglobina F. La población de células eritroides en el hígado disminuye progresivamente a medida que se da la transición a la médula ósea; sin embargo, ocasionales células eritroides todavía pueden detectarse al final de la gestación y en la semana postnatal temprana. **(Ver tabla 1).**^{2,21}

Tabla1. Hallazgos característicos de la eritropoyesis primitiva y definitiva.

	Hematopoyesis primitiva	Hematopoyesis definitiva
Sitio hematopoyético	Endotelio vascular Saco vitelino	Hígado fetal y médula ósea fetal Nichos hematopoyéticos
Tipo de hematopoyesis	Mayormente eritroide	Hematopoyesis multilineaje
Características de la serie eritroide	Nucleados durante todo el período de vida	Anucleados
Tamaño de células	Macrofítico	Macrofítico, pero disminuye con la edad gestacional

Sensibilidad a la eritropoyetina	Aumentado	Sensibilidad más baja
Período de vida	Corto	Aumenta con la gestación
Hemoglobinas	Embrionicas: Gower 1, 2 y Portland	Fetal: HbF y HbA

Después de las 22 semanas de gestación, la médula ósea sirve como sede permanente de la hematopoyesis y permanece así durante el resto de la gestación y la vida postnatal. La hematopoyesis ósea comienza en la semana 11 de gestación en las estructuras especializadas denominadas "logettes primarios mesodermales", que son redes sueltas de células mesenquimales que rodean una arteria central. Las cavidades de la médula se forman cuando el hueso o cartílago se erosiona por vasos sanguíneos y células del periostio. Una vez que se forman las cavidades de la médula, el tejido conectivo vascular se organiza y se coloniza por las células hematopoyéticas. Las primeras células de la sangre que se diferencian en la médula ósea adecuada son las células mieloides, seguidas por las células eritroides. Curiosamente, las células precursoras hematopoyéticas tempranas que colonizan la médula ósea no son células madre hematopoyéticas multipotenciales. Se cree que la hematopoyesis en la médula ósea fetal se establece inicialmente por las células progenitoras comprometidas que proveen células mieloides y eritroides esenciales para el feto. Las células madre hematopoyéticas multipotentes autorrenovables, además de su entorno estromal de apoyo muy necesario, se establecen más adelante en la gestación. Después de la semana 22 de la gestación, la médula ósea se convierte en el sitio predominante de la hematopoyesis. El sitio más activo de la hematopoyesis de la médula ósea fetal es la columna vertebral, seguido por el fémur, la pelvis, el peroné / tibia, y el húmero.

Histología

En pacientes pediátricos vivos, la evaluación de la médula ósea por lo general requiere un aspirado, así como muestras de biopsia. Sin embargo, en las autopsias fetales, los aspirados no se realizan comúnmente. Por lo tanto, la evaluación de la médula ósea es mejor realizarla por cortes de hueso (con frecuencia, costilla, cresta ilíaca, cuerpos vertebrales y menos frecuente clavícula, hueso temporal y huesos largos). Idealmente, para la evaluación óptima de la médula ósea, la muestra debe ser un corte delgado y sin

haber sufrido excesiva descalcificación. La citología óptima se obtiene normalmente en las primeras 3 horas postmortem pero el detalle celular se puede conservar durante un máximo de 15 horas post mortem. En general, la evaluación de la médula ósea incluye una estimación del grado de celularidad, identificación de los linajes de células que están presentes, relación serie mieloide-eritroide (M: E), y maduración de las líneas celulares.

A lo largo de la vida fetal, la médula ósea es prácticamente 100% celular, se pueden ver ocasionales adipocitos. En el nacimiento, la médula ósea es de aproximadamente 80% a 100% celular. Otro aspecto importante en la evaluación de la médula ósea es la relación M: E. Al comienzo del segundo trimestre pueden variar las transiciones de la hematopoyesis en la médula ósea desde el hígado y la relación M:E, sin embargo, para el final del segundo trimestre, alrededor de la semana 26, la relación M: E se estabiliza en aproximadamente 1 a 2: 1. La tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) puede ser útil en la diferenciación de células eritroides, mieloides y linfoides. Con la tinción de PAS, las células mieloides tienen citoplasma rosa, las células eritroides citoplasma gris, y las células linfoides citoplasma PAS negativo.

Estructura de la médula ósea

La médula ósea está cubierta por hueso cortical, seguido por hueso trabecular, se compone de una red de capilares senos-venosos que ocupan el espacio entre las trabéculas óseas. La principal fuente de sangre es la arteria nutricia y la red capilar del periostio. La arteria nutricia suministra sangre a las trabéculas y ramas ósea para formar la red del seno venoso capilar, que es un componente integral de la hematopoyesis. Las células hematopoyéticas recién formadas se liberan en la periferia a través del seno capilar-venoso. El microambiente de la médula ósea es un factor esencial en la hematopoyesis, un componente clave en el microambiente es un grupo heterogéneo de células, llamadas células estromales que incluyen las células adiposas y fibroblastos, entre otros. Estas células del estroma tienen un papel clave en el apoyo de la hematopoyesis mediante la secreción de numerosas proteínas, moléculas de adhesión, y productos de regulación que son necesarios para la supervivencia de las células madres y la osteogénesis.

Además de los linajes mieloide, eritroide, linfoide, y megacariocítico, existen una variedad de células que residen en la médula ósea, tales como macrófagos, mastocitos, osteoblastos y osteoclastos.²¹

Linaje de la hematopoyesis.

La hematopoyesis es un espectro de desarrollo desde la célula madre; una célula precursora que adquiere progresivamente características específicas de linaje y culmina en células diferenciadas terminales que se liberan a la circulación, ésta maduración está estrechamente regulada en cada paso por la expresión coordinada de muchos genes.

MIELOPOYESIS

Granulopoyesis

La granulocitopoyesis tiene una distribución geográfica en donde los elementos granulocitos tienden a madurar adyacentes a las trabéculas óseas, donde los factores de crecimiento tales como el factor estimulante de colonias granulocíticas y el factor estimulante de colonias granulocíticas-macrófagicas conducen la vía de maduración granulocítica. El granulocito más inmaduro es el mieloblasto, que por lo general representa hasta del 3% a 5% de las células de la médula. Las próximas etapas de maduración son los promielocitos, mielocitos, metamielocitos, bandas, y, finalmente, en forma de segmentados. En cada etapa sucesiva, se producen cambios en la maduración nuclear y citoplasmática. La cromatina se condensa y se segmenta progresivamente, mientras se desarrollan en el citoplasma gránulos secundarios y se convierten en acidófilos. Estos cambios nucleares y citoplasmáticos específicos se aprecian mejor en los aspirados de médula ósea. En muestras de tejido, las células mieloides inmaduras con cantidades moderadas de citoplasma rosa se ven adyacente a las trabéculas, pero las diferentes etapas de maduración son más difíciles de visualizar. Como los granulocitos maduros migran desde las trabéculas óseas hacia el intersticio, se liberan a través de la pared del seno en la circulación y se identifican por sus núcleos segmentados.

En el hígado fetal, la hematopoyesis está compuesta en su mayoría por eritropoyesis intrasinusoidal; la granulopoyesis es un componente menor visto en los espacios portales. El sitio predominante de la granulopoyesis en el feto es la médula ósea.

Monopoyesis

La misma célula precursora mieloide de la que se diferencia la serie granulocítica también da lugar al linaje de monocitos. La diferenciación de los monocitos se compone de tres etapas: monoblastos, promonocitos, y monocitos maduros. Los monoblastos tienen

cromatina abierta y condensaciones lineales, nucleólos discretos, y abundante citoplasma. A medida que el monoblasto madura en promonocito y monocitos maduros, el núcleo muestra aumento del pliegue y va adquiriendo gránulos azurófilos en el citoplasma. Los monocitos en maduración con frecuencia son difíciles de reconocerlos en muestras fetales postmortem.

Eritropoyesis

El factor regulador más importante de la eritropoyesis es la eritropoyetina (EPO). La hipoxia del medio interno del feto estimula altos niveles de EPO, que disminuyen drásticamente en la vida postnatal. Los precursores eritroides generalmente maduran en colonias a lo largo de la médula ósea y no tienen una distribución geográfica específica como la serie granulocítica. En la médula ósea, el precursor eritroide es el pronormoblasto y las sucesivas etapas de maduración incluyen el normoblasto basófilo, normoblasto policromático, normoblasto ortocromático, reticulocitos y eritrocitos maduros, que no están nucleados. En cada etapa se muestran cambios nucleares y citoplasmáticos progresivos. La cromatina nuclear muestra condensación y desarrollo de un núcleo picnótico que finalmente se destruye de forma progresiva. El citoplasma inicialmente es intensamente basófilo y adquiere progresivamente hemoglobina, impartiendo un cambio policromatófilo del citoplasma y, finalmente, un aspecto eosinófilico. Estas etapas en el desarrollo de eritroides se identifican mejor en aspirados de médula ósea. En los cortes de médula ósea, los precursores eritroides se identifican en colonias y los pronormoblastos son grandes, con cromatina abierta y nucléolo prominente. Las células eritroides más maduras son más pequeñas en tamaño y muestran núcleos redondos e hiper cromáticos. Los precursores eritroides son el linaje predominante en el hígado fetal y menos prominente en la médula ósea, donde la relación de mieloides: eritroide es de aproximadamente 1 a 2: 1 después de aproximadamente 26 semanas de gestación. Puede ser difícil diferenciar las células eritroides de las células linfoides en maduración (hematogonias) en los cortes de tejido. La reacción de inmunohistoquímica como la glicoforina C o glicoforina A, puede ser necesaria para evaluar la cantidad de precursores eritroides. Una tinción de PAS también puede ayudar a diferenciar los dos tipos de células. Los glóbulos rojos derivados de la médula ósea son anucleados, a diferencia de las células rojas de la sangre que provienen del hígado fetal. Sin embargo, en condiciones de estrés extremo se pueden ver los glóbulos rojos nucleados.

En los cortes de médula ósea de autopsias de fetos y recién nacidos, los núcleos de los normoblastos con frecuencia son anormales, pueden ser múltiples, irregulares, multilobulados, o tienen pequeñas vesículas. Los cambios se refieren como diseritropoyesis o displasia eritroide. Las células diseritropoyéticas pueden confundirse con neutrófilos segmentados en cortes teñidos con HE. Una tinción con PAS ayuda a hacer la diferencia. Los cambios de diseritropoyesis en material de autopsia fetal casi siempre son un cambio reactivo no específico debido a la hipoxia o estrés por otras causas. Sin embargo, estas anomalías son muy similares a las observadas en algunas formas de anemia diseritropoyéticas congénita familiar. El diagnóstico de la anemia congénita diseritropoyética debe hacerse sólo en el contexto clínico de anemia profunda inexplicable, preferentemente con la confirmación diagnóstica de identificar el defecto genético.

Megacariopoyesis

La megacariopoyesis es regulada por muchos factores de crecimiento y citoquina, siendo uno de los más importantes la trombopoyetina. La diferenciación megacariocítica no está asociada con divisiones mitóticas como los linajes mielóide y eritropoyético, sino mediante el aumento de lobulaciones nucleares, un proceso denominado endomitosis. La forma más inmadura es el megacarioblasto y la maduración de megacariocitos a una formación de plaquetas está marcada por el aumento del tamaño y lobulaciones nucleares. Además, los megacariocitos maduros expresan glicoproteínas plaquetarias específicas y factor de von Willebrand, entre otras proteínas. El linaje de megacariocitos representa menos del 1% de las células de la médula y se ven generalmente dispersos por toda la médula ósea adyacente a los senos vasculares.

