



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL NICHU ENDOTELIAL SOBRE LA PERMANENCIA IN VITRO DE LAS
CÉLULAS TRONCALES DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

TORRES BARRERA PATRICIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ANTONIETA CHÁVEZ GONZÁLEZ

CENTRO MEDICO SIGLO XXI, IMSS

COMITÉ TUTOR: DRA. ANAYANSI MOLINA HERNÁNDEZ

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN

MÉXICO, CD.MX., ENERO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo, registrado con el proyecto número 241840. Y por el apoyo recibido con la beca número 286358561

A mi Tutora Principal, la Dra. María Antonieta Chávez González por brindarme todo el apoyo necesario.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Anayansi Molina Hernández y el Dr Alejandro Zentella Dehesa, por sus consejos y observaciones oportunas en todo momento.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. José Antonio Alvarado, jefe del Laboratorio de trombosis, homeostasis y aterogenesis del Hospital General Gabriel Mancera, IMSS; por brindarnos las células endoteliales, cruciales para el desarrollo de esta investigación. Y por brindarme asesoría muy valiosa para mi desarrollo profesional.

Al Dr. Manuel Ayala Sánchez, del Hospital General Regional Zona No.1 La Raza, por brindarnos las muestras de médula ósea de pacientes con Leucemia Mieloide crónica, sin las cuales hubiera sido imposible realizar el presente trabajo

Al Dr. Héctor Torres Martínez, del Hospital General Regional Zona No. 2 Villa Coapa, por brindarnos las muestras de médula ósea de sujetos hematológicamente sanos, las cuales fueron de vital importancia para el presente trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Células Troncales Leucémicas, UIMEO. En especial a la Dra. Dafné Linda Moreno Lorenzana, por todas las enseñanzas y consejos tan valiosos.

A los honorables miembros del jurado, al Dr. Iván Velasco, a la Dra. Eugenia Flores, a la Dra. Elizabeth Ortiz, a la Dra. Anayansi Molina y al Dr. Antonio Alvarado, por sus valiosas observaciones en la revisión del manuscrito.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	I
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
• Hematopoyesis	3
• Microambiente hematopoyético	5
• Nicho osteoblástico	5
• Nicho estromal	7
• Nicho vascular	8
• Leucemia mieloide crónica	11
• Cromosoma Philadelphia	12
• Desarrollo de la LMC	12
• Células Troncales Leucémicas	13
• Tratamiento de la LMC	14
• Nicho Leucémico	14
• Importancia del nicho vascular en leucemias	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
ANTECEDENTES	20
METODOLOGÍA	22
• Obtención de células hematopoyéticas.	22
• Enriquecimiento de células primitivas hematopoyéticas (CD34 ⁺ Lin ⁻)	22
• Muestras primarias de células endoteliales.	23
• Cultivos de células endoteliales con células hematopoyéticas CD34 ⁺ Lin ⁻	24

• Proliferación-----	24
• Ensayo de unidades formadoras de colonias. -----	24
• Fenotipo-----	26
• Cuantificación de citocinas-----	26
• Detección del transcrito Bcr-Abl -----	26
• Análisis estadístico -----	27
RESULTADOS -----	28
DISCUSIÓN-----	52
CONCLUSIONES -----	59
PERSPECTIVAS -----	60
LITERATURA CITADA -----	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura A.	3
Figura B.....	11
Figura 1.....	29
Figura 2.	30
Figura 3	31
Figura 4.....	33
Figura 5.....	34
Figura 6.	35
Figura 7.....	37
Figura 8.....	38
Figura 9	39
Figura 10.....	40
Figura 11.	41
Figura 12	42
Figura 13.....	44
Figura 14.....	45
Figura 15.....	46
Figura 16.....	48
Figura 17.....	49
Figura 18.....	59

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

CTH – Célula Troncal Hematopoyética

MPP – Progenitores Multipotentes (del inglés, *Multipotent Progenitor*)

CMP – Progenitores Mieloides Comunes (del inglés, *Common Myeloid Progenitor*)

GMP – Progenitores de Granulocitos y Monocitos (del inglés, *Granulocytes and Monocytes Progenitor*)

MEP – Progenitores eritroides y megacariocíticos (del inglés, *Megakaryocytes and Erythrocytes Progenitor*)

HPT – Hormona Paratiroidea

BMPR1A – Receptor Tipo 1A de la Proteína Morfogénica Ósea (del inglés, *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1A*)

SCF – Factor de Células Troncales (del inglés, *Stem Cell Factor*)

CXCL12 (SDF-1 α) – (del inglés, *C-X-C motif chemokine Ligand 12*)

CXCR4 – (del inglés, *C-X-C motif chemokine Receptor 4*)

PDGFR α – Receptor alpha para el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés *Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha*)

LepR – Receptor de Leptinas (del inglés *Leptin receptor*)

CAR cells – Células reticulares con alta expresión de CXCL12 (del inglés *CXCL12-abundant reticular cells*)

SLAM – Moléculas de activación de señales en linfocitos (del inglés, *Signaling lymphocyte activation molecule*)

PTN – Pleiotropina

HIF-1 α – Subunidad 1A del factor 1 inducible por hipoxia (del inglés, *Hypoxia Inducible Factor 1 alpha subunit*)

NG2 – Proteoglicano expresado en estructuras neovasculares, principalmente en pericitos.

NIH – Instituto Nacional de Salud (del inglés, *National Institute of Health*)

CTL – Célula Troncal Leucémica

CIL – Célula Iniciadora de la Leucemia

II-1RAP – Proteína Accesorio del receptor de Interleucina 1 (del inglés, *Interleukin 1 Receptor Accessory Protein*)

ITC – inhibidores de Tirosinas de Cinasas

Ara-C – Arabinofuranosil citidina, también conocida como Citarabina.

G-CSF – Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (del inglés, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFR – Receptor del Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*)

FGF – Factor de crecimiento de Fibroblastos (del inglés, *Fibroblast Growth Factor*)

HUVEC – Células Endoteliales de Vena de Cordón Umbilical (del inglés, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

CE- Célula endotelial

CESP – Células Endoteliales de Sangre Periférica

Fit-3 –Tirosina Cinasa 3 FMS-like (del inglés, *FMS-like Tyrosine Kinase-3*)

GM-CSF – Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (del inglés, *Granulocyte/Monocyte Colony-Stimulating Factor*)

IL-3 – Interleucina 3

EGF – Factor de Crecimiento Epitelial

IL-1b – Interleucina 1b

MIP-1 α – Proteína 1a inflamatoria de macrófagos (del inglés, *Macrophage Inflammatory Protein 1a*)

TNF α – Factor de Necrosis Tumoral alfa (del inglés, *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TPO – Trombopoyetina

IL-6 – Interleucina 6

IFN- γ – Interferón gamma

LIF – Factor Inhibidor de la leucemia (del inglés, *Leukemia Inhibitory Factor*)

CFU-Mix – Unidades Formadoras de Colonias Miexas

CFU-GM – Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Monocitos

BFU-E – Unidades formadoras de Colonias eritroides grandes (del inglés, *Burst Forming Unit-Erythroid*)

SFB – Suero Fetal bovino

MON – Médula ósea Normal

C/EBP α – CCAAT/enhancer-binding protein alpha

C/EBP β – CCAAT/enhancer-binding protein beta

RESUMEN

La Leucemia Mieloide Crónica es sin duda uno de los mejores modelos biológicos para analizar y entender la regulación de la hematopoyesis anormal, ya que presenta, desde estados muy primitivos de la jerarquía hematopoyética, al cromosoma Philadelphia y su producto proteico Bcr-Abl, evento que incluso ha mostrado ventajas en las opciones terapéuticas actualmente utilizadas.

Se ha reportado que mediante la interacción de moléculas específicas, los diversos componentes del nicho hematopoyético pueden regular a distintas subpoblaciones de células primitivas hematopoyéticas. Sin embargo, la interacción de nichos equivalentes en su contraparte leucémica no han sido analizados lo suficiente para comprender su función en el mantenimiento de la leucemia mieloide crónica. Por lo que el presente trabajo plantea el desarrollo de un sistema *in vitro*, usando cultivos sin contacto, que permitan analizar la respuesta biológica y comunicación biológica que se establece entre el componente endotelial y las células primitivas hematopoyéticas tanto normales como leucémicas.

Nuestros resultados muestran que las células hematopoyéticas mantienen estrecha comunicación con células endoteliales, mediante factores solubles. En el caso de las células leucémicas, dicha comunicación permite una rápida diferenciación hacia un fenotipo mieloide, principalmente hacia neutrófilos maduros, lo cual probablemente esté asociado a factores intrínsecos de las células leucémicas así como a la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Dicha secreción de citocinas pro-inflamatorias sólo ocurre cuando las células leucémicas se encuentran en presencia de HUVEC, lo que podría crear un ambiente permisivo para el desarrollo y mantenimiento de la Leucemia Mieloide Crónica. En contraste, en el caso de las células hematopoyéticas normales existe un mantenimiento regulado de los diferentes linajes hematopoyéticos y el nivel de citocinas se mantiene en un estado no inflamatorio. Nuestros hallazgos apoyan la idea de que nichos específicos del microambiente hematopoyético pueden ser los responsables de la presencia y permanencia de subpoblaciones hematopoyéticas particulares.

ABSTRACT

The Chronic Myeloid Leukemia is one of the major biologic models to analyze and understand the abnormal hematopoiesis regulation, since presents the chromosome Philadelphia and its oncoprotein Bcr-Abl from a primitive stages of the hematopoietic hierarchy, characteristics that have shown advantages in therapeutic options currently used.

It has been reported that various components of the hematopoietic niche can regulate subpopulations of hematopoietic primitive cells through soluble molecules interaction. However, equivalent niches in their leukemic counterparts have not been enough analyzed to understand their role for mantaining leukemic cells. So this work present the development of an *in vitro* system, using contact-free cultures, in order to analyzed the biological response and communication established between the endotelial cells and both, normal and leukemic primitive cells.