Linfopoyesis

Las células madre se diferencian en células progenitoras linfoides y células progenitoras mieloides. Los progenitores mieloides dan lugar al linaje mielóide, eritroide, y megacariocítico. Los progenitores linfoides dan lugar a células B, T y NK. El desarrollo de linfocitos B y linfocitos T depende mucho del microambiente de la médula ósea. Los precursores de células T se derivan de la médula ósea y migran al timo, ya que este es el sitio de maduración de las células T. La proliferación y diferenciación de células B se produce en la médula ósea y depende de numerosos factores de crecimiento y reguladores tales como interleucina IL-1 e IL-7. Las células B y T no se pueden diferenciar

en sus características morfológicas, sino más bien por su perfil específico inmunofenotípico. Las células T expresan CD3 incluso en las primeras etapas y las células B expresan diferentes antígenos específicos en las etapas de maduración. Las células B más inmaduras expresan CD19, CD79a, TdT, CD34 y HLA-DR y con frecuencia coexpresan CD10. A medida que las células B maduran, se pierden CD34, TdT y CD10. El CD20 y la inmunoglobulina de superficie se expresan en las últimas etapas de maduración. Estas características del inmunofenotipo se aprecian mejor en estudios de citometría de flujo. Las células B en maduración con frecuencia son abundantes en las muestras fetales y postnatales, así como en muestras pediátricas, y se denominan morfológicamente hematogonias, éstas muestran un espectro de maduración de linfoblastos que maduran a células B. Estas características morfológicas se ven mejor en un aspirado de médula ósea. En los cortes de tejido, las hematogonias son de tamaño intermedio a pequeño con núcleos redondos a ligeramente irregulares y escaso citoplasma. Las hematogonias generalmente pueden formar pequeños agregados. La cantidad de hematogonias vistas en la médula ósea fetal y neonatal es variable pero puede constituir hasta un 50% a 60% de las células, y con frecuencia pueden ser difíciles de diferenciar de la maduración de precursores eritroides en base solo a la morfología. En tales casos, una tinción de PAS o reacciones de inmunohistoquímicas se deben utilizar para distinguir los elementos eritroides de los linfoides.²¹

Celularidad de la médula ósea: La celularidad es aproximadamente del 100% al nacimiento y disminuye en un 1% por año. La médula que se encuentra justo debajo de la cortical ósea es relativamente poco celular y no da una estimación precisa. Si la muestra es pequeña y subcortical, se deberá hacer constar a continuación, en el informe y omitir la estimación de la celularidad.

Relación mieloide eritroide (M:E) tradicionalmente se ha estimado sobre la biopsia de médula ósea como una comprobación cruzada de cálculo a partir del recuento diferencial de las células de aspirado, debido al dogma de que la distribución de normoblastos en "islas eritroides" hace que en los frotis de aspirado sea irregular. Esto suele ser innecesario si una diferencia de 500 células se ha realizado en una muestra adecuada. Al comparar la estimación realizada en la biopsia para la relación M: E calculada a partir del recuento diferencial de 500 células del aspirado, ésta última por lo general resulta en una proporción ligeramente inferior. Esto es probablemente debido a que es más difícil diferenciar morfológicamente las células precursoras eritroides de los mieloides en la

biopsia que resulta en subestimación de las eritroides. El rango normal para la relación M:E es 1.2: 1 a 5: 1.

Maduración mieloide y eritroide: la delimitación de las células mieloides y eritroides en etapas específicas de su maduración es algo más problemático en la biopsia en comparación con el aspirado por la aglomeración de las células, debido a que la tinción con hematoxilina y eosina (HE) es menos adecuada para identificar las características tales como gránulos citoplasmáticos y porque la biopsia se examina usando bajo campo microscópico. Por estas razones, la gama de maduración se describe en términos generales y un recuento diferencial de células formal, no se hace. El rango de maduración de cada línea celular se puede determinar con la práctica. El proceso impreciso de la diferenciación mieloide en etapa temprana de las células eritroides, y blastos de las células ligeramente más maduras (promielocitos y mielocitos) puede ser apoyado por reacciones de inmunohistoquímica.

Megacariocitos: La estimación adecuada se realiza mediante el examen de la biopsia a 100x (ocular de 10x) aumento y la identificación de uno a tres megacariocitos por campo u por mm² (equivalente a dos espacios intertrabeculares). Las anomalías morfológicas de los megacariocitos se pueden apreciar en la biopsia, pero no tan bien en el aspirado.

Linfocitos: La presencia de agregados linfoides en cortes de médula ósea es con frecuencia discernible a bajo aumento. La diferenciación de los agregados linfoides benignos del linfoma pueden requerir estudios especiales tales como citometría de flujo e inmunohistoquímica. Algunos linfomas afectan en un patrón intersticial y no son identificables sin inmunohistoquímica. El ejemplo clásico de esto es el linfoma de células grandes anaplásico. La morfología de linfoma en la médula ósea no se correlaciona con la que se observa en el ganglio linfático en un número significativo de casos.

Células extrínsecas: La afectación de la médula ósea por carcinoma metastásico suele ser muy evidente. Las células del carcinoma difieren de células hematopoyéticas y linfoides por su mayor tamaño, atipia marcada y su cohesividad. Los carcinomas metastásicos están acompañados comúnmente por un estroma tumoral fibrótico. La inmunohistoquímica juega un papel crucial en la determinación del sitio del tumor primario.

Perfil de antígenos característicos de las células hematológicas.

Estudios especiales: Se han hecho grandes avances en nuestro conocimiento de la hematología en base a datos de estudios del inmunofenotipo y genotípicos obtenidos por estudios especiales tales como inmunohistoquímica (IHC), citometría de flujo (FCM), hibridación in situ con fluorescencia (FISH), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otros. Las definiciones de muchas entidades en la nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de neoplasias hematológicas se basan en características genotípicas, inmunofenotípicas y morfológicas desplazando a los hallazgos clínicos.

Para efectos de la discusión, los estudios especiales utilizados para evaluar la médula ósea y sangre periférica se pueden dividir en aquellos que dan información inmunofenotípica y los que dan información genética. En general, el patólogo debe tener una comprensión más profunda del inmunofenotipo porque suele ser intérpretes solitarios de IHC y comúnmente se requiere para la realización de correlaciones morfológicas importantes con los datos de la citometría de flujo.

La genotipificación se lleva a cabo por un grupo más variado de métodos que rara vez se realizan o se interpretan en el ámbito hospitalario. La integración de los resultados genéticos en el proceso diagnóstico implica principalmente el conocimiento de asociaciones específicas, a diferencia de las habilidades de reconocimiento de patrones para la interpretación de los datos inmunofenotípicos. Estas asociaciones comúnmente aparecen en el informe interpretativo del laboratorio de referencia. Algunas anomalías genéticas se identifican utilizando métodos de inmunofenotipo (por ejemplo, IHC para el gen NPM-ALK en el linfoma anaplásico de células grandes y citometría de flujo para identificar hipodiploidia en la leucemia linfoblástica aguda).

La inmunocitoquímica es una técnica más antigua para la determinación de linaje de células basado en la visualización de productos químicos característicos citoplasmáticos por reacciones no inmunológicas y no encaja en ninguna de las categorías anteriores. La citoquímica ha sido desplazada en gran parte por otras pruebas, pero sigue siendo bastante útil en algunos entornos. Por otra parte, la citoquímica es históricamente importante como base de gran parte de nuestro entendimiento original de la leucemia aguda y para el sistema Francés Americano Británico (FAB) de las neoplasias hematológicas, que sigue siendo ampliamente mencionado.

Inmunofenotipo

Las células normales y malignas expresan múltiples proteínas (antígenos) en sus superficies y dentro de su citoplasma las que son características del linaje celular o la fase de desarrollo. Los anticuerpos monoclonales se han creado para cientos de estas proteínas y de las denominadas de grupo asignados (CD). (**Ver Tabla 2**) así como nombres de acuerdo a proteínas específicas. Están en uso estándar para visualizar la expresión de antígenos celulares en portaobjetos de vidrio utilizando inmunohistoquímica y en muestras de líquido fresco o suspensiones de muestras de tejidos sólidos usando citometría de flujo. Una excepción son los anticuerpos contra kappa y lambda, que son típicamente policlonales debido a la heterogeneidad antigénica. ²⁴

Tabla 2. Marcadores inmunofenotípicos de células hematopoyéticas.	
CD1a	Linfoblastos T, timocitos corticales, células de Langerhans, y células dendríticas interdigitantes.
CD2	Células T, subconjunto de células NK y mastocitos malignos.
CD3	Células T.
CD4	Células T Cooperadoras/inductoras, y monocitos/macrófagos.
CD5	Células T, MCL and CLL.
CD6	Células T y subgrupos de células B.
CD7	Células T, células NK, linfoblastos T, y 10% de AMLs.
CD8	Células T supresoras/citotóxicas y subgrupos de células NK.
CD9	Células pre B, monocitos, y plaquetas.
CD10 (CALLA)	Linfobláastos B, linfobláastos T, granulocitos, y células epiteliales. Anticuerpo conocido como antígeno común de la leucemia Linfoblástica aguda, usado como marcador Linfobláastos B, linfobláastos T, granulocitos, y células epiteliales (glomerular, células de túbulos proximales, células miopelteliales, canalículo biliar, neutrófilos, epitelio intestino delgado fetal y fibroblastos normales) ²⁴

CD11a	Linfocitos, granulocitos, y monocitos.
CD11b	Células mieloides y células NK.
CD11c	Células peludas, monocitos/granulocitos, células NK, y subgrupos de células T.
CD13	Monocitos, granulocitos, mieloblastos, y promielocitos.
CD14	Monocitos, células de Langerhans, y débilmente en granulocitos maduros.
CD15	Células de Reed-Sternberg y células granulocitos, monocitos y células de carcinoma epitelial.
CD16	Células NK, granulocitos, macrófagos, células mastocitos, y timocitos fetales.
CD18	Leucocitos (plaquetas son CD18 negativas).
CD19	Células B, mieloblastos en AML con t (8; 21); las células plasmáticas son negativas.
CD20	Células B; células plasmáticas son negativas.
CD21	Células B maduras y células dendríticas foliculares.
CD22	Células B; células plasmáticas son negativas.
CD23	Células dendríticas foliculares, subgrupos de células T, monocitos, y CLL.
CD24	Células B y granulocitos; células plasmáticas son negativas.
CD25	Células peludas, células activadas T y B, y monocitos activados.
CD26	Células NK, subgrupos de células T, timocitos, y células epiteliales.
CD27	Subgrupos de células T, timocitos, células B de memoria, y células NK.
CD28	Timocitos y células infectadas por VEB.

CD29a	Leucocitos y plaquetas.
CD30	Linfoma anaplásico de células grandes, células de Reed-Sternberg, células B activadas, y células T activadas.
CD31	Células endoteliales, monocitos, plaquetas, granulocitos, y subgrupos de linfocitos.
CD32	Monocitos, neutrófilos, células B, y plaquetas.
CD33	Precursores mieloides y monocíticos, y células dendríticas.
CD34	Células progenitoras (blastos) y células endoteliales.
CD35	Células B, subgrupos de células T, monocitos, granulocitos, y eritrocitos.
CD36	Plaquetas, monocitos/macrófagos, y células eritroides prematuras.
CD37	Células B maduras; pre-B y las células plasmáticas son negativas.
CD38	Células NK, células B, subgrupos de células T, y células plasmáticas.
CD40	Células B maduras; células plasmáticas son negativas.
CD41	Plaquetas y megacariocitos.
CD42a	Plaquetas y megacariocitos.
CD43	Células T, células B activadas, células plasmáticas, y células mieloides.
CD44	Células hematopoyéticas y no hematopoyéticas; plaquetas son negativas.
CD45	(Antígeno común leucocitario) todas las células hematopoyéticas excepto células eritroides, células dendríticas foliculares, células de Langerhans, células de Reed Sternberg, células plasmáticas y a veces células del linfoma anaplásico de células grandes.
CD45RA	La mayoría de los linfocitos (B y T)

CD45RO	Células T de memoria y activadas, subgrupos de células B, y monocitos.
CD52	Células T y B, monocitos, la mayoría de los linfomas y subgrupos de mielomas.
CD54	Células B y T activadas, macrófagos y otras células.
CD55	Células hematopoyéticas.
CD56	Células NK, subgrupos de células T, y células plasmáticas neoplásicas.
CD57	Células NK y subgrupos de células T.
CD61	Plaquetas, megacariocitos, y monocitos.
CD62L	La mayoría de células B, células T nativas, monocitos y células NK.
CD64	Monocitos/macrófagos y granulocitos.
CD69	Linfocitos activados.
CD71	Células proliferantes.
CD79a	Células pre-B y B maduras; células plasmáticas son negativas.
CD79b	Células pre-B y B maduras; células plasmáticas son negativas.
CD99	Sarcoma de Ewing y células precursoras T y B.
CD103	Linfocitos intraepiteliales, timo y bazo.
CD117	Mieloblástos, promielocitos, células mastocitos, y tumor del estroma gastrointestinal.
CD123	Precursores mieloides, células mastocitos, basófilos, células DC2 y subgrupos de linfocitos.
CD138	Células plasmáticas y células epiteliales; células negativas B maduras son negativas.