Our results shown that hematopoietic cells has a close communication with endotelial cells by soluble factors. In the case of leukemia cells, such communication allows rapid myeloid differentiation mainly to mature neutrophils, wich is probably associated with intrinsic factors of leukemic cells and the secretion of proimmflamatory cytokines. Such secretion of proinflammatory cytokines occurs only when leukemic cells are with HUVEC, wich could create a permissive microenvironment for the development and support of chronic myeloid leukemia. In contrast, normal hematopoietic cells support different hematopoietic lineages and the cytokine secretion is non-inflammatory. Our findings support the idea that specific niches of hematopoietic microenvironment may be responsable for the presence and permanence of particular hematopoietic subpopulations.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso continuo mediante el cual se generan todas las células sanguíneas, i.e., eritrocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos/macrófagos y granulocitos como neutrófilos, eosinófilos y basófilos. En humanos la hematopoyesis reside principalmente en el hígado, en la vida fetal, y en la médula ósea (principalmente en huesos trabeculares) a partir del nacimiento. La hematopoyesis es regulada mediante procesos de proliferación, autorrenovación y diferenciación de las células troncales hematopoyéticas (CTHs) que la sostienen (Höfer *et al.*, 2016).

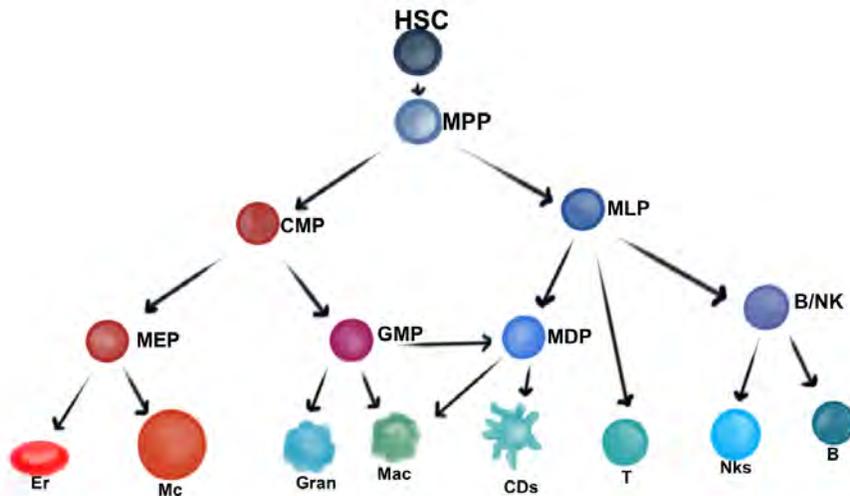


Figura A. Modelo Jerárquico del Sistema Hematopoyético. La figura muestra el proceso gradual de diferenciación a partir de la células troncales hematopoyética (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cell*), las cuales dan lugar a progenitores multipotentes (MPP), y posteriormente los progenitores oligopotentes como: Progenitor Mieloide Común (CMP), Progenitor Multilínea (MLP), Progenitor eritroide y megacariocítico (MEP), Progenitor de Granulocitos y Monocitos (GMP), Proenitor de Macrófagos y Dendríticas (MDP), Progenitor de linfocitos B y NKs (B/NK). A su vez, estos progenitores originan precusores, que finalmente dan lugar a las células: Eritrocitos (Er), Megacariocitos (Mc), Granulocitos (Gran), Macrófagos (Mac), Células Dendríticas (CDs), Linfocitos T (T), Células Natural Killer (NKs), y linfocitos B (B).

Durante varias décadas se ha establecido un modelo jerárquico del sistema hematopoyético, en el cual las CTHs se encuentran en el punto más alto, ya que son células con capacidad de autorrenovación, son multipotentes y como consecuencia, pueden dar origen a todos los linajes hematopoyéticos a largo plazo. Con base en este modelo, cada ramificación generada a partir de las CTHs, es decir, cada paso hacia la diferenciación, implica restricciones y compromisos hacia un

linaje en específico (*Till & McCulloch, 1980*). De esta manera, la diferenciación es vista como un proceso gradual donde las CTHs transitan hacia progenitores multipotentes y posteriormente hacia progenitores oligopotentes, que finalmente culminan en precursores comprometidos hacia un linaje en específico y células maduras circulantes, como se muestra en la Figura A.

No obstante, a finales del año 2015 el grupo liderado por John Dick planteó una nueva hipótesis donde la jerarquía hematopoyética que comprende al linaje mieloide presenta variaciones a lo largo del desarrollo. Por medio de un cuidadoso análisis fenotípico de células hematopoyéticas primarias, se observó que en el hígado fetal humano están presentes los progenitores antes descritos: Progenitores Multipotentes (MPP, *del inglés Multipotent Progenitor*), Progenitores Mieloides Comunes (CMP, *del inglés Common Myeloid Progenitor*), Progenitores comprometidos a la producción de Granulocitos y Monocitos (GMP, *del inglés Granulocytes and Monocytes Progenitor*) y los Progenitores eritroides y megacariocíticos (MEP, *del inglés Megakaryocytes and Erythrocytes Progenitor*). Mientras que en médula ósea adulta los progenitores oligopotentes: CMP, MEP y GMP, son demasiado escasos. La hematopoyesis adulta, que ocurre en la médula ósea parece estar compuesta principalmente por el compartimento multipotente (CTHs y MPPs) y progenitores unipotentes (Notta *et al.*, 2015). Estas evidencias sugieren que la hematopoyesis adulta no necesariamente ocurre de manera gradual, sino que algunos linajes podrían originarse directamente del compartimento multipotente.

En general, la hematopoyesis es un proceso bastante dinámico, en donde cada uno de los progenitores que la conforman son funcional e inmunofenotípicamente heterogéneos, y al parecer, la dinámica hematopoyética cambia a lo largo del desarrollo. Se ha sugerido que la diferenciación hematopoyética podría estar vinculada a algunos eventos estocásticos (Pina *et al.*, 2012; Laslo *et al.*, 2008) y en mayor medida, está mediada por diversos estímulos externos provenientes del microambiente (Warr *et al.*, 2011; Mendelson y Frenette, 2014).

Microambiente hematopoyético

Para mantener la hematopoyesis bajo condiciones homeostáticas es importante cada uno de los elementos que se encuentra en médula ósea. El microambiente de médula ósea está compuesto tanto de células hematopoyéticas maduras y primitivas, como de células no hematopoyéticas tales como células mesenquimales, células endoteliales, células perivasculares, pericitos, osteoblastos, osteoclastos, adipocitos y algunas células del sistema nervioso. Las señales que mantienen la homeostasis dentro del microambiente, pueden provenir del contacto directo entre las células circundantes -en forma de ligando-, o bien, por moléculas secretadas; así como de otros elementos no celulares como la disposición de oxígeno, las fuerzas contráctiles, morfógenos, matriz extracelular y quimiocinas (Mendelson y Frenette, 2014; Krause y Scadden, 2015).

Las CTHs se sitúan en sitios específicos dentro del microambiente de la médula ósea, llamados nichos hematopoyéticos, que son sitios indispensables para el mantenimiento y el correcto funcionamiento de las CTHs. El nicho hematopoyético regula la autorrenovación, diferenciación y proliferación de las CTHs. Hasta la fecha, mediante diversas técnicas que van desde la microscopia de alta resolución con marcaje múltiple, hasta los modelos murinos condicionales y *Knock Out*, se han obtenido aproximaciones en cuanto a la estructura y composición del nicho hematopoyético, y se han identificado tres nichos importantes que contribuyen de manera sustancial al mantenimiento y homeostasis de las CTHs: el nicho osteoblástico, el nicho estromal, y el nicho vascular (Hoggatt *et al.*, 2016). Si bien es cierto que estas áreas no están delimitadas y todas comparten el mismo espacio y tiempo dentro de la médula ósea, hasta el momento se han reportado algunas funciones concretas que posee cada nicho hematopoyético sobre las CTHs.

Nicho osteoblástico

Las CTHs y los progenitores hematopoyéticos, en condiciones cercanas a la homeostasis, tienden a permanecer en el endostio de la médula ósea (Lo Celso *et*

al., 2009). Ha sido demostrado que tan sólo con células osteoblásticas es posible mantener a células primitivas hematopoyéticas en cultivos *ex vivo* (Taichman *et al.*, 1996). Además, en modelos de xenotrasplante, después de trasplantar CTHs en ratones irradiados, las células implantadas se localizan principalmente en la zona del endostio (Lo Celso *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009), por lo que se ha sugerido que las CTHs se encuentran en estrecho contacto con los osteoblastos de la línea ósea.

En un par de estudios independientes se observó que la modificación en la frecuencia de osteoblastos influye directamente en la población de células primitivas hematopoyéticas. En uno de los estudios se usaron ratones transgénicos, donde se activó constitutivamente el receptor para la hormona paratiroidea (HPT) y el péptido relacionado a HPT, específicamente en osteoblastos (Calvi *et al.*, 2003); mientras que en el segundo estudio usaron ratones condicionales, donde se disminuyó la expresión del receptor tipo 1A de la proteína morfogenética ósea (BMPRIA) (Zhang *et al.*, 2003). En ambos estudios, demostraron que al inducir el incremento de células osteoblásticas N-caderina⁺ CD45⁻, se incrementa drásticamente el número de células progenitoras y troncales hematopoyéticas en médula ósea.