CD235	Precursores eritroides.
CD246/ALK	Sobre expresado en linfoma anaplásico de células grandes; positivo en un subgrupo de células normales del Sistema Nervioso Central.
HLA-DR	Células B, células T activadas, monocitos, y mieloblastos; negativos en promielocitos.
TdT	Linfoblastos B, linfoblastos T, hematogonias, y timocitos.
Ciclina D1 (bcl-1)	Bajo grado de expresión en células normales. Sobre expresado en linfoma de células del manto, un subgrupo de HCL, y un subgrupo de mieloma de células plasmáticas.
Bcl-2	Células hematopoyéticas y no hematopoyéticas; sobre expresado en linfomas B.
Ccl-6	Células centro germinales B.
Anexina A1	HCL y granulocitos.
DBA.44	HCL y subgrupos de algunos linfomas de células B.
MUM1/irf4	Células B no centro germinal.
BOB1	Células B y células plasmáticas del mieloma.
OCT2	Células B y células plasmáticas del mieloma.
PAX5/BSAP	Células B y AML con t (8; 21); negativo en células plasmáticas.
ZAP70	Células B y B-CLL no mutadas.
TCL-1	Leucemia de células T promielocítica y algunas neoplasias de células B.

Mieloblastos: CD34, CD117, CD33, CD13 y HLA-DR positivo

Promielocitos: CD117, CD13, CD33 positivo; HLA-DR negativo

Monoblastos: CD4, CD14, CD64 positivo; CD34 positivo o negativo

Precursores linfoblastos B: CD34, CD19, CD10, TdT positivo; cadena ligera de inmunoglobulina de superficie y CD20 negativo

Linfoblastos pre-B: CD19, CD10, citoplasmáticos μ (mu cadena pesada), y TdT positivo; CD34 e inmunoglobulina de superficie negativa; CD20 positivo o negativo

Linfoblastos B (leucemia linfoblástica aguda de células B, linfoma de Burkitt): CD19, CD20, CD10, y monoclonal kappa o lambda positivo; TdT negativo.

Precursores linfoblastos T: CD7 y TdT positivo; CD1, CD2, CD3 de superficie, CD4, CD5 y CD8 negativo.

Linfocitos corticales tempranos: CD1a negativo; CD2, CD3 citoplasmático, CD5, CD7 y TdT positivo.

Linfocitos corticales tardíos: CD1a, CD2, CD3 citoplasmático, CD4, CD5, CD7, CD8 y TdT positivos.

Linfocitos medulares: CD1a negativo; CD2, citoplasmática y de superficie CD3, CD4 o CD8 positivos; CD5, CD7 positivas; TdT positivo o negativo.

Células de linfoma folicular (centrocitos, centroblastos): CD19, CD20, CD10, inmunoglobulina de superficie de cadena ligera kappa o lambda monoclonal positivo; TdT-negativo.

Leucemia linfocítica crónica de células B / linfoma linfocítico de células pequeñas: CD19, CD23, CD5 y positivo; CD20 positivo; cadena ligera de inmunoglobulina de superficie positivo o negativo.

Linfoma de células del manto: CD5, CD19, y FMC7 positivo; CD20 y la cadena ligera de inmunoglobulina de superficie fuertemente positiva; CD23-negativo.

Leucemia de células peludas: CD103, CD11c, CD25, CD19, CD20, y monoclonal kappa o lambda positivo; CD5 y CD10 negativo.

Mastocitos benignos: CD117, CD33 positivos; CD2 y CD25 negativos.

Mastocitos malignos: CD117, CD33, CD2 y CD25 positivo ²⁴

El concepto de nicho surge en el campo de la ecología, acuñado por Joseph Grinnell, un naturalista que en 1917 utilizó el término para describir la suma de los requerimientos del hábitat o ambiente que le permite a una especie persistir y reproducirse. Años después, fue adaptado al campo de las células troncales por Ray Schofield en su publicación de 1978.

En los años setenta la célula más inmadura que había sido identificada era la unidad formadora de colonias en el bazo (CFU-S, por sus siglas en inglés, *colony forming unit-*

spleen). Las CFU-S son los nódulos o colonias que se observaban en el bazo, después de realizar un trasplante con células de médula ósea previo a una irradiación letal o semiletal del ratón receptor. Estas colonias son clonales (originadas a partir de una sola célula) y tienen la capacidad de dar origen a nuevas colonias si son trasplantadas a un receptor secundario (un segundo ratón), por lo que se consideraba que presentaban capacidad de autorenovación. Las CFU-S primero fueron descritas por James Till y Ernest McCulloch (considerados como los padres del campo de las células troncales). Schofield analizó los datos experimentales publicados hasta ese momento y observó que la capacidad de las CFU-S para dar origen a nuevas colonias se iba perdiendo conforme se iban realizando trasplantes seriales (a partir de un primer ratón trasplantado, se toman las células del donador y se transfieren a un segundo receptor; de este segundo, se toman nuevamente las células del primer donador y se llevan a un tercer o cuarto receptor). Estos resultados demostraban que las CFU-S no tenían una "verdadera" capacidad de autorenovación. Gracias a esta observación, el autor propuso que las CFU-S que estaban siendo trasplantadas no eran las células hematopoyéticas más inmaduras, es decir no pertenecerían a las células que se encuentran en la punta de la pirámide, sino que corresponden a progenitores con un mayor grado de diferenciación (progenitores hematopoyéticos multipotenciales), que exhibían una limitada capacidad de autorenovación. De acuerdo a su hipótesis, las células más inmaduras (CTH) deben de permanecer en la médula ósea en "un sitio específico", asociadas fuertemente con otros tipos celulares, tan estrechamente, que no pueden ser extraídas fácilmente para ser trasplantadas. Las células de este sitio específico además de retenerlas, debían de regular su fisiología y protegerlas de señales inductoras de maduración o proliferación. Este sitio fue nombrado por Schofield como nicho de las células troncales (*stem cell niche*, en inglés). A partir del 2003, el uso de modelos murinos permitió comprobar y conocer experimentalmente el concepto de nicho hematopoyético.

Las células troncales poseen varias características funcionales, dentro de las que destacan su capacidad de autorenovación y su gran potencial de proliferación y de diferenciación, características que las colocan en la mira tanto de la investigación básica como la investigación trasnacional o aplicada. Las células troncales se localizan en áreas muy específicas dentro de los tejidos, denominadas como *nichos*. Los nichos proveen a las células troncales las condiciones necesarias para regular su fisiología, preservar su estado de "célula troncal", además de que participan en la regulación de su proliferación y

diferenciación. El conocer la localización de las células troncales y los mecanismos que las regulan en estos sitios, nos permitirá descubrir los secretos que guardan, para conocer su papel en la fisiopatología de las enfermedades y utilizarlos como posible blanco terapéutico, sacarlas de sus nichos más eficientemente para que sean accesibles para trasplantarlas e incluso, producir células troncales en el laboratorio e inducir su diferenciación hacia tipos celulares específicos para su uso en protocolos de terapia celular y medicina regenerativa.

Nuestro cuerpo posee en promedio 6 mil millones de células sanguíneas/kilogramo que tienen una vida limitada (desde algunas horas hasta varios días), por lo que se producen constantemente mediante un proceso denominado hematopoyesis.

La producción de células sanguíneas se lleva a cabo mediante un sistema jerárquico a partir de una célula troncal hematopoyética que no puede ser reconocida por su morfología únicamente por su inmunofenotipo (CD34, CD90, CD133, CD49f, CD38) y en estudios funcionales; que da origen a las células progenitora hematopoyéticas (CPH), las cuales tampoco pueden ser reconocidas por su morfología y comienzan a expresar el antígeno CD38 y algunos marcadores de linaje. Las CPH se diferencian en célula precursora y finalmente maduras, las cuales ya son reconocidas por su morfología, pierden la expresión del antígeno CD34 y adquieren antígenos de linajes celulares específicos.

Células troncales hematopoyéticas:

Las células troncales hematopoyéticas (CTH) pertenecen a la categoría de células troncales somáticas, que incluye también a células troncales presentes en la etapa embrionaria y fetal, pero que son distintas a las nombradas células troncales embrionarias (obtenidas en la etapa previa a la organogénesis, en la fase del blastocisto). Las CTH presentan varias características únicas como su capacidad de autorenovación, la expresión de la enzima telomerasa y su gran capacidad de proliferación y potencial de diferenciación. Las CTH no pueden ser reconocidas por su morfología, por lo que la presencia de diferentes antígenos en su membrana (proteínas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune) es lo que nos permite identificarlas con anticuerpos específicos. Las CTH se diferencian en célula precursora y finalmente maduras, las cuales ya son reconocidas por su morfología, pierden la expresión del antígeno CD34 y adquieren antígenos de linajes celulares específicos.

Células progenitoras, precursoras y maduras

Las CTH dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales aún siguen expresando el antígeno CD34 pero comienzan a expresar antígenos de linaje, carecen de autorenovación o es muy limitada (en el caso de progenitores multipotentes) y poseen propiedades de proliferación y diferenciación inferiores a las CTH. Las CPH tienen la capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos *in vitro* (por lo que también se les denomina como células formadoras de colonias o CFC) y dan a su vez origen a los precursores, células inmaduras pero que son reconocibles por su morfología y que por lo general pierden la capacidad de proliferación. Por último, los precursores maduran y dan origen a todas las categorías de células sanguíneas funcionales presentes en circulación (eritrocitos, leucocitos y plaquetas).

ESTRUCTURA Y COMPONENTES CELULARES DE LA MÉDULA ÓSEA: EL ESCENARIO DEL NICHOS

A partir del nacimiento y hasta la muerte del individuo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético. Es un tejido esponjoso que se localiza en el interior de los huesos y está formado por 3 componentes celulares: el componente hematopoyético, el mesenquimal y el endotelial.

Componente hematopoyético

El componente hematopoyético, como ya revisamos, está compuesto por las CTH y toda su progenie, incluyendo a las células sanguíneas maduras. Lleva a cabo 2 funciones: por una parte, genera las células sanguíneas maduras como los eritrocitos, las plaquetas y las células de la respuesta inmune (monocitos, linfocitos) que salen a la circulación para llevar a cabo sus funciones particulares, y por la otra, producen células que se quedan como residentes de la médula ósea y se integran al estroma y microambiente medular, ayudando a regular la hematopoyesis, como los macrófagos y los osteoclastos.

Componente mesenquimal

El componente mesenquimal es generado por las células troncales/estromales mesenquimales (CTM, por sus siglas en inglés, *mesenchymal stem/stromal cells*). Las CTM dan origen a los osteoblastos, adipocitos y condrocitos y forman parte del

microambiente y nicho medular; son parte del mecanismo de osteogénesis al dar origen a osteocitos y regular la producción y activación de osteoclastos. En la última década el conocimiento sobre las CTM ha crecido exponencialmente, y ha llegado a otros campos de la medicina como la inmunología y la medicina regenerativa y terapia celular.

Componente vascular

El componente vascular, integrado por células endoteliales, tiene su origen en el angioblasto, un progenitor capaz de generar células endoteliales. Este se encuentra relacionado estrechamente con las CTH desde su origen (el hemangioblasto), junto con las que regula tanto el tráfico celular y de nutrientes, así como la proliferación de las células hematopoyéticas.

Estos componentes celulares se encuentran distribuidos en la médula ósea en 3 zonas espaciales: el parénquima, constituido por todos los elementos hematopoyéticos y cantidades variables de grasa o adipocitos; la zona endosteal y trabecular, integrada por osteocitos y osteoblastos (así como osteoclastos que se encargan de la reabsorción ósea), y la vasculatura, que incluye arteriolas, capilares y sinusoides. El parénquima se encuentra abundantemente vascularizado, tanto por capilares como por sinusoides, lo cuales pueden también localizarse junto a la zona trabecular.

Nicho endosteal

La zona endosteal fue el primer "código postal" identificado como nicho de las células troncales. Los estudios que han llevado a su identificación consisten, por una parte, en demostrar la asociación espacial entre las CTH y una determinada estructura, mediante el uso de la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Sin embargo, estos estudios únicamente establecen una relación espacial y no confirman si las CTH están siendo reguladas por estos sitios. Por lo que los análisis de localización se complementan con estudios funcionales, generalmente realizados en modelos murinos, en donde se puede modificar (aumentando, disminuyendo o bloqueando) la expresión de una determinada proteína, en una población celular.

En 3 modelos murinos que involucran la eliminación de células del linaje de osteoblastos se observó una drástica disminución en el número de progenitores hematopoyéticos y de CTH. Por otra parte, en modelos murinos, en donde se incrementó el volumen óseo, y con

ello al número de osteoblastos, resultó en un aumento en el número de CTH, por lo que surgió el concepto de *nicho endosteal*, que se refiere a la zona en donde se localizan las CTH en cercana asociación con los osteoblastos.

Es importante mencionar que en los modelos murinos en donde se eliminan los osteoblastos, las CTH disminuyen pero no desaparecen, lo que sugiere que las CTH tienen otros nichos dentro de la médula ósea o que los osteoblastos apoyan indirectamente a ese nicho, así como estudios posteriores demostraron que la mayoría de las células inmaduras no se localizan en esta zona.

El nicho de las CTH en el ser humano

En humanos se ha encontrado que las células CD146+ (MCAM) y las células positivas al receptor del factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271, tienen características de CTM (células troncales mesenquimales): las primeras tienen la capacidad de diferenciarse en los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico y las segundas también tienen capacidad de diferenciación a linajes mesenquimales y de originar colonias fibroblastoides en cultivos *in vitro*.

El CD271 o factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) es un marcador que define un subgrupo de células estromales mesenquimales multipotenciales y puede ser usado para aislar y enriquecer células derivadas de aspirados de médula ósea. En este estudio, se compararon las células estromales mesenquimales CD271 positivas y negativas que fueron aisladas de aspirados de médula ósea y fueron valoradas para inducir diferenciación *in vitro* osteogénico, adipogénico y condrogénico. En conclusión estos datos mostraron que tanto la presencia de antígeno CD271 y la fuente de células estromales representan factores importantes en determinar la capacidad de las células a proliferar y diferenciar.²²

El papel del nicho de las CTH en enfermedades hematológicas

La evidencia del posible papel de las CTM en la fisiopatología de las enfermedades hematológicas emana tanto de experimentos en modelos animales como de estudios clínicos. En modelos animales experimentales ha sido demostrado que la modificación en la expresión de algunas moléculas en estas células conduce a la generación de mieloproliferación, displasias hematológicas e incluso en la transformación leucémica de

las células hematopoyéticas. Estos estudios han cambiado el paradigma sobre la fisiopatología de las enfermedades hematológicas, debido a que demuestran que aun cuando las células hematopoyéticas sean normales, un cambio en su nicho puede conducir incluso a su transformación leucémica, por lo que queda de manifiesto la importancia de las CTM y del nicho reticular en la regulación de la hematopoyesis.

Por otra parte, se ha demostrado, en diversas enfermedades hematológicas, que existen alteraciones en las CTM. Nuestro grupo fue el primero en demostrar que las CTM presentan alteraciones en una patología hematológica en humanos. En SMD demostramos que, aproximadamente el 60% de los pacientes presentan alteraciones cromosómicas en las CTM.

Recientemente se encontró que pacientes con SMD (síndrome mielodisplásico) y LMA (leucemia mieloide aguda), cuyas MSC presentaban alteraciones cromosómicas, tienen una sobrevida menor que pacientes con CTM con un cariotipo normal. En LMA y en SMD las anomalías cromosómicas reportadas hasta ahora no han sido clonales, es decir, son aberraciones distintas a las de las células hematopoyéticas de los pacientes; sin embargo, en leucemia linfoblástica aguda se reportó la presencia de translocaciones cromosómicas en las CTM entre el 10 y 54% de los pacientes, las cuales se encuentran presentes en las células hematopoyéticas (TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL), lo que sugiere un origen clonal. También se han reportado alteraciones en los patrones de expresión génica y proteica en CTM provenientes de pacientes con mieloma múltiple (MM) y deficiencias en la proliferación y diferenciación de las CTM de pacientes con anemia aplásica (AA). Trabajando con biopsias de médula ósea de pacientes con SMD y LMA, encontramos que pacientes con SMD presentan un incremento en la población de CTM NGFR+CD146-, las cuales, adicionalmente, comienzan a secretar la quimiocina SDF-1.

En LMA también se observó una tendencia del incremento en esta subpoblación, pero no fue estadísticamente significativo. Es importante destacar que nosotros demostramos que SDF-1 en medula ósea normal es secretada principalmente por células endoteliales y que las CTM NGFR+ secretan muy bajos niveles de esta citocina; sin embargo en SMD y LMA, las MSC NGFR+ secretan niveles incrementados de esta citocina, lo que a su vez se correlaciona con el número aumentado de células CD34+. Esto representa un cambio en el nicho reticular en estas enfermedades, tanto en la abundancia de CTM como en su patrón de secreción, de al menos una quimiocina. En conjunto, estos resultados apoyan

que, en humanos, similar a ratón, las CTM regulan la hematopoyesis en sitios específicos de la médula ósea en donde cohabitan con CTH y de manera vital, alteraciones en la fisiología de las CTM condicionan la aparición y el curso de varios tipos de enfermedades hematológicas, incluyendo la mielodisplasia y leucemia.

IV. ANTECEDENTES.

En la vida postnatal, las células que constituyen la sangre se producen en la médula ósea, a través de un proceso conocido como hematopoyesis, este proceso inicia con las células troncales hematopoyéticas (CTH) las cuales residen en la médula ósea, localizándose en sitios específicos denominados nichos hematopoyéticos en los cuales es regulada su fisiología. Los osteoblastos, células endoteliales, y más recientemente las células troncales/estromales mesenquimales (MSC) han sido identificadas como células del nicho. Hasta el momento, la mayor parte de la información generada sobre la función de las MSC en el nicho (denominado reticular) ha sido estudiado en modelos murinos, siendo escasa la información en médula ósea humana. Se han asociado dos subpoblaciones de MSC con CTH/progenitoras hematopoyéticas: las células CD146+ y las células positivas al receptor del factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271.⁶ Es un marcador que define un subgrupo de células estromales mesenquimales multipotenciales y puede ser usado para aislar y enriquecer células derivadas de aspirados de médula ósea. En este estudio, se compararon las células estromales mesenquimales CD271 positivas y negativas que fueron aisladas de aspirados de médula ósea y fueron valoradas para inducir diferenciación *in vitro* osteogénico, adipogénico y condrogénico. En conclusión estos datos mostraron que tanto la presencia de antígeno CD271 y la fuente de células estromales representan factores importantes en determinar la capacidad de las células a proliferar y diferenciar.^{16,25}

Los estudios que han llevado a la identificación de las células del nicho hematopoyético, consisten por una parte en demostrar su asociación espacial con las CTH mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia o en estudios funcionales en modelos murinos, en donde al alterar una determinada subpoblación celular, se ve afectado el número o potencial de las CTH (capacidad para ser trasplantadas). Una de las primeras células en ser identificadas como células del nicho fueron los osteoblastos en la zona endosteal y trabecular.^{7,8}

La evidencia de un nicho adicional al endosteal proviene principalmente de dos estudios, ambos publicados en el 2005. Spinkins y colaboradores localizaron a las CTH y progenitoras hematopoyéticas en zonas vasculares que contenían células endoteliales productoras de CXCL12, lo que ubicaba al sitio vascular como un posible nicho.⁹ La utilización de una combinación de antígenos de la familia SLAM permitió que Kiel y colaboradores tuvieran la capacidad de localizar específicamente a CTH asociadas en un 60% con los sinusoides en la médula ósea de ratones.¹⁰ Gracias a estas evidencias surgió el concepto del *Nicho Vascular* o nicho endotelial. Las sinusoides son parte del sistema vascular y están formados por una capa simple de células endoteliales, los cuales median el paso de los elementos celulares y proteicos hacia dentro y hacia fuera de la cavidad medular.⁹

Estudios recientes han demostrado evidencia de un nuevo nicho, el *Nicho Reticular*.^{11, 12} El nicho reticular no se refiere a una nueva zona espacial dentro de la médula ósea, sino a que dentro de la zona endosteal y vascular, las CTH están haciendo contacto no solo con osteoblastos y células endoteliales, sino que en estas zonas tienen contacto directamente con las MSC.¹³

Previo a las evidencias del nicho reticular, se consideraba que la participación de las MSC dentro de la regulación de la hematopoyesis consistía únicamente en dar origen a los osteoblastos, que son células del nicho que favorecen la hematopoyesis, y a los adipocitos, que se les asocia con una inhibición de la hematopoyesis.¹⁶ Actualmente, en cultivos *in vitro* se ha encontrado que las MSC producen y secretan diversas moléculas reguladoras de la hematopoyesis, tanto citocinas como moléculas de matriz extracelular.³ En estudios funcionales in vivo utilizando un ratón modificado genéticamente para acoplar la expresión de la proteína verde fluorescente con la de nestina, Méndez-Ferrer y colaboradores identificaron a una subpoblación de MSC perivasculares (aunque también en menor proporción cercanas al endostio)¹². La nestina es una proteína de filamento intermedio clase VI que ha sido identificada en progenitores neuronales, células troncales mesenquimales y endoteliales.¹⁴ Las MSC Nestina+ se encontraron asociadas a CTH y a fibras adrenérgicas del sistema nervioso simpático. Al eliminar a las MSC Nestina+ se indujo una movilización del 50% de las CTH al bazo, así como se redujo hasta un 90% la llegada a la médula ósea de CTH trasplantadas.¹² Por otra parte, Omatsu y colaboradores describieron una población de MSC productoras de la quimiocina SDF-1 (factor derivado del estroma) ó CXCL12 a la cual denominaron como CAR (célula reticular con abundante CXCL12), el cual es esencial para el *homing* y mantenimiento de las CTH,

desarrollo de células B y de células dendríticas plasmocitoides.¹³ La mayoría de las CTH fueron encontradas en cercana asociación con las células CAR, las cuales se localizaron en áreas más centrales de las médulas óseas y lejanas al endostio. Estas células también se encontraron asociadas a las zonas perivasculares. Las células CAR también producen el factor de células troncales (SCF), una citocina importante para la supervivencia de las CTH.