No obstante, el nicho osteoblástico es quizá el nicho más controversial, ya que existen evidencias que ponen en duda lo imprescindible de éste. Por ejemplo, se propuso por mucho tiempo que el estado hipóxico de las CTHs, así como el estado quiescente relacionado a él, está directamente relacionado a su localización dentro de la médula ósea (Winkler *et al.*, 2010). Dicha evidencia, aunada a la localización selectiva de las CTHs en el endostio, colocó a los osteoblastos como células indispensables para el mantenimiento de las CTHs. Sin embargo, en el año 2013 se observó que el estado hipóxico parece ser inherente a las CTHs, ya que la mayoría de ellas, a pesar de estar en la zona del endostio, no están en contacto directo con osteoblastos (Nombela-Arrieta *et al.*, 2013; Lo Celso *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009), o bien, quizá el estado hipóxico no es controlado necesariamente por un ambiente hipóxico.

Además, cuando en modelos murinos se disminuyó la producción del factor de células troncales (SCF, del inglés *Stem Cell Factor*) y de la quimiocina CXCL12, en osteoblastos, no se obtuvo cambio aparente en la proporción de las CTHs, ni en su funcionalidad. En cambio, al disminuir la producción de las mismas citocinas en células endoteliales y perivasculares sí hay una disminución drástica de CTHs (Ding *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha reportado que la osteopontina secretada por células osteoblasticas regula negativamente el número y función de las CTHs, mediante la expresión de Jagged y Angiopoietina-1 (Stier *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 2005). Estas evidencias sugieren que sólo bajo ciertas condiciones, hasta el momento no bien definidas, el nicho osteoblástico conforma un nicho esencial para el mantenimiento de las CTHs.

Nicho estromal

Este nicho tiene una alta heterogeneidad celular, ya que están implicados diversos tipos celulares derivados de las células troncales mesenquimales.

Las células CD146⁺ PDGFR- α CD51⁺ Nestina^{med} han sido localizadas cercanas a las CTHs. Las células Nestina^{med} expresan CXCL12 y SCF, por lo que se les involucra en la retención y mantenimiento de las CTHs en el nicho. Su presencia aumenta la expansión de progenitores multipotentes hematopoyéticos en modelos de trasplante murino (Pinho *et al.*, 2013). Además, presentan una asociación importante con terminaciones nerviosas adrenérgicas y están involucradas en cambios en la homeostasis mediados por ciclos circadianos (Mendez-Ferrer *et al.*, 2010).

Sean Morrison y colaboradores reportaron que las células mesenquimales que expresan el receptor asociado a Leptinas (LepR) -lo que identifica a células mesenquimales primitivas en médula ósea adulta de ratón-, son parte esencial del nicho de las CTHs. Ellos mostraron que la mayor parte de células mesenquimales que secretan CXCL12 y SCF, expresan el marcador LepR. Cuando se eliminan las células LepR⁺ en un modelo murino, mediante un sistema de recombinasa Cre, las población de células hematopoyéticas troncales y progenitoras disminuye

drásticamente (Ding *et al.*, 2012). Además, posteriormente se mostró que las células mesenquimales que expresan el marcador LepR están en relación directa con sinusoides de la médula ósea (Kunisaki *et al.*, 2013), lo que las coloca como componentes importantes del nicho perivascular.

Otro tipo de células mesenquimales son las células reticulares con alta expresión de CXCL12 (llamadas células CAR por su nombre en inglés “*CXCL12-abundant reticular cells*”) de las cuales se ha mostrado su capacidad de regular la autorrenovación, proliferación y migración de las CTHs en modelos murinos (Sugiyama *et al.*, 2006). La mayor parte de las células CAR también expresan el marcador LepR, y su eliminación disminuye a su vez las CTHs quiescentes (Omatsu *et al.*, 2010)

Nicho vascular

La médula ósea es un tejido altamente vascularizado, compuesto principalmente por sinusoides y en menor proporción arteriolas y capilares (Kunisaki *et al.*, 2013). En uno de los estudios pioneros en la tipificación del microambiente hematopoyético, se mostró que las CTHs (identificadas mediante marcadores de la familia SLAM: CD150⁺ CD244⁻ CD48⁻) se encuentran preferentemente asociadas al endotelio sinusoide que irriga a la médula ósea (Kiel *et al.*, 2005). Dicha identificación mostró por primera vez una evidencia basada en información anatómica sobre el papel que el nicho vascular podría tener en el mantenimiento de las CTHs, y de la hematopoyesis misma.

Durante los últimos años, la asociación de las CTHs con el nicho vascular se ha corroborado mediante marcajes más específicos. En estudios con microscopia confocal de alta resolución y marcajes multiparametricos, se ha observado en modelos murinos que la mayoría de células primitivas hematopoyéticas (con fenotipos: a) Lin⁻ c-kit⁺; b) Lin⁻ Sca-1⁺ c-kit⁺; c) Lin⁻ CD48⁻ CD41^{lo/-} c-kit⁺ se encuentran cercanas a la vasculatura, es decir, a menos de 10µm de distancia (Nombela-Arrieta *et al.*, 2013). Además, por medio de la detección del gen *Hoxb5*, cuya expresión es

específica en las CTHs *long-term* (CTHs-LT), sabemos que más del 90% de las CTHs-LT se encuentran en estrecha relación con el nicho perivascular (Chen *et al.*, 2016).

Por otro lado, no sólo se ha asociado al nicho vascular la capacidad de retención de CTHs-LT, sino que se ha observado que posee los elementos suficientes para promover la proliferación (Winkler *et al.*, 2012), diferenciación y movilización de las CTHs (Passegué *et al.*, 2005; Kopp *et al.* 2005). Por ejemplo, se ha reportado que a través de la expresión de E-selectinas, expresada constitutivamente en las células endoteliales de médula ósea murina, se promueve la salida de quiescencia y la proliferación de las CTHs (Winkler *et al.*, 2012). Este proceso resulta imprescindible en el mantenimiento de la homeostasis y en la recuperación de la hematopoyesis después de una mieloablación.

El nicho vascular es una fuente imprescindible de factores solubles que regulan la hematopoyesis. Heather y colaboradores reportaron que la pleiotropina (PTN), secretada por células endoteliales y células perivasculares, regula el mantenimiento de las CTHs en médula ósea. Los ratones condicionales para PTN presentaron disminución en su población troncal y progenitora hematopoyética en bazo y en la médula ósea, en comparación con los ratones silvestres en los que la PTN no presentó alteraciones. Además, se mostró que los ratones a los que se inhibió la acción de la PTN, por medio de anticuerpos específicos, disminuyeron su capacidad de retención de las CTHs en médula ósea y favoreció la movilización fuera de su nicho (Himburg *et al.*, 2012).

Otro factor crucial en el mantenimiento de las CTHs es el SCF. Se ha sugerido que la principal fuente del SCF son las células endoteliales y las células perivasculares de médula ósea. Además, se ha observado la importancia que tiene el SCF secretado por el nicho vascular, en el mantenimiento de CTHs (Ding *et al.*, 2012). Aunado a esto, se ha reportado que el SCF promueve la estabilización de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α , del inglés hipoxia-inducible factor 1A), incluso en ausencia de hipoxia. Además, HIF-1 α a su vez tiene gran

relevancia en la autorrenovación de las CTHs (Pedersen *et al.*, 2008).

Uno de los trabajos que han aclarado algunos aspectos sobre el nicho vascular y sus efectos sobre las CTHs, fue el estudio liderado por Paul Frenette donde se mostraron claras diferencias entre el nicho vascular que proporcionan los sinusoides y el nicho vascular de las arteriolas. A pesar de que una parte de la población de CTHs ($\text{Lin}^- \text{CD48}^- \text{CD41}^{\text{lo}/-} \text{c-kit}^+$) se encuentran en estrecha relación con los sinusoides, como ya se había mostrado anteriormente, se observó que las CTHs arrestadas en G_0 se encuentran cercanas a las arteriolas ubicadas en el endostio de médula ósea (identificadas mediante el marcador NG2 de pericitos). En cuanto a la distribución de CTHs que se encuentran activas en el ciclo celular, se mostró que se asocian a los sinusoides (identificados por el marcador LepR). Además, las CTHs en ciclo pueden ubicarse en los sinusoides de la zona central de la médula ósea, a diferencia de lo que ocurre con las células en quiescencia, que siempre se encuentran en el endostio (Kunisaki *et al.*, 2013).

La secreción de diversos factores solubles al microambiente regula una red extensa y compleja de señales que transitan en ambas direcciones: célula hematopoyética-célula estromal, y viceversa. A través de estas señales se mantiene la homeostasis hematopoyética. Sin embargo, existen una inmensa variedad de situaciones en donde la homeostasis hematopoyética se ve modificada; por ejemplo, en una pérdida de sangre aguda o en una infección, donde la hematopoyesis debe controlarse y modificarse meticulosamente.

A pesar de la fina regulación que coordina el proceso de hematopoyesis, pueden ocurrir disrupciones a nivel génico, celular o microambiental. Dichas fallas pueden ser permisivas e inductoras al desarrollo de patologías hematológicas, como el caso de la leucemia mieloide crónica.