11

En conjunto la información anterior apoya un papel crítico de las MSC en la hematopoyesis y aunque a la fecha la información sobre el nicho hematopoyético en humanos es escasa, se ha encontrado que las células CD146+ y las células positivas al receptor del factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271 tienen características de célula troncal mesenquimal. Tomin y colaboradores (2011), demostraron mediante inmunofluorescencia que ambas poblaciones pueden tener contacto con células CD34+ (antígeno presente en CTH y progenitoras hematopoyéticas) e incluso propuso que las MSC CD146+ y NGFR+ sean una misma subpoblación, que divida a MSC con una localización vascular (CD14+NGFR+) y endosteal (CD146-NGFR+).¹⁵

En un estudio reciente, realizado como parte de la colaboración entre el Departamento de Patología de la Universidad de Stanford se analizaron biopsias de médula ósea de individuos hematológicamente sanos (controles) y de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y síndrome mielodisplásico (SMD), todos ellos adultos. Nuestros resultados demostraron que las células CD34+ (incluyendo a las CTH y CPH), tienen una distribución intramedular asociada con la vasculatura y se localizan, en promedio, a 18 micras de ésta.

Si consideramos que el tamaño promedio de una célula en esta preparación varía entre 5 y 10 micras, las CTH y CPH estarían localizadas entre 2 a 4 células de distancia de la vasculatura en médula ósea normal, por lo que no se encontrarían en contacto directo con las células endoteliales sino en contacto directo con las CTM NGFR+. Mediante inmunofluorescencia demostramos que el 80% de las células CD34+ se asociaban estrechamente con las CTM NGFR+ CD146-, y menos del 5% con las CD146+. Estos hallazgos sugieren fuertemente que, en la médula ósea humana, las CTH y CPH se localizan en un nicho reticular asociadas a la vasculatura, pero no hacen contacto directamente con las células endoteliales, sino con las CTM.¹⁷

Es interesante que en este estudio encontramos diferencias sustanciales con respecto a lo reportado en modelos murinos. En éste estudio no fue posible encontrar a las CTH y CPH asociadas a osteoblastos ni a células endoteliales, ni evidencia de CTM nestina+ o de CTM productoras de CXCL12 en médula ósea normal, sólo en muestras de pacientes. Por lo anterior, consideramos que es necesario elucidar si las diferencias observadas en los estudios de médula ósea murina y humana son debidas a la especie, a la cepa, a la edad o al tipo de hueso utilizado.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hasta el momento, la mayor parte de la información sobre la función de las MSC y su papel en el nicho reticular ha sido generado en modelos murinos. Uno de los factores más importantes que tiene impacto en la composición medular y en la biología de las CTH y MSC es la edad. Es por lo que se pretende conocer la composición del nicho hematopoyético y mesenquimal de la médula ósea pediátrica y así de ésta forma nos permitirá con otras investigaciones conocer en un futuro la participación de éstos nichos en la fisiopatología de las enfermedades hematológicas, por lo que me planteé la siguiente pregunta de investigación:

VI. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuáles son las características histológicas e inmunofenotípicas del nicho hematopoyético y reticular de la médula ósea pediátrica?

VII. JUSTIFICACIÓN.

En la médula ósea se han descrito diferentes nichos donde las células troncales hematopoyéticas (CTH) y células troncales/estromales mesenquimales (MSC) interactúan con diversas poblaciones celulares regulando el proceso de hematopoyesis. A pesar de la importancia del nicho hematopoyético y del papel que las células troncales/estromales mesenquimales tienen en su formación, a la fecha se desconoce información básica de la arquitectura de la médula ósea pediátrica y como se modifica ésta con la edad traduciéndose en diferentes malignidades.

Este estudio nos permitirá conocer la composición y distribución de las células troncales/estromales mesenquimales (MSC) y otros componentes del nicho hematopoyético y de esta forma sentar las bases para que a mediano a largo plazo se pueda utilizar este conocimiento en el estudio de las neoplasias hematológicas y conocer su papel en su fisiopatología.

VIII. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Describir las características histológicas e inmunofenotípicas del nicho hematopoyético y reticular de la médula ósea pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez en el período Enero 2010 a Enero 2011.

Objetivos Específicos:

1. Identificar la frecuencia y distribución histológica del nicho hematopoyético y reticular de la médula ósea pediátrica según sexo y edad.
2. Describir las características inmunofenotípicas del nicho hematopoyético y reticular de la médula ósea pediátrica.

IX. MATERIAL Y MÉTODO.

7.1. Tipo de estudio:

Descriptivo, observacional, retrospectivo, de corte transversal.

7.2. Área de estudio:

El estudio se realizó en el Departamento de Patología Clínica y Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez de la Ciudad de México. Donde se reciben, procesan y se diagnostican los especímenes quirúrgicos intrahospitalarios extrahospitalarios de toda la república mexicana.

7.3 Población de estudio:

Pacientes pediátricos hematooncológicamente sanos, con diagnósticos de biopsias de médulas óseas sin alteraciones durante el período enero 2010 – Enero 2011

7.4 Tipo de muestreo: se realizó un muestreo probabilístico, por conveniencia.

7.5 Tamaño de la muestra: Se seleccionaron 30 pacientes con diagnósticos histopatológicos de médula ósea sin alteraciones.

7.6 Criterios de inclusión:

- Biopsias uni o bilaterales en parafina de pacientes pediátricos de 1 día de vida a 18 años que son utilizadas para la estadificación de neoplasias no hematológicas (neoplasias sólidas).
- Pacientes sin haber recibido quimioterapia previa.
- Reporte de patología sin enfermedad hemato-oncológica.
- Adecuado estado de conservación del material biológico
- Que la información requerida en el instrumento de recolección de datos esté completa en la hoja de reporte de biopsia.

7.7 Criterios de exclusión: Se excluyeron los pacientes con reporte y diagnóstico de enfermedad hemato-oncológica y los bloques de parafina con material insuficiente.

- Casos extrahospitalarios de revisión de laminillas.

7.8 Técnica y Procedimiento.

7.8.1. Fuente de información

La fuente fue primaria, realizada a través de la revisión de solicitud de biopsia y de las laminillas teñidas con HE que se encuentran en los archivos del Departamento de Anatomía patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, así mismo la evaluación de las reacciones de inmunohistoquímica realizadas en la Unidad de Investigación del Hospital de Oncología del Centro Médico siglo XXI.

7.8.2. Técnica de recolección de la información:

Para cumplir con los objetivos del estudio se elaboró un instrumento de recolección de la información que contenía los datos que puedan cumplir los objetivos del estudio. Estos datos son: edad, sexo, características histológicas (celdillas óseas totales, celdillas óseas valorables, artificio, integridad de las trabéculas óseas, celularidad, relación mieloide-eritroide, osteoblastos, megacariocitos, fibrosis, reacciones de inmunohistoquímica CD10, NGFR (localización, distribución e intensidad), hemosiderina, otros).

Variables del estudio según Objetivos:

Objetivo N°1:	Objetivo N°2:
Edad	Reacción de inmunohistoquímica
Sexo	CD10
Características histológicas	NGFR

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Se considera un estudio sin riesgo, ya que las muestras de biopsia fueron obtenidas del archivo del Departamento de Patología del Hospital de pacientes para la estadificación de neoplasias no hematológicas (neoplasias sólidas), se solicitó acceso a la jefatura del departamento de patología para revisión de los archivos de registros y obtener el número de folio de quirúrgico y bloques de parafina respectivamente para la realización de las reacciones de inmunohistoquímica llevadas a cabo y en colaboración con la Unidad de Investigación del Hospital de Oncología Centro Médico Siglo XXI. Se estableció el anonimato de los pacientes, se respetó la información de los registros de biopsias sin alterarlos. Los resultados se darán a conocer a las instituciones académicas y al Hospital Infantil de México Federico Gómez.

X. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El enfoque de análisis de este estudio fue cuantitativo y cualitativo.

Método de procesamiento de la información: La información fue recolectada, valorada y procesada directamente por la autora en el sistema estadístico de ciencias sociales SPSS versión 19, para Windows.

Método de análisis de la información: La presentación de resultados se llevó a cabo en tablas, gráficos y fotos que se construyeron en el programa Microsoft Office y Microsoft Office PowerPoint 2010, conforme el plan de análisis.

PLAN DE ANÁLISIS.

Análisis Simple o Univariado.

- a. Edad.
- b. Sexo
- c. Características histológicas

Cruce de variables o análisis bivariado.

1. Edad vs. Sexo
2. Integridad de trabéculas óseas vs osteoblastos
3. NGFR vs distribución vs localización vs intensidad
4. CD10 vs distribución vs localización vs intensidad
5. Relación mieloide-eritroide vs edad
6. Celularidad vs edad

XI. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.

Operacionalización de las variables.

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala	Tipo de Variable	Indicador
Objetivo No 1					
Edad	Período de tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el día de inclusión del estudio	Dato obtenido en la solicitud de biopsia	Continua	Cuantitativa	0-5 años 6-11 años 12-18 años
Sexo	Es el conjunto de características fenotípicas y genotípicas que caracterizan los individuos de una especie dividiéndolos en masculinos y femeninos	Dato obtenido en la solicitud de biopsia	Nominal	Cualitativa	Femenino Masculino

Características histológicas	Todas las características histológicas normales observadas al microscopio óptico y valoradas por el patólogo (a)				
	Celdillas óseas totales	Dato obtenido del reporte de biopsia	Continua	Cuantitativa	Número absoluto
	Celdillas óseas valorables	Dato obtenido del reporte de biopsia	Continua	Cuantitativa	Número absoluto
	Celularidad	Dato obtenido del reporte de biopsia	Continua	Cuantitativa	Porcentaje (%) Mayor o igual a 30 y menor a 40 40-60 70-90 Mayor 90
	Relación mieloide-eritroide	Dato obtenido del reporte de biopsia	Continua	Cuantitativa	1:4 1:5 2:1 3:1 Otra

	Integridad de trabéculas óseas	Dato obtenido del reporte de biopsia	Nomina I	Cualitativa	Sin alteraciones (normales) Delgadas
	Osteoblastos	Dato obtenido del reporte de biopsia	Nomina I	Cualitativa	Presente Ausente
	Megacariocitos	Dato obtenido del reporte de biopsia	Continua	Cuantitativa (equivalente a dos celdillas óseas valorables)	0-10 por mm ² 11-20 por mm ² 21-30 por mm ² 31-40 por mm ² Mayor a 41 por mm ²
	Fibrosis	Dato obtenido del reporte de biopsia	Nomina I	Cualitativa	Si No
	Hemosiderina	Dato obtenido del reporte de biopsia	Nomina I	Semicuantitativa	Gránulos finos y/o gruesos en campos 40X. Grado I Grado II Grado III Grado IV ¹⁸

Objetivo N°2					
Reacciones de Inmunohistoquímica	Es una técnica que revela la existencia de distintas proteínas en las muestras de tejidos, las cuales nos permiten conocer no sólo el origen o el linaje de diferentes células, sino también su funcionalismo. ¹⁹				
NGFR o CD271	Marcador de la superficie celular miembro de la familia de factor de necrosis tumoral usado para células estromales mesenquimal multipotencial aisladas de la médula ósea. ²²				

	Patrón de expresión de citoplasmática/membrana.	Dato obtenido de la observación microscópica	Nominal	Cualitativa	Difuso Focal
	Localización	Dato obtenido de la observación microscópica	Nominal	Cualitativa	Paratrabecular Vascular (endotelial) Reticular/mesenquimal. Células hematopoyéticas (serie blanca, serie roja y megacariocitos). Mixto.
	Intensidad de expresión	Dato obtenido de la observación microscópica	Nominal	Cualitativa	1+/3+++ (débil) 2+/3+++ (moderado) 3+/3+++ (fuerte) No valorable

<p>CD10 (CALLA)</p>	<p>Anticuerpo conocido como antígeno común de la leucemia Linfoblástica aguda, usado como marcador Linfobláastos B, linfobláastos T, granulocitos, y células epiteliales (glomerular, células de túbulos proximales, células miopelteliales, canalículo biliar, neutrófilos, epitelio intestino delgado fetal y fibroblastos normales) ²⁴</p>				
<p>Patrón de expresión citoplasmática/membrana.</p>	<p>Dato obtenido de la observación microscópica</p>	<p>Dato obtenido de la observación microscópica</p>	<p>Nominal</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Difuso Focal</p>
<p>Localización</p>	<p>Dato obtenido de la observación microscópica</p>	<p>Dato obtenido de la observación microscópica</p>	<p>Nominal</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Paratrabecular Vascular (endotelial) Reticular/mesenquimal</p>

					<p>Células hematopoyéticas (serie blanca, serie roja y megacariocitos)</p> <p>Mixto</p> <p>1+/3+++ (débil)</p> <p>2+/3+++ (moderado)</p> <p>3+/3+++ (fuerte)</p> <p>No valorable</p>
	Intensidad de expresión	de Dato obtenido de la observación microscópica	Nomina l	Cualitativa	

XII. RESULTADOS

Del total (120 casos) de las biopsias quirúrgicas de médula ósea estudiadas durante el período de estudio, 30 cumplieron con los criterios de inclusión, el restante de los casos no se incluyeron por presentar médulas óseas hipocelulares (50 casos) y material subóptimo para diagnóstico (40 casos). Distribuidas de la siguiente manera:

La edad media estudiada fue de 3 años, la edad máxima registrada de 16 años y la mínima de 2 años, con una moda de 8 años y una mediana de 3 años. El grupo etáreo más estudiado fue el de 0-5 años con 66.66% (20), seguido del rango de edad de 6-11 años 23.33% (7) y de 12-18 años con 10% (3). En cuanto al sexo más prevalente fue el masculino con 70% (21) y el femenino con 30% (9). En relación a la celularidad el 80% (24) presentaron una celularidad del 40-60%, y el 10% (3) mayor o igual al 30% y menor al 40% y 10% (3) respectivamente con una celularidad mayor al 90%. De la relación mieloide-eritroide el 33.33% (10) presentaron una relación de 1:4 y 3:1 respectivamente, seguido con 16.66% (5) de 1:5 y de 2:1 cada uno. En el 100% (30) de los casos no se encontró fibrosis. Del 100% (30) de casos estudiados el 26.66% (8) presentó hemosiderosis, el 23.33% (7) Grado I de la OMS y el 3.33% (1) Grado II OMS. **(Ver Tabla 1 y Figura 1).**

De los 30 casos estudiados el 53.33% (16) corresponden al sexo masculino en el rango de edad de 0-5 años, seguido de 6-11 años con 16.66% (5), en el rango de edad de 12-18 años no hubieron casos del sexo masculino, sin embargo los 3 casos existentes en éste rango de edad corresponden al sexo femenino con el 10% (3). **(Ver gráfico N°1).**

Con respecto a la integridad de las trabéculas óseas el 93.33% (28) se observaron normales (sin alteraciones) y todas con presencia de osteoblastos, y el 6.67 % (2) con trabéculas óseas delgadas. **(Ver gráfico N°2).**

De la relación mieloide-eritroide en relación a la edad, se encontró que el 33.33% (10) tenían relación de 1:3, de estos el 30% (9) eran de 0-5 años y el 20% (6) de 1:4 respectivamente. **(Ver gráfico N°3).**

En cuanto a la celularidad y edad, se observó que la celularidad que se encontró con frecuencia fue la de 40-60% con 66.66% (20), en las edades de 0-5 años respectivamente, seguido de la celularidad del 70-90% (10) correspondiente al rango de

edad de 6-11 años y ninguno con la celularidad del 90%. **(Ver gráfico N°4)**. De las reacciones de inmunohistoquímica se encontró que el factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271, el cual su patrón de expresión es citoplasmático, fue difuso en el 56.66% (17) y el 43.33% (13) focal. La localización de la expresión del anticuerpo se dispuso en el 83.33% (25) de forma mixta (paratrabecular, vascular, reticular/mesenquimal y de membrana en los megacriocitos), y la intensidad de expresión fue fuerte en el 60% (18) y en menor proporción débil en el 6.66% (2). **(Ver gráfico N°5 y Figura 2-3)**.

El anticuerpo CD10 (CALLA) cuyo patrón de expresión es citoplasmático, fue difuso en el 83.33% (25) y el 16.66% (5) focal. La localización de la expresión del anticuerpo se distribuyó en el 100 % (30) de forma mixta (paratrabecular, vascular, reticular/mesenquimal y de membrana en células blásticas mieloides), y la intensidad de expresión fue moderada en el 56.66% (17) y en menor proporción débil en el 6.66% (2). **(Ver gráfico N°6 y Figura 4)**

XIII. DISCUSIÓN

El sistema hematopoyético no está totalmente desarrollado al nacimiento, el cual alcanza la madurez durante los 10 años de edad. Éstas diferencias tanto en niños en varios períodos de edad y adultos, tiene gran relevancia clínica. El estudio de la médula ósea pediátrica es un campo altamente desafiante y especial. A pesar de su importancia y publicaciones que existen en el campo de la hematopatología, pocos textos en el diagnóstico de enfermedades benignas y malignas son encontrados en niños. Como resultado algunos factores en el desarrollo de la patología en niños es bien reconocido y apreciado, los específicos no están ampliamente reconocidos, lo cual crea una gran dificultad en el diagnóstico de las enfermedades hematológicas en niños. Por lo que se hace necesario establecer una descripción de las características histológicas normales de la médula ósea pediátrica para así entender las patologías hematológicas.

Se estudiaron un total de 30 casos de biopsias de médulas óseas pediátricas normales donde se obtuvo que:

Las edades registradas se presentaron con una media de 3 años, la edad máxima registrada de 16 años y la mínima de 2 años, con una moda de 8 años. El grupo etéreo más estudiado fue el de 0-5 años con 20 casos y la mayoría fue del sexo masculino, en donde se refiere en la literatura que no hay diferencias significantes entre las médulas óseas de niños y niñas.²⁰

El mayor número de casos tuvieron una celularidad del 40-60%, lo cual no corresponde con la literatura que refleja que la celularidad en edad pediátrica promedio es de aproximadamente del 100% al nacimiento y disminuye en un 1% por año, en neonatos (nacimiento a 28 días del 90%), lactantes (1 mes a 1 años del 80-90%), (2 a 5 años de 60-80%) y mayor de 6 años (50-70%).²⁰ La relación mieloide-eritroide en su mayoría presentaron una relación de 1:4 y 3:1, lo cual si se correlaciona con la literatura consultada en donde se describe que el rango normal para la relación M: E es 1,2: 1 a 5: 1.^{21,24}

Más de la cuarta parte de las biopsias de médula ósea presentaron las trabéculas óseas integras con osificación incompleta y completa y con la presencia de revestimiento osteoblástico, lo que se traduce en actividad de remodelación ósea activa coincidiendo con la bibliografía consultada²⁰, en donde se refiere que en la edad pediátrica el hueso trabecular presenta remodelación activa evidente, la cual se ausenta en la edad adulta con trabéculas óseas delgadas y osteoblastos ausentes en histología.

La literatura refiere que la fibrosis es secundaria a daño estromal y/o asociado a una patología primaria de médula ósea, en nuestro estudio ninguna biopsia de médula ósea mostró fibrosis.^{20,21,24}

En pediatría, las biopsias de médula ósea no están indicadas para determinar almacenamiento de hierro, dado que está ausente durante el primer año de vida y aumenta de forma progresiva alcanzando niveles altos en la edad adulta (5ta a 6ta década de la vida), lo cual coincide con la literatura ya que en nuestras biopsias menos de ¼ de pacientes presentaron acúmulos de hemosiderina observados por tinción de hematoxilina-eosina en mayores de un año.²⁰

En las reacciones inmunofenotípicas se encontró el factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271, el cual es un marcador que define un subgrupo de células estromales mesenquimales multipotenciales y puede ser usado para aislar y enriquecer células derivadas de aspirados de médula ósea. En humanos se ha encontrado que las

células CD146+ (MCAM) y las células positivas al receptor del factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271, tienen características de CTM: las primeras tienen la capacidad de diferenciarse en los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico y las segundas tienen la capacidad de diferenciarse a linajes mesenquimales y de originar colonias fibroblastoides en cultivos *in vitro*. Lo que se correlaciona con lo encontrado en nuestro estudio según Tormin y colaboradores (2011), los cuales demostraron que ambas poblaciones pueden tener contacto con células CD34+ (antígeno presente en CTH y progenitoras hematopoyéticas) e incluso propuso que las MSC CD146+ y NGFR+ sean una misma subpoblación, que divida a MSC con una localización vascular (CD14+NGFR+) y endosteal (CD146-NGFR+). En nuestro estudio el patrón de expresión fue citoplasmático, en su mayoría difuso, con localización en región paratrabecular, vascular, reticular/mesenquimal, aunque un hallazgo adicional no descrito en la literatura ni estudios previos fue encontrar tinción de expresión de membrana alrededor de megacariocitos con intensidad de expresión fuerte. ^{15,16,21,25}

En relación al anticuerpo CD10 (CALLA), descrito con patrón de expresión citoplasmático y conocido como antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda, usado como marcador Linfoblastos B, linfoblastos T, granulocitos, y células epiteliales (glomerular, células de túbulo proximales, células miopelteliales, canalículo biliar, neutrófilos, epitelio intestino delgado fetal y fibroblastos normales) ²⁴. En términos de grado de maduración, los progenitores de células B normales constituyen un grupo heterogéneo de células con una expresión variable. ²⁰ lo que no coincide con la literatura consultada, dado que observamos que tuvo una localización mixta tanto paratrabecular, vascular, reticular/mesenquimal y de membrana en células blásticas, con una intensidad moderada, en cambio en la literatura se menciona que los progenitores de células B normales constituyen un grupo heterogéneo de células con una expresión variable. ²⁰,

XIV. CONCLUSIONES.

1. Las principales edades de los pacientes estudiados estuvieron en el rango de 0-5 años, la mayoría del sexo masculino con edad media de 3 años, mínima de 2 años y máxima de 16 años.
2. En relación a las características histológicas la celularidad que se vio con mayor frecuencia fue la de 40-60% en las edades de 0-5 años, en ninguno de los casos se encontró fibrosis. En menos de la mitad de los casos presentaron hemosiderosis grado I y II OMS.
3. Las reacciones inmunofenotípicas realizadas fueron el factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271, con patrón de expresión citoplasmático y de membrana, en su mayoría difuso, con localización en región paratrabecular, vascular, reticular/mesenquimal y de membrana alrededor de megacariocitos con intensidad de expresión fuerte.
4. El anticuerpo CD10 (CALLA), descrito con patrón de expresión citoplasmático y de membrana, con localización de expresión mixta tanto paratrabecular, vascular, reticular/mesenquimal y de membrana en células blásticas, con una intensidad moderada.

XV. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

El tejido estudiado de los bloques de parafina se pierde directamente proporcional con la realización de nuevos cortes para las reacciones de inmunohistoquímica.

XVI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

ACTIVIDAD	PERÍODO DE TIEMPO
Planteamiento y presentación de pregunta de investigación	Mayo 2015
Estructuración del proyecto de tesis y búsqueda de información	Junio 2015
Obtención y evaluación de insumos	Julio – Agosto 2015
Realización de reacciones de inmunohistoquímica por personal de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. UMAE Hospital de Oncología. IMSS Siglo XXI	Septiembre - Noviembre 2015
Evaluación de las reacciones de inmunohistoquímica y captura de la información	Diciembre 2015 – Febrero 2016
Análisis de la información	Marzo 2016
Resultados del estudio y discusión	Abril 2016
Conclusiones del estudio	Mayo 2016
Entrega formal de tesis	Junio 2016

XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat. Immunol.* 2006 Apr;7(4):333–7.
2. *Diagnostic Pediatric Hematopathology.* Maria A. Proytcheva MD. Cambridge University Press. 2011 Seccion 1. Cap. 2. Pág 21-26.
3. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. [Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application]. *Rev. Invest. Clin.* 2006 Oct; 58(5):498–511.
4. Brown DC, Gatter KC. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. *Histopathology.* 1993 May;22(5):411–22.
5. Butler JM, Nolan DJ, L.Vertes E, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010 Mar 5;6(3):251–64.
6. Flores-Figueroa E. El nicho de las células troncales. In: *Células troncales y medicina regenerativa.* México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011. p. 176–94.
7. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):841–6.
8. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):836–41.
9. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Côté D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature.* 2005 Jun 16;435(7044):969–73.
10. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005 Jul 1;121(7):1109–21.

11. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010 Sep 24;33(3):387–99.
12. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):829–34.
13. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol*. 2011 Jul;32(7):315–20.
14. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol*. 2011 Jan 28;17(4):409–18.
15. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schütz B, Ehinger M, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5067–77.
16. H.J Saldivar Santoyo, P.flores-Guzmán, H. Mayani, E. Flores- Figueroa. *Revista de la Facultad de Medicina (México)* Vol. 56 n°3 may/jun 2013. Pág 47-59
17. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271 + mesenchymal stromal cell in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab. Invest*. 2012; 92 (9): 1330-41.
18. OMS, T. F. (2008). *Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lion. France : IARC. 2003.
19. *Diccionari de la LLengua Catalana (en catalán)*. Institut d'Estudis Catalans. Consultado el 18/10/15.
20. Jean W. Keeling, T. Yee Khong. *Fetal and Neonatal Pathology*. Fourth Edition. Cap 8 y 25. Springer 2007

21. Linda M. Ernst MD, Eduardo D. Ruchelli MD, Dale S. Huff MD. Color Atlas of fetal and neonatal Histology. Section VI. Cap. 26 (pág 273-281).
22. Calabrese, Giuffruda, Lo Fumo, MD et al. Potential Effect of CD21 on Human Mesenchymal stromal cell proliferation and differentiation. Int. J Mol sci. 2015 Jul 9,16: 15609-24.
23. Cell Marque Immunohistochemistry Reference Guide. 2007. International Interim Edition.
24. Daniel A. Cherry, MD and Tomislav M. Jelic, MD, PhD. Bone marrow a practical manual. Cap. 1 (pag 7,15,20,21,22,24 y 32)

XVIII. ANEXOS



FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Describir Las Características Histológicas e Inmunofenotípicas del Nicho Hematopoyético y Reticular de la Médula Ósea Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Nota: La información será recolectada de los registros del archivo del departamento de patología del HIMFG.

I- Datos Generales

1. Nombre: _____.
2. Edad: _____.
3. Sexo: _____.

II- Características Histológicas

1. Celdillas óseas totales (Número absoluto): _____
2. Celdillas óseas valorables (Número absoluto): _____
3. Celularidad (porcentaje):
 - Mayor o igual a 30 y menor a 40%: _____
 - 40-60%: _____
 - 70-90%: _____
 - Mayor a 90%: _____
4. Relación mieloide-eritroide:
 - 1:4
 - 1:5
 - 2:1
 - 3:1
 - Otra
5. Integridad de las trabéculas óseas:
 - Sin alteraciones (normales): _____

- Delgadas: _____

6. Osteoblastos:

- Presente: _____
- Ausente: _____

7. Megacariocitos:

- 0-10: _____
- 11-20: _____
- 21-30: _____
- 31-40: _____
- Mayor a 41: _____

8. Fibrosis:

- Si: _____
- No: _____

9. Hemosiderina:

- Grado I: _____
- Grado II: _____
- Grado III: _____
- Grado IV: _____.

III. Reacciones de inmunohistoquímica:

1. NGFR o CD271

- Patrón de expresión:
Difuso: _____
Focal: _____

- Localización:
Paratrabecular: _____
Vascular (endotelial): _____
Reticular/mesenquimal: _____
Células hematopoyéticas:
 - ✓ Serie blanca: _____
 - ✓ Serie roja: _____
 - ✓ Megacariocitos: _____
 - ✓ Mixto: _____
- Intensidad:
Débil (1+/3+++): _____
Moderado (2+/3+++): _____
Fuerte (3+/3+++): _____
No valorable: _____

2. CD 10 o CALLA.

- Patrón de expresión:
Difuso: _____
Focal: _____
- Localización:
Paratrabecular: _____
Vascular (endotelial): _____
Reticular/mesenquimal: _____
Células hematopoyéticas:
 - ✓ Serie blanca: _____
 - ✓ Serie roja: _____
 - ✓ Megacariocitos: _____

✓ Mixto: _____

- Intensidad:


Débil (1+/3+++): _____

Moderado (2+/3+++): _____

Fuerte (3+/3+++): _____

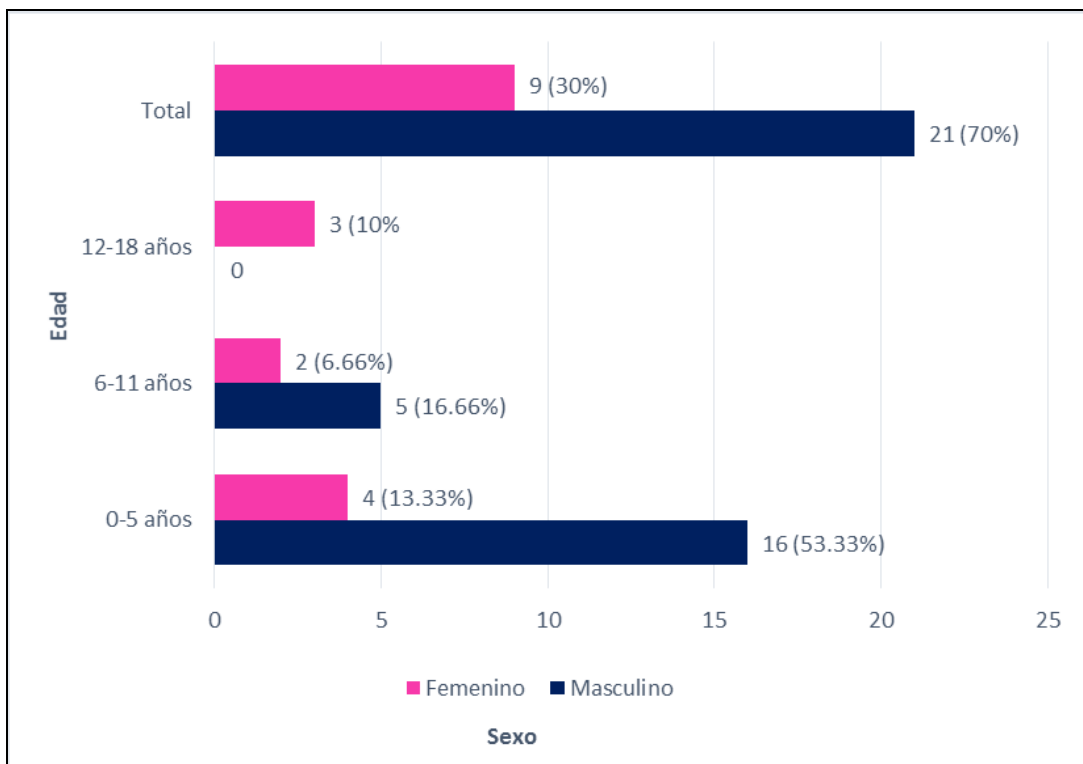
No valorable: _____

Tabla 1: Distribución de casos de biopsias de médula ósea por frecuencia y distribución histológica del nicho hematopoyético y reticular de la médula ósea pediátrica. Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Enero 2010 – Enero 2011.

		Edad	
	Media	3	
	Mediana	3	
	Moda	8	
	Mínimo	2	
	Máximo	16	
Edad		Número	Porcentaje
0-5 años		20	66.60%
6-11 años		7	23.30%
12-18 años		3	10%
Sexo			
Masculino		21	70%
Femenino		9	30%
Celularidad			
Mayor o igual a 30 y menor a 40		3	10%
40-60		24	80%
70-90		3	10%
mayor a 90		0	0%
Relación mieloide-eritroide			
1 a 4		10	33.33%
1 a 5		5	16.66%
2 a 1		5	16.66%
3 a 1		10	3.33%
Otra		0	0%
Fibrosis			
Si		30	100%
No		0	0%
Hemosiderina			
Grado I		7	23.33%
Grado II		1	3.33%
Grado III		0	0%
Grado IV		0	0%

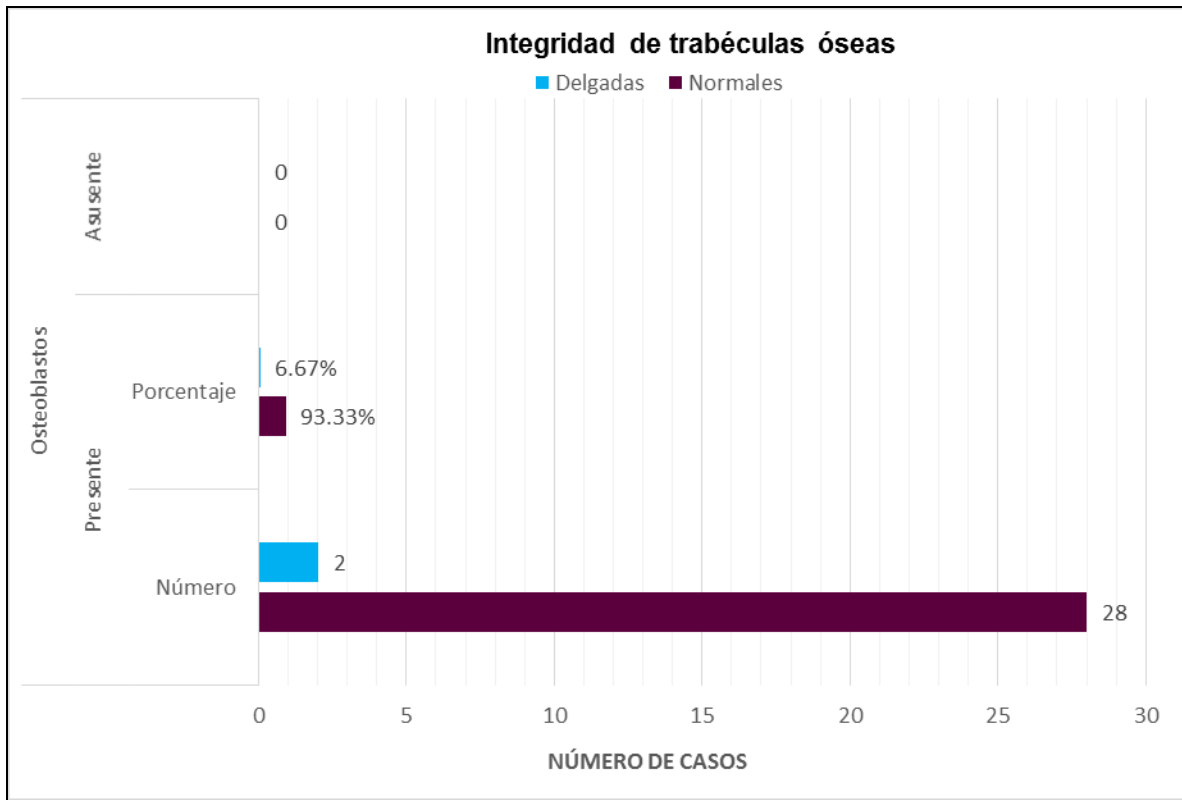
Fuente: Reporte de Biopsia

Gráfico N° 1: Distribución de casos de biopsias de médula ósea por integridad de trabéculas óseas. Departamento de anatomía patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Enero 2010 – Enero 2011.