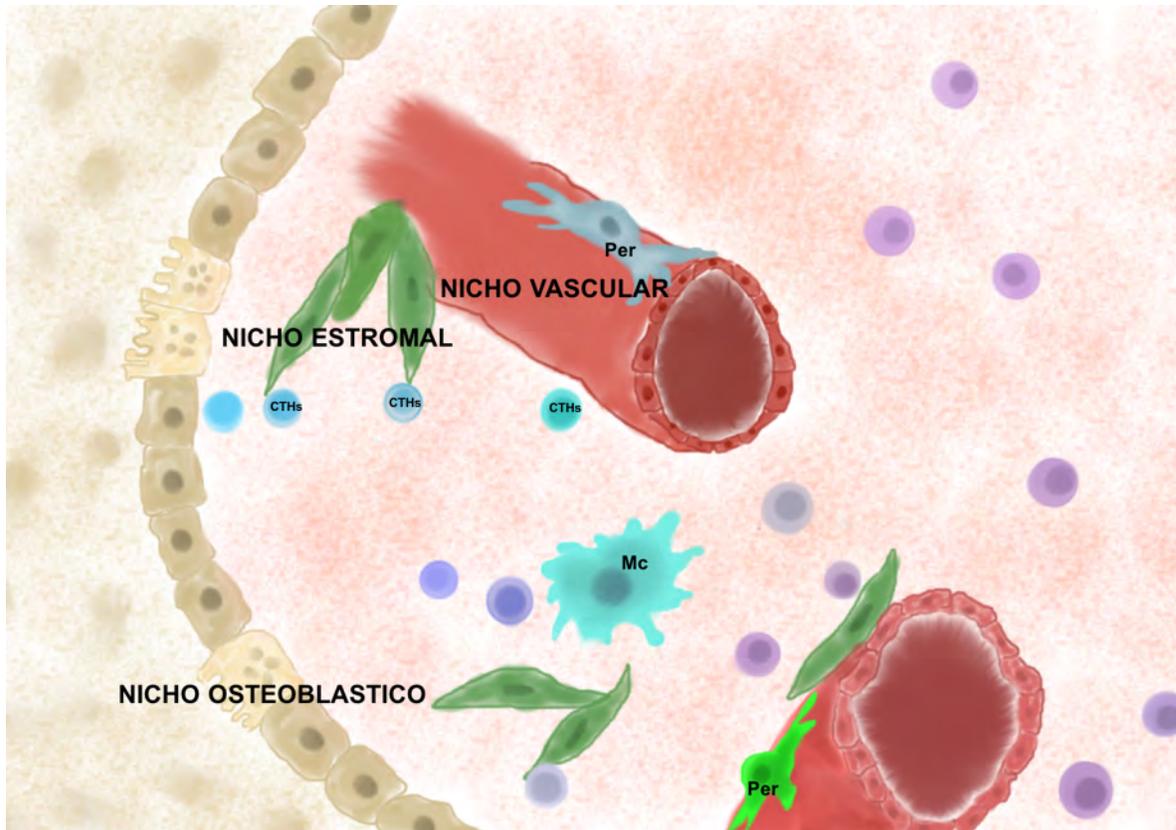


Figura B. Composición del Nicho hematopoyético. El esquema muestra que las células troncales hematopoyéticas (CTHs) se encuentran principalmente adyacentes a las arteriolas (Nicho vascular) que irrigan la zona trabecular de la médula ósea. En estos sitios se ha mostrado que las células endoteliales y las células mesenquimales perivasculares (Per) (Nicho Estromal) mantienen a las CTHs mediante la producción de SCF, CXCL12, PTN, y probablemente otros factores solubles no descritos. También están implicadas otro tipo de células en el mantenimiento del nicho de las CTHs, como los osteoblastos (Nicho osteoblástico), que contribuyen al mantenimiento de las zonas trabeculares y algunos trabajos han mostrado que su modificación altera la hematopoyesis, principalmente la diferenciación de ciertos progenitores linfoides mediante la secreción de factores como CXCL12. Además, existen otros factores importantes dentro de la médula ósea que son capaces de alterar el mantenimiento y funcionamiento de las CTHs, como algunas células hematopoyéticas maduras, como los macrofágos (Mc), los cuales son importantes en la retención y salida de las CTHs, bajo estímulos con GM-CSF.

Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa de naturaleza clonal, que se caracteriza por presentar un número excesivo de células mieloides en diferentes estadios de maduración, tanto en médula ósea como en sangre periférica.

La LMC corresponde al 15% de las leucemia presentes en adultos. Según datos del programa “Vigilancia, Epidemiología y Resultados finales” del Instituto Nacional de

Salud (NIH, por su siglas en inglés), por cada 100,000 habitantes hay 1.8 casos de LMC y el número de muertes es de 0.3, también por cada 100,000 habitantes. Lo cual es calculado con base en los casos reportados entre 1992 y 2013. El NIH estima que para finales de 2016, existirán 8,220 casos reportados en todo el mundo, con 1,070 muertes asociadas (SEER NIH, 2016). La LMC es más recurrente entre los individuos que se encuentran entre los 65 y 74 años, teniendo una edad promedio al diagnóstico de 64 años (SEER NIH, 2016).

Cromosoma Philadelphia

Aunque la etiología de la LMC no está totalmente establecida, se sabe que gran parte del inicio, desarrollo y mantenimiento de la enfermedad se debe a la translocación recíproca que ocurre entre los brazos largos del cromosoma 9 y el cromosoma 22. Dicho rearrreglo cromosómico da como resultado un cromosoma 22 anormalmente corto, el cual contiene al gen de fusión Bcr-Abl, también conocido como cromosoma Philadelphia. Bcr-Abl es un oncogen que codifica para la proteína bcr-abl, con actividad constitutiva de tirosina cinasa (Nowell y Hugerford, 1960; Rowley, 1973). Dicha actividad de tirosina cinasa es responsable de iniciar y mantener el fenotipo leucémico en las células Ph+, ya que bcr-abl fosforila, activa y desregula proteínas intracelulares implicadas en vías de señalización que culminan en la desregulación de la proliferación, supervivencia, evasión de apoptosis, rearrreglo del citoesqueleto, entre otras (Avilés-Vázquez *et al.*, 2013). Todos estos procesos conducen en último término hacia una proliferación y diferenciación celular descontroladas, asociadas con el origen y mantenimiento a la LMC.

Desarrollo de la LMC

La leucemia mieloide crónica es clasificada en tres fases principales: fase crónica, fase acelerada y la crisis blástica. En la fase crónica, las células leucémicas conservan la capacidad de diferenciación, por lo que se puede encontrar maduración normal y completa en el linaje mieloide. En la fase crónica de la LMC los blastos comprenden no más del 10% del total de glóbulos blancos en sangre. En esta fase se encuentran la mayor parte de los pacientes al diagnóstico, es una fase indolente y su duración es larga, pueden estar en la misma fase hasta por 4

años (Avilés-Vázquez *et al.*, 2013).

La fase acelerada de la LMC es una etapa transitoria, por lo que no en todos los pacientes se detecta. En ella, los blastos en sangre periférica y en médula ósea pueden oscilar entre el 10 al 19% y aunque se registra un aumento de blastos, las células aún tienen capacidad de llevar a término su diferenciación celular (Avilés-Vázquez *et al.*, 2013; Calabreta *et al.*, 2004)

En la crisis blástica, fase final de la enfermedad, los blastos en sangre periférica se encuentran en una proporción mayor o igual al 30%. En esta última fase se presenta arresto de la diferenciación al linaje mielóide y la supervivencia promedio de los pacientes llega a tan sólo unos cuantos meses (Calabreta *et al.*, 2004).

Células Troncales Leucémicas

Al igual que la hematopoyesis normal, la hematopoyesis en la Leucemia Mielóide Crónica se deriva de una población celular muy específica: la célula troncal leucémica (CTL) o célula iniciadora de la leucemia (CIL). La CTL comparte características inmunofenotípicas y funcionales con las células troncales hematopoyéticas normales, pues tienen la capacidad de autorrenovarse, dividirse y dar lugar a linajes celulares heterogéneos (Bonnet *et al.*, 1997). Sin embargo, la mayoría de los progenitores en LMC tienen una mayor capacidad proliferativa comparado con los progenitores normales (Eaves *et al.*, 1998).

Tanto las células troncales como las células progenitoras leucémicas conviven con células hematopoyéticas primitivas normales; además, ambas expresan un patrón inmunofenotípico muy semejante al de su contraparte normal (Columbel *et al.*, 1983; Bonnet *et al.*, 1997), lo que hace muy complicado distinguir un tipo celular del otro. Sin embargo, en años recientes se han propuesto algunos marcadores que se expresan exclusivamente en las células de LMC con inmunofenotipo troncal (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁻). La proteína accesoria del receptor de Interleucina 1 (IL-1RAP) se encuentra sobre expresada en células Lin⁻CD34⁺ y Lin⁻CD34⁺CD38⁻ de LMC, y también en células transformadas CD34⁺ de cordón umbilical (por expresión

retroviral de BCR-ABL1), por lo que se mostró que IL-1RAP es un buen marcador para identificar a células con fenotipo troncal Ph⁺ (Järås et al., 2010). Por otro lado, se identificó al marcador CD26, también conocido como dipeptidilpeptidasa-IV (DPP-IV). En ensayos funcionales, CD26 fue identificado como un blanco enzimático que interrumpe el eje CXCL12-CXCR4 mediante la ruptura de CXCL12. CD26 no fue detectado en CTHs normales, ni en otras patologías hematológicas, por lo que resulta un buen biomarcador para las CTL de la LMC, además de tener importancia en el curso clínico de la enfermedad (Herrman *et al.*, 2014). Por último, recientemente se identificó otro marcador específico de CTL, la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25), que es un marcador de CTL de LMC, dependiente de STAT5 (Sadovnik *et al.*, 2016)

Tratamiento de la LMC

El tratamiento de primera línea que se da a pacientes con LMC es el mesilato de Imatinib (STI571; Gleevec), un agente inhibidor de tirosinas cinasas (ITC) capaz de inhibir la actividad de BCR-ABL. Imatinib bloquea la actividad de la cinasa de tirosina ABL y su derivado, la proteína de fusión BCR-ABL. Imatinib actúa mediante la inhibición competitiva del sitio catalítico de BCR-ABL, bloqueando el sitio de unión a ATP. Sin embargo, hay pacientes que presentan resistencia a Imatinib por lo que se diseñaron fármacos de segunda generación capaces de actuar con mayor potencia y eficacia en pacientes que presentan mutaciones, muchas de ellas responsables de algunos tipos de resistencia a Imatinib; los inhibidores de tirosina cinasa de segunda generación son: Dasatinib y Nilotinib (Avilés-Vázquez *et al.*, 2013). El NIH reportó que entre 2006 y 2012, los pacientes que tienen una supervivencia de 5 años después del diagnóstico corresponde al 65.1% (SEER NIH, 2016), lo cual se debe principalmente al uso de los inhibidores de tirosina cinasa antes mencionados.

Nicho Leucémico

Definimos como nicho hematopoyético leucémico a los sitios donde se encuentran las CTL, estos sitios son capaces de regular la autorrenovación, proliferación y diferenciación de las CTLs. Aunque la descripción del nicho leucémico es un tema

que se encuentra bajo profundo análisis, algunos datos han mostrado semejanzas con el nicho hematopoyético normal.

En el caso de la LMC, se ha descrito que las CTHs Ph⁺ que se encuentran dentro de la zona del endostio, poseen resistencia contra Inhibidores de Bcr-Abl, mismos que se consideran como fármacos de alta eficacia. *In vitro*, la resistencia observada hacia los ITC se ve aumentada cuando células primitivas de LMC están en presencia de componentes microambientales, ya que se ha observado que las células mesenquimales pueden alterar vías dependientes de Wnt-βcatenina en las células primitivas de LMC (Zhang *et al.*, 2013). Aunado a lo anterior, el grupo de Naoe, reportó que al introducir células leucémicas provenientes de pacientes con LMC en ratones NOD/SCID, las células migran a la zona del endostio en la médula ósea. No obstante, cuando a los ratones se les administra Ara-C, las células leucémicas se establecen preferentemente cerca de la vasculatura, en la diáfisis (Ninomiya *et al.*, 2007).

En modelos murinos se ha observado que la glicoproteína CD44 tiene un papel central en el proceso de *homing* y en el injerto de células Ph⁺ en la médula ósea de ratones (Krause *et al.*, 2006). Dicho papel de CD44, no se ha observado en las CTHs normales. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-CD44, en ratones humanizados (RAG-/-GC-/-mice) trasplantados con células humanas CD34⁺ de LMC en crisis blástica, reduce drásticamente el número de células primitivas de LMC en los nichos, además de disminuir la capacidad de autorenovación en las CTLs, después de trasplantes seriados (Krause y Scadden, 2015).

Las selectinas, como E-selectina y sus ligandos, tienen una función crítica en el proceso de injerto de las células iniciadoras de la leucemia (Krause *et al.*, 2014), asimismo la inhibición de E-selectina con una molécula antagonista pequeña (GMI1271) reduce el número de CTL de LMC (Aggoune *et al.*, 2014).

En la LMC se ha reportado que los progenitores tienen una deficiencia en la vía de CXCR4, ya que la oncoproteína BCR-ABL disminuye la expresión del receptor CXCR4, lo que impide la adhesión de las células de LMC al estroma de la médula ósea. Dicha disrupción de la unión de CXCR4 con su ligando CXCL12, provoca la circulación anormal de progenitores hematopoyéticos. Aunado a estas evidencias, diferentes análisis de microscopía *in vivo*, sugieren que las CTL BCR-ABL1+ se pueden encontrar más lejos del endostio que las CTHs normales; esto puede ser debido a la desregulación de CXCR4 (Tabe *et al.*, 2008).

El SCF promueve la estabilización de HIF-1 α , el cual se ha mostrado que es necesario para la autorenovación de las células iniciadoras de la leucemia (CIL) en modelos murinos de CML (Zhang *et al.*, 2012). En conjunto, estas evidencias sugieren que las células tumorales poseen la capacidad de remodelar nichos que favorezcan el mantenimiento de las CIL.

Se ha observado en modelos murinos que la modificación en la expresión de ciertas citocinas en el nicho hematopoyético de LMC, puede favorecer la expansión de células leucémicas relegando la contraparte normal. Por ejemplo, las CTL long term de LMC presentan una disminución en el *homing* y en la retención en la médula ósea, asociada al incremento de G-CSF, producido por las células leucémicas; así como por los bajos niveles de CXCL12 en el nicho de la médula ósea (Zhang *et al.*, 2012); además de que la presencia de CD26 en las CTLs de LMC está directamente relacionada a la ruptura de la interacción entre CXCR4 y CXCL12 (Herrman *et al.*, 2014).

Importancia del nicho vascular en leucemias

Se ha sugerido, que tal y como sucede en tumores sólidos, la vasculatura es de suma importancia en el mantenimiento de distintas leucemias. Por ejemplo, el VEGF es un factor que puede estar asociado al mantenimiento leucémico ya que algunas células leucémicas no sólo tienen la capacidad de secretar VEGF, sino que también expresan más receptores funcionales de VEGF (VEGFR), lo que resulta en la

generación de una secreción autocrina independiente de las células endoteliales (Dias *et al.*, 2000). Además, Shahun Rafii reportó que la vía de señalización de VEGFR-2/VEGF, tanto paracrina como autocrina, es esencial en el mantenimiento de un modelo de leucemia pro-mielomonocítica murina, puesto que el bloqueo de esta vía afecta al mantenimiento y la migración de las células leucémicas *in vivo* (Dias, *et al.*, 2001). En cultivos de células murinas de LMA con HUVEC VeraVec (CEs transfectadas con el gen *E4ORF1*), se mostró que en presencia del componente endotelial se expanden preferencialmente las células leucémicas con fenotipo primitivo, y éstas recapitulan la leucemia de manera más eficiente y agresiva (Poulos *et al.*, 2014). Además, en presencia de quimioterapéuticos como Ara-C, las CEs tienen un papel crucial en el mantenimiento de las células leucémicas (Ishikawa *et al.*, 2007), a través de factores de crecimiento como el VEGF (Poulos *et al.*, 2014), y probablemente otros que aún no se han reportado.

En el caso particular de la leucemia mieloide crónica, se ha reportado que hay aumento en la vasculatura de médula ósea leucémica. Además, existe incremento de los factores VEGF y bFGF en el plasma de los pacientes (Aguayo *et al.*, 2000). El mismo resultado se ha obtenido en el suero de ratones, cuando se induce trastornos parecidos a la LMC (Pedersen *et al.*, 2008). Aunado a esta característica, se mostró que los pacientes con incremento detectable de VEGF en plasma tienen peor pronóstico clínico y presentan mayor probabilidad de que la enfermedad progrese a una fase avanzada (Aguayo *et al.*, 1999). Además, de que en nuestro grupo de trabajo hemos detectado un bajo número de células formadoras de colonias endoteliales en médula ósea de LMC.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LMC se origina a partir de una población con características de troncalidad, que aunque comparten algunas propiedades con las células troncales normales, poseen claras diferencias. Prueba de ello es que en modelos *in vitro* las CTL no son capaces de responder a la estimulación de algunas citocinas reguladoras de la hematopoyesis (TPO, SCF, FLT3, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO), mientras que las CTHs normales sí responden bajo los mismos estímulos. Dicho hallazgo no recapitula lo observado *in vivo*, donde se observa una mayor proliferación de células leucémicas en comparación con su contraparte normal. Lo que sugiere que existen otros factores solubles provenientes del microambiente de médula ósea, que pueden regular el comportamiento observado *in vivo* de las células primitivas hematopoyéticas leucémicas.

Por otro lado, se ha reportado que el nicho vascular es sumamente importante en el mantenimiento de las CTHs. Sin embargo, las células endoteliales, que son el principal componente del nicho vascular, no se encuentra en contacto directo con las CTHs y se ha reportado que su principal aporte a la regulación de la hematopoyesis es mediante la interacción de distintos factores solubles. Por lo que el presente trabajo plantea el desarrollo de un sistema *in vitro*, usando cultivos sin contacto, que permitan analizar la respuesta y comunicación biológica que se establece entre el componente endotelial y las células primitivas hematopoyéticas, tanto normales como leucémicas, a través de factores solubles. El presente trabajo podría tener gran importancia en el conocimiento biológico de la LMC, ya que el funcionamiento del componente endotelial en el mantenimiento de la LMC no ha sido analizado lo suficiente.

HIPÓTESIS

Debido a que el microambiente endotelial se ha asociado al mantenimiento de las CTHs, y por otro lado, también se ha asociado a con células hematopoyéticas activas en el ciclo celular, el componente endotelial favorecerá de manera preferencial la proliferación, expansión y permanencia de células primitivas (CD34⁺Lin⁻) hematopoyéticas leucémicas en relación con su contraparte normal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del microambiente endotelial *in vitro* sobre células primitivas (CD34⁺Lin⁻) hematopoyéticas, provenientes de individuos hematológicamente sanos y de individuos con LMC sin tratamiento previo.

OBJETIVOS PARTICULARES

A partir de co-cultivos sin contacto entre células primitivas (CD34⁺Lin⁻) hematopoyéticas (normales y leucémicas) y células endoteliales primarias, analizar en la población hematopoyética:

- La proliferación, expansión y diferenciación
- La permanencia de células primitivas Bcr-Abl positivas
- La producción diferencial de citocinas que resulta de los diferentes co-cultivos.

ANTECEDENTES

Datos encontrados por nuestro grupo de trabajo, han reportado que células hematopoyéticas primitivas de LMC *in vitro* responden de manera deficiente a la estimulación con citocinas estimuladoras de la hematopoyesis (TPO, SCF, FLT3, IL-6, IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO), mientras que las células hematopoyéticas normales, bajo los mismos estímulos, responden con una mayor proliferación y expansión (Chávez-González *et al.*, 2004), lo que sugiere que otros factores solubles presentes en el microambiente hematopoyético pueden estar fuertemente involucrados en el mantenimiento leucémico.

Dentro del microambiente hematopoyético normal se ha observado que las CTHs están fuertemente reguladas por el nicho vascular, tanto por sinusoides como por arteriolas que irrigan a la médula ósea; sin embargo, a pesar de que el principal componente de este nicho son las células endoteliales, no es común el contacto directo entre el endotelio y las CTHs, ya que existen células perivasculares, pericitos o células de músculo liso que impiden el contacto directo (Morrison y Scadden, 2014). Aunado a lo anterior, se han reportado factores solubles provenientes de células endoteliales que son imprescindibles para el mantenimiento de las CTHs, como SCF, CXCL12 (Ding *et al.*, 2012), PTN (Himburg *et al.*, 2012).