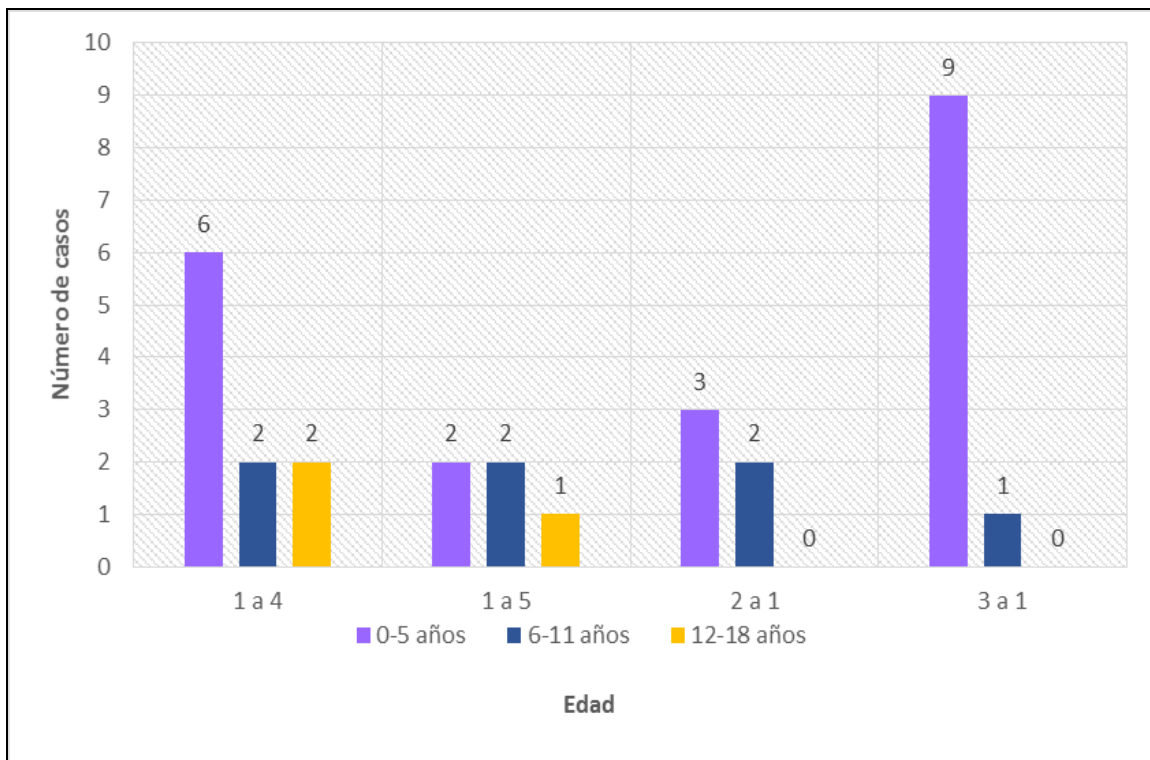
Fuente: Reporte de biopsia.

Gráfico N°2: Distribución de casos de biopsias de médula ósea por integridad de trabéculas óseas. Departamento de anatomía patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Enero 2010 – Enero 2011.



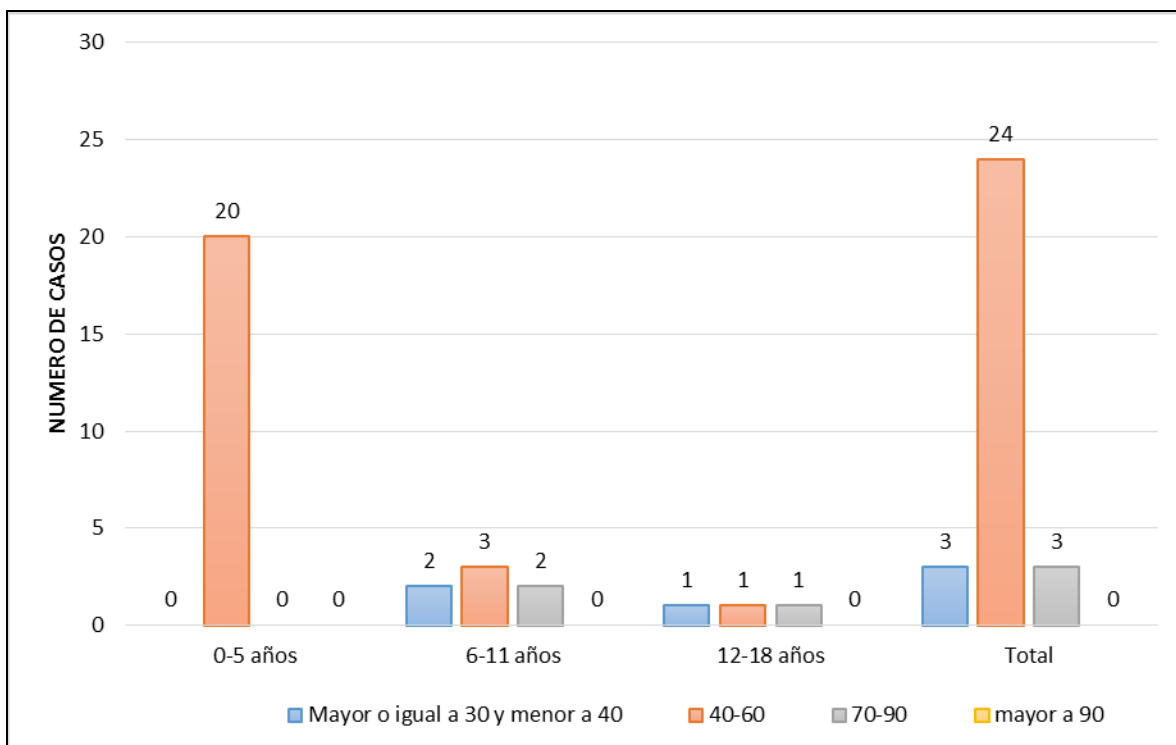
Fuente: Reporte de biopsia.

Gráfico N°3: Distribución de casos de biopsias de médula ósea por relación mieloide-eritroide y edad. Departamento de anatomía patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Enero 2010 – Enero 2011.



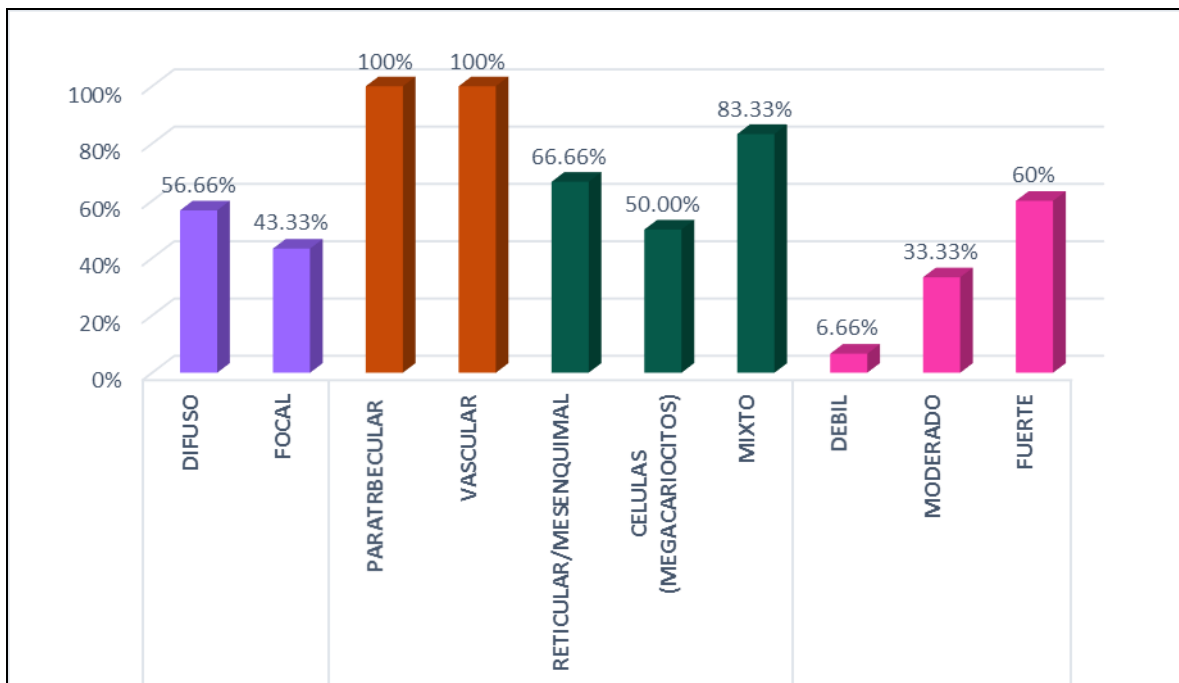
Fuente: Reporte de biopsia.

Gráfico N°4: Distribución de casos de biopsias de médula ósea por celularidad y edad. Departamento de anatomía patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Enero 2010 – Enero 2011.



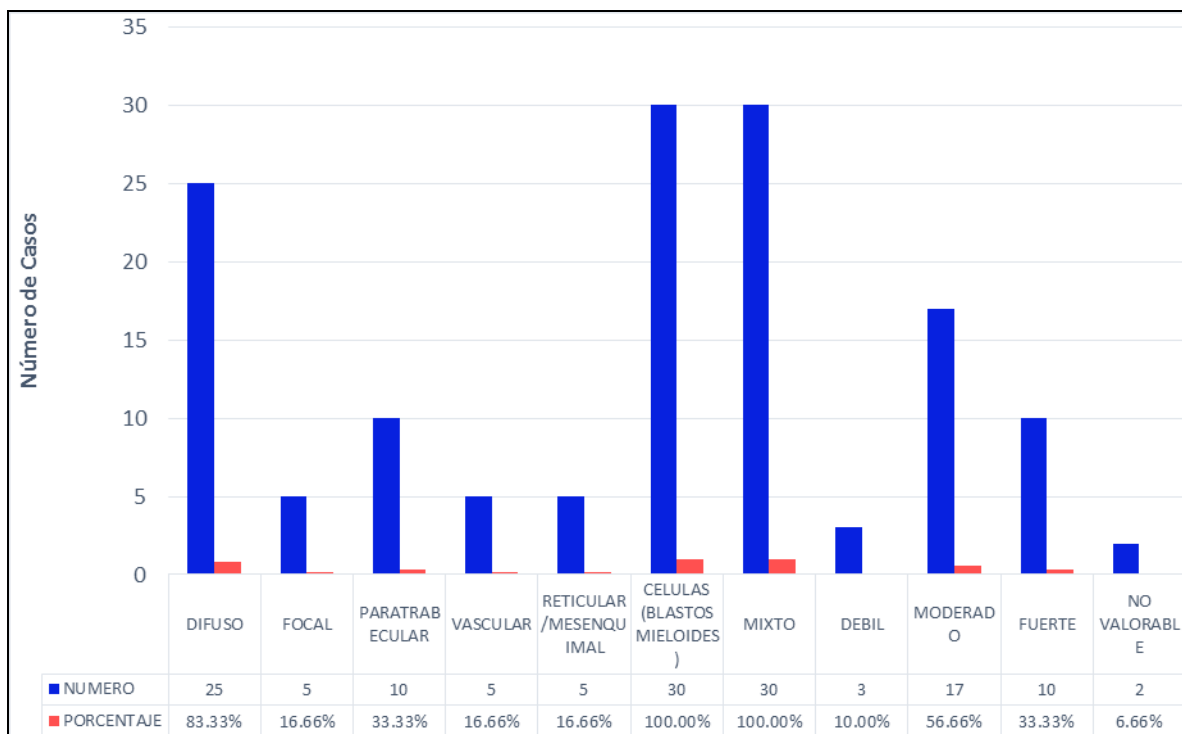
Fuente: Reporte de Biopsia.

Gráfico N°5: Distribución de casos de biopsias de médula ósea con reacción de inmunohistoquímica factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NFGFR) o CD271. Departamento de anatomía patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Enero 2010 – Enero 2011.



Fuente: Departamento de Patología.

Gráfico N°6: Distribución de casos de biopsias de médula ósea con reacción de inmunohistoquímica CD10. Departamento de anatomía patológica del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Enero 2010 – Enero 2011.



Fuente: Departamento de Patología.