Recientemente fue descrito que células endoteliales derivadas de progenitores de sangre periférica (CESP) secretan altas concentraciones de Flt-3, GM-CSF e IL-3; además de ser capaces de producir en menor cantidad otros factores como SCF, EGF, FGF, VEGF, IL-1b, MIP-1 α , TNF- α , TPO, IL-3, IL-6, IFN- γ (Alvarado-Moreno *et al.*, 2016), citocinas que en mayor o menor medida, se han relacionado con el mantenimiento de las CTHs. Por otro lado, Chute y colaboradores mostraron que células endoteliales provenientes de diversos tejidos adultos humanos y no humanos, tienen capacidad de mantener la expansión de las CTHs murinas y humanas *in vitro* (Chute *et al.*, 2002, 2004, 2005, 2006), además, el grupo de Lee y colaboradores mostraron que el medio condicionado de muestras primarias de CEs, de microvasculatura porcina (libres de suero y en ausencia de factores de

crecimiento hematopoyéticos), induce una discreta expansión de células hematopoyéticas primitivas normales ($CD34^{+}Lin^{-}$), además de que promueven la expansión de distintos tipos de progenitores (evidenciado mediante la formación de colonias CFU-Mix, CFU-GM y BFU-E), resultado que es adjudicado a la secreción de EPO, IL-3 y GM-CSF por parte de las CEs (Davis, *et al.*, 1997).

Con estos antecedentes y teniendo como base que las células leucémicas no responden eficientemente a la estimulación de las principales citocinas estimuladoras de la hematopoyésis, resulta de particular importancia determinar cómo es el comportamiento de las células hematopoyéticas $CD34^{+}Lin^{-}$ humanas (normales y leucémicas) en respuesta a un microambiente endotelial.

METODOLOGÍA

Obtención de células hematopoyéticas.

Las muestras primarias de médula ósea normal (MON) fueron obtenidas a partir del raspado de la cresta iliaca de pacientes hematológicamente sanos, del Hospital General Regional No. 2 Villa Coapa, IMSS. Las muestras primarias de médula ósea leucémica, fueron obtenidas a partir del aspirado de médula ósea (extraída del esternón) de pacientes con LMC, provenientes del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades CMN La Raza, IMSS. En el criterio de inclusión para las muestras de LMC, incluimos a pacientes de reciente diagnóstico, en fase crónica de la enfermedad y sin tratamiento.

La obtención de muestras primarias fue realizada con previo consentimiento informado de los individuos y en estricto apego a los lineamientos institucionales, nacionales e internacionales vigentes.

Las muestras primarias de médula ósea, normales y leucémicas, se sometieron inicialmente a un gradiente de densidad con Ficoll-Paque Plus y posteriormente se colectó la fracción correspondiente a las células mononucleares (MNC), misma que fue enriquecida en células primitivas hematopoyéticas (CD34⁺Lin⁻).

Enriquecimiento de células primitivas hematopoyéticas (CD34⁺Lin⁻)

Células que expresan el antígeno CD34 y que carecen de antígenos asociados a linaje (CD34⁺Lin⁻) fueron enriquecidas a partir de la fracción de células mononucleares de muestras primarias de médula ósea normal y leucémica, mediante una columna magnética StemSepTM de selección negativa, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (StemCell Technologies Inc. Vancouver Canadá).

Cien millones de MNC fueron incubadas con una combinación de anticuerpos que contenía: anti-CD2 (para Linfocitos y algunas NKs), anti-CD3 (Linfocitos T), anti-CD14 (Monocitos y macrófagos), anti-CD16 (Monocitos), anti-CD19 (Linfocitos B),

anti-CD24 (Células B y granulocitos inmaduros), anti-CD56 (NKs), anti-CD66b (Neutrófilos) y anti-glicoforina A (Eritrocitos); la incubación ocurrió durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con un coloide magnético durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células, suspendidas en PBS con 3% de Suero Fetal Bovino (SFB), se pasaron por una columna magnética. Las células linaje positivas (Lin^+) fueron retenidas en la columna, mientras que las células $\text{CD34}^+\text{Lin}^-$ pasaron libremente por la columna magnética. La fracción $\text{CD34}^+\text{Lin}^-$ fue colectada, centrifugada y resuspendida en medio basal EBM-2™ SingleQuots, con el cual se comenzaron los cultivos en presencia de células endoteliales.

Muestras primarias de células endoteliales.

Las células endoteliales de sangre periférica (CESP) humana adulta fueron obtenidas a partir de muestras primarias de sangre periférica, provenientes de sujetos hematológicamente sanos. Asimismo, las células endoteliales derivadas de sangre de vena de cordón umbilical (HUVEC, por sus siglas en inglés) fueron obtenidas a partir de muestras primarias de cordones umbilicales frescos. Ambos tipos celulares fueron obtenidos en colaboración con el Laboratorio de trombosis, homeostasis y aterogenesis del Hospital General Gabriel Mancera, IMSS, a cargo del Dr. José Antonio Alvarado Moreno. El protocolo usado para la obtención de las CESP fue el reportado por Yoder y colaboradores (Critser *et al.*, 2010).

Las células endoteliales con inmunofenotipo $\text{CD45}^-\text{CD90}^-\text{CD31}^+$, fueron previamente procesadas y caracterizadas (Alvarado-Moreno *et al.*, 2016). Posteriormente se sembraron en cajas de 12 pozos tratadas previamente con colágena tipo I (BD Biosciences, Bedford, MA, USA). La siembra se realizó a distintas densidades, que van de 2×10^5 a 2×10^4 células, con la finalidad de manejar el mismo número de pasaje durante todo el co-cultivo. En todos los co-cultivos se usaron pasajes menores a 6.

Los cultivos se mantuvieron en crecimiento con medio EGM-2™ SingleQuots

enriquecido con factores (hFGF, VEGFM IGF-A, hEGF, Heparina, Hidrocortisona), al 10% de SFB definido y con 1% de Streptomina/Penicilina. Cada 48 o 72 horas se reemplazó el medio por medio fresco. Los cultivos fueron incubados a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Cultivos de células endoteliales con células hematopoyéticas CD34⁺Lin⁻

Las células hematopoyéticas CD34⁺Lin⁻ (de médula ósea normal o médula ósea leucémica) fueron cultivadas sobre una capa confluyente de CESP o HUVEC, previamente sembradas en placas de 12 pozos. Para evitar el contacto directo entre ambos tipos celulares, se colocaron 1x10⁵ células hematopoyéticas CD34⁺Lin⁻ sobre insertos Transwell (Costar) con membrana permeable de poliéster, con una porosidad de 0.4 µm.

Los cocultivos se mantuvieron durante 10 días con medio basal EBM-2, en total ausencia de citocinas y de SFB. Cada 72 horas se cambió el soporte Transwell a un nuevo pozo con células endoteliales confluyentes, bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

En cada cambio del soporte Transwell el medio condicionado resultante fue colectado, filtrado y almacenado a -20 °C, hasta la cuantificación de citocinas mediante el sistema Milliplex.

Proliferación

Después de haber transcurrido 5 y 10 días de cocultivo, el número total de células hematopoyéticas viables fue analizado. El conteo celular se realizó por exclusión con Azul de Tripiano, en un hemocitometro y el cálculo de proliferación se realizó de acuerdo a los cultivos tipo delta (Mayani *et al.*, 2009).

Ensayo de unidades formadoras de colonias.

Para evaluar funcionalmente a las células primitivas hematopoyéticas, después del co-cultivo con células endoteliales, se realizó un ensayo de unidades formadoras de

colonias. Para este ensayo se tomaron 5×10^3 células hematopoyéticas (normales o leucémicas) a los 5 y 10 días después del co-cultivo sin contacto con células endoteliales, y fueron sub-cultivadas en medio MethoCult (MethoCult H4434, StemCell Technologies - que contiene glutamina, 2-mercaptoetanol, IL-3, SCF, GM-CSF y EPO) y mantenidas durante 14 días a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Como control del experimento se utilizaron 5×10^3 células CD34⁺Lin⁻, de médula ósea normal o leucémica, sin ningún estímulo o co-cultivo previo.

Las colonias formadas fueron contadas después de 14 días y se clasificaron en tres tipos principales: **1)** Colonias mieloides, donde se incluyeron a las Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos (CFU-G, del inglés *Colony forming unit-granulocyte*) y se trata de progenitores clonogenicos de granulocitos que dan origen a poblaciones homogéneas de eosinofilos, basófilos y neutrófilos; las Unidades Formadoras de Colonias de Macrófagos (CFU-M, del inglés *Colony forming unit-macrophage*) que son progenitores clonogenicos de macrófagos que dan origen a poblaciones homogéneas de macrófagos; y las Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM del inglés *Colony forming unit-granulocyte, macrophage*) y se trata de progenitores que dan origen a poblaciones heterogéneas de granulocitos y macrófagos. **2)** Colonias eritroides, donde se incluyeron a las Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (CFU-E, del inglés *Colony Forming Unit-Erythroid*) que son progenitores que producen solo uno a dos clusters, los cuales contienen de 8 hasta máximo 100 eritroblastos hemoglobinizados, estos progenitores representan progenitores con mayor madurez y menor capacidad proliferativa; y las Unidades Formadoras de Brote Eritroide (BFU-E, del inglés *Burst forming unit-erythroid*) que corresponden a progenitores tempranos de eritrocitos y tienen alta capacidad proliferativa, pueden ser muy grandes (de más de 16 clusters) y están hemoglobinizados. **3)** Colonias mixtas, donde se incluyó a las Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos (CFU-GEMM, del inglés *Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte*) estas colonias

corresponden a los progenitores más primitivos que pueden dar origen a granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos, como su nombre lo indica.

Fenotipo

Para el análisis de inmunofenotipo las células hematopoyéticas fueron obtenidas tanto al día cero y sin previo cultivo con células endoteliales (CEs) como a los días 5 y 10 de co-cultivo con CEs. Las células fueron lavadas con PBS al 3% de SFB y posteriormente incubadas a 4°C durante 30 minutos y en completa oscuridad con los anticuerpos: CD34-FITC, CD38-APC, CD14-PE, CD10-BV421. Al cabo de este tiempo se realizó un lavado con PBS al 3% de SFB y las células fueron analizadas inmediatamente en el Citómetro de Flujo FACSCanto (BD Bioscience, USA). El análisis citométrico se realizó con el Software FlowJo X10.0.7.

Cuantificación de citocinas

El medio condicionado resultante de los cocultivos fue descongelado para realizar un ensayo con *MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Panel* (Merck Millipore, Billerica, MA). Este inmunoensayo permitió la cuantificación simultánea de las siguientes 15 citocinas humanas: VEGF-A, Flt3 ligando, GM-CSF, EGF, IL-3, IL-6, TNF- α , MIP-1 α , IFN γ , IL-1 α , FGF-2, G-CSF, SDF-1 α , LIF, SCF.

Las muestras fueron procesadas por duplicado siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ensayo fue leído en el equipo MAG-PIX, equipado con un Software de Análisis MILLIPLEX usando una fórmula de regresión no lineal de cinco parámetros para calcular concentraciones de la muestra a partir de las curvas estándar.

Detección del transcrito Bcr-Abl

La presencia de Bcr-Abl en las células hematopoyéticas de LMC se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase chain reaction*), de manera específica se realizó una PCR anidada. Las células hematopoyéticas primitivas se colectaron después de los ensayos de formación de

colonias, al día 0 y posterior a los 5 y 10 días de co-cultivo, se lavaron y centrifugaron para su posterior extracción de ARN. El ARN de cada una de las muestras fue extraído mediante Trizol, cloroformo e isopropanol, para posteriormente generar el DNA complementario (c-DNA) mediante transcripción inversa, este c-DNA constituye una secuencia complementaria al RNA a partir del cual se ha sintetizado. Posteriormente realizamos una PCR de punto final, sometiendo las muestras a 96°C-5min, (94°C-30seg., 60°C-1min., 72°C-1min) 35 ciclos y 72°C-10min. Usando los primers: 5'- GGAGTGTTCCTCCAGACTGTTG-3'

5'-ACAAGAGGGAGGTGATACGTGCGAG-3'

Finalmente, con la intención de determinar de manera más confiable la presencia o ausencia de Bcr-Abl, se realizó una PCR anidada sometiendo las muestras a 96°C-5min, (94°C-30seg., 61°C-1min., 72°C-1min) 30 ciclos y 72°C-10min con los primers:

5'-TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT-3'

5'-GGTTCGTTATGTAGTGCGGTCAGTTG-3'

En todos los casos se utilizó RNA de la línea celular K562 como control positivo y agua tratada con DEPC como control negativo de la reacción.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como la media \pm SEM. Para evaluar el comportamiento de las respuestas biológicas observadas en cada uno de los co-cultivos, se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple entre todos los grupos, con la prueba de Tukey. En caso de las comparaciones con respecto al control, después del ANOVA se realizó una comparación múltiple Dunnet. Una $p < 0.05$ fue considerada como significativa. El análisis estadístico se realizó en el Software GraphPad Prism 6.0c

RESULTADOS

Considerando que el modelo de estudio es un co-cultivo *in vitro*, y con el antecedente de que las células primitivas hematopoyéticas y las células endoteliales obtenidas a partir de muestras primarias requieren diferentes citocinas para su mantenimiento (Critser *et al.*, 2010; Chávez González *et al.*, 2004), inicialmente evaluamos los tiempos en que ambos tipos celulares pueden permanecer viables y morfológicamente sanos sin necesidad de adicionar factores de crecimiento o SFB. Dicha evaluación fue imprescindible, ya que ha sido descrito que los factores esenciales para el mantenimiento de las células endoteliales pueden alterar de manera directa a las células primitivas hematopoyéticas al tiempo que la ausencia de factores de crecimiento endotelial provoca muerte por apoptosis durante los primeros dos días de cultivo (Buttler *et al.*, 2010).

En ese sentido, encontramos que las células endoteliales (CESP y HUVEC) son capaces de permanecer en cultivos, sin SFB y sin factores de crecimiento, con la sola presencia de células hematopoyéticas CD34⁺Lin⁻ (de MON o LMC), durante máximo cuatro días de cultivo. No obstante, para mantener el cultivo en condiciones óptimas, se decidió mantener a las células CD34⁺Lin⁻ en presencia de la misma capa endotelial sólo por tres días, periodo en donde no se observan cambios en la morfología endotelial y donde la confluencia del endotelio es igual o mayor a 80% (Figura 1 y 2). Después de ese periodo las células hematopoyéticas CD34⁺Lin⁻ se colocaron en una nueva capa confluyente de endotelio (HUVEC o CESP, según corresponda).

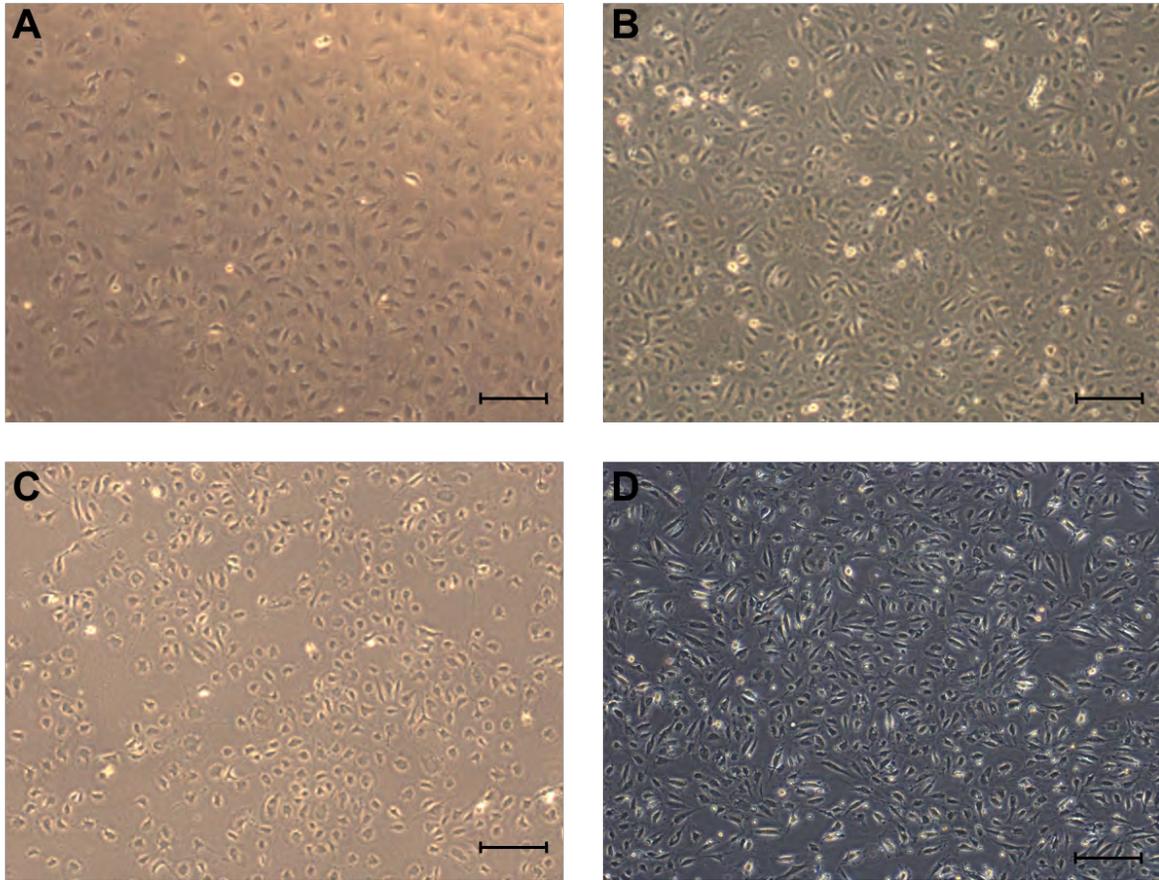


Figura 1. Confluencia de la capa celular endotelial. La figura muestra fotografías representativas de las poblaciones de células endoteliales utilizadas en el trabajo. **A y B.** Células HUVEC antes y después de 3 días de cultivo respectivamente. **C y D.** CESP antes y después de 3 días de cultivo respectivamente. Las fotografías del panel A y C, fueron mantenidas en medio completo y las fotografías del panel B y D corresponden al co-cultivo con células hematopoyéticas en presencia de medio basal. En todos los casos se observa una confluencia endotelial mínima del 80%. La barra corresponde a $200\mu\text{m}$.

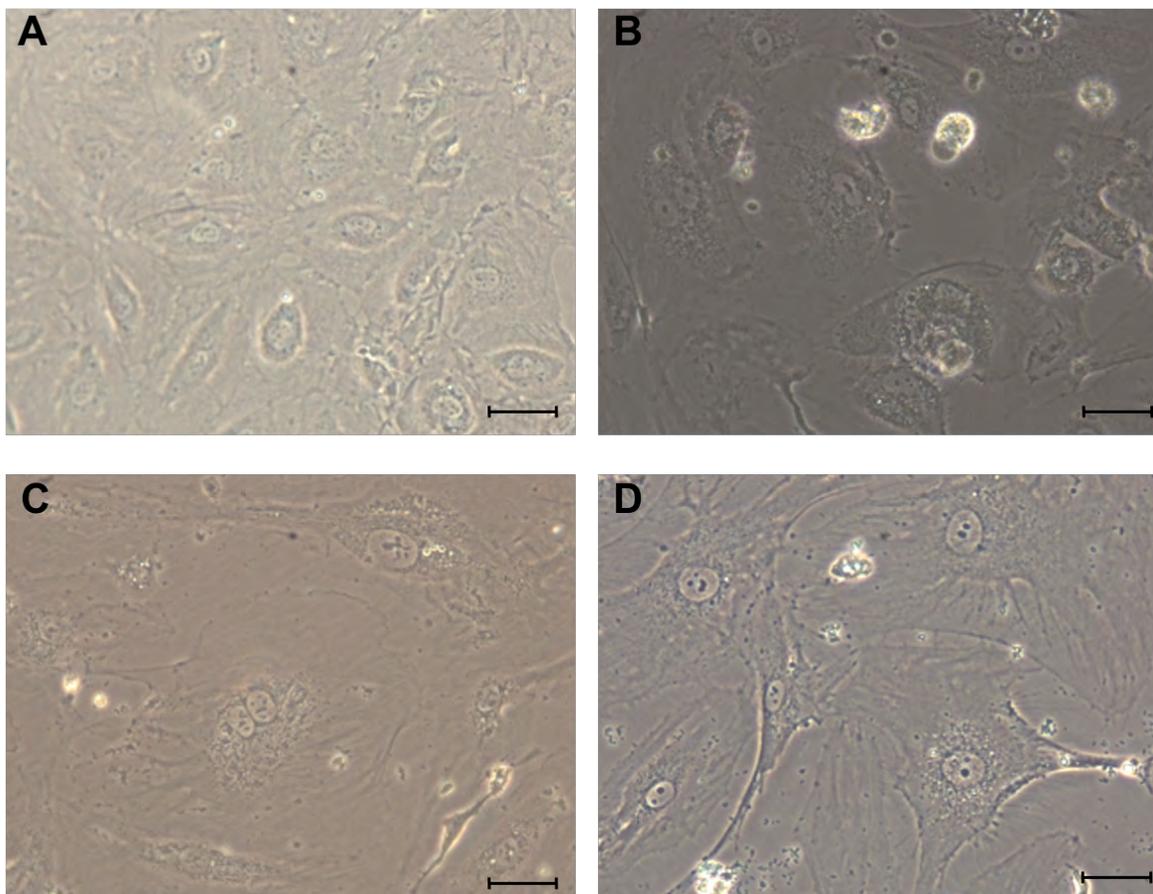


Figura 2. La morfología de las células endoteliales se mantiene sin cambios durante los co-cultivos con células hematopoyéticas $CD34^{+}Lin^{-}$. La figura muestra fotografías representativas de las poblaciones de células endoteliales utilizadas en el trabajo. **A y B.** Células HUVEC antes y después de 3 días de cultivo respectivamente. **C y D.** CESP antes y después de 3 días de cultivo respectivamente. Las fotografías del panel A y C, fueron mantenidas en medio completo y las fotografías del panel B y D corresponden al co-cultivo con células hematopoyéticas en presencia de medio basal. En todos los casos se observa una confluencia endotelial mínima del 80%. La barra corresponde a $30\mu m$.

Posteriormente se evaluó la proliferación de las células hematopoyéticas primitivas ($CD34^{+}Lin^{-}$), de MON o LMC, después 5 y 10 días de co-cultivo con células endoteliales (HUVEC o CESP). La evaluación del número celular total se realizó por conteo celular, tomando en cuenta sólo las células viables, por medio de la exclusión con el colorante azul de tripano.

Los resultados obtenidos muestran que las células endoteliales son capaces de mantener una proliferación moderada de las células hematopoyéticas normales,

tanto en MON con HUVEC, donde observamos un incremento del triple en el número celular total al día 10; como en MON con CESP, donde observamos un incremento del doble en el número celular total al día 10. Mientras que en ausencia del componente endotelial (MON/MB), el número celular disminuye drásticamente (Fig. 3).

En contraste, en las células primitivas hematopoyéticas ($CD34^+Lin^-$) de LMC no observamos mantenimiento de la proliferación, incluso en LMC con HUVEC observamos una disminución del número celular total en el día 10 de co-cultivo, lo que indicaría una inhibición de la proliferación en LMC/HUVEC. Mientras que en ausencia del componente endotelial (LMC/MB), el número celular $CD34^+Lin^-$ de LMC se mantiene a lo largo de los 10 días (Fig.3).

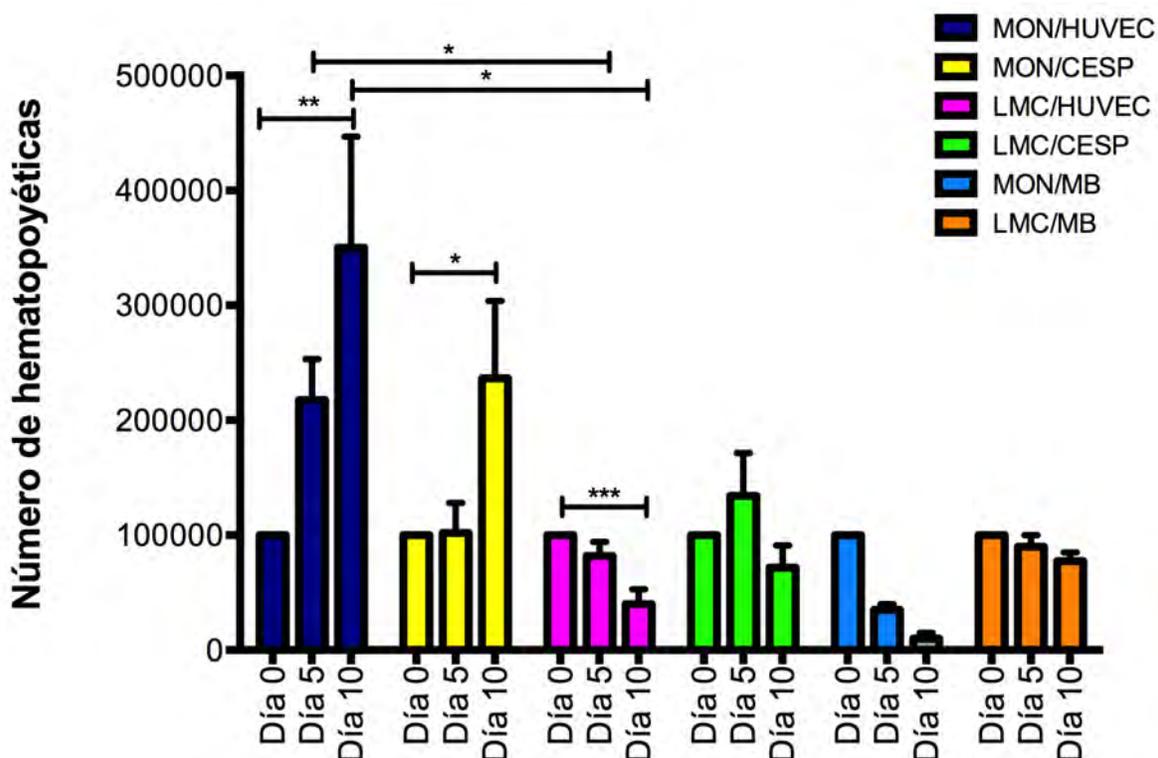


Fig 3. Las células endoteliales mantienen la proliferación de las células hematopoyéticas de MON, pero no en LMC. Número total de células hematopoyéticas de MON o de LMC durante los co-cultivos sin contacto con HUVEC o CESP. Como grupos control se cultivaron células $CD34^+Lin^-$ de MON (MON/MB) o de LMC (LMC/MB) en presencia de medio basal (MB). Todas las condiciones de cultivo comenzaron con 1×10^5 células en el día 0. El número total de células hematopoyéticas se cuantificó mediante exclusión por Azul de Tripano. Los valores representan la Media \pm SEM de experimentos independientes, por duplicado. MON/HUVEC (n=5), MON/CESP (n=5), LMC/HUVEC (n=4), LMC/CESP (n=4), MON/MB (n=2), LMC/MB (n=2). La comparación estadística se realizó entre la misma condición de co-cultivos a diferentes días, y entre MON y LMC con el mismo tipo endotelial y a días equivalentes. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

Una manera de determinar si la población celular, que se encuentra en los co-cultivos, mantiene sus características de células primitivas, es mediante ensayos de unidades formadoras de colonias, en cultivos semisólidos (descrita como expansión). Se tomaron 5000 células hematopoyéticas, provenientes de los diferentes co-cultivos, y se cultivaron en metilcelulosa por 14 días. Después de ese tiempo se evaluó la presencia de células formadoras de colonias (CFC), y se clasificaron con base en sus características morfológicas particulares, como se describe en el método. En cuanto a la morfología de las diferentes colonias observadas en MON o LMC, no encontramos diferencias (Fig. 4).

Al día 0, es decir, en células hematopoyéticas $CD34^+Lin^-$ sin previo co-cultivo, detectamos colonias mieloides (CFU-G, CFU-M, CFU-GM), eritroides (CFU-E, BFU-E) y mixtas (CFU-GEMM), tanto en MON como en LMC. En las fotografías de la figura 4 tan solo mostramos los cuatro tipos de colonias que encontramos con mayor frecuencia: CFU-G, CFU-M, BFU-E y CFU-GEMM.

Después de los co-cultivos observamos que el tipo de colonias encontradas dependía de la condición de co-cultivo, pues aunque en los co-cultivos con MON se mantuvo la presencia de colonias mieloides, eritroides y mixtas; en los co-cultivos de LMC encontramos que en presencia de HUVEC no se mantienen las colonias mixtas al día 10, y no en todos los co-cultivos observamos colonias eritroides. Mientras que en LMC con CESP sí encontramos todos los tipos de colonias, como ocurre en los co-cultivos de MON (Fig.4).

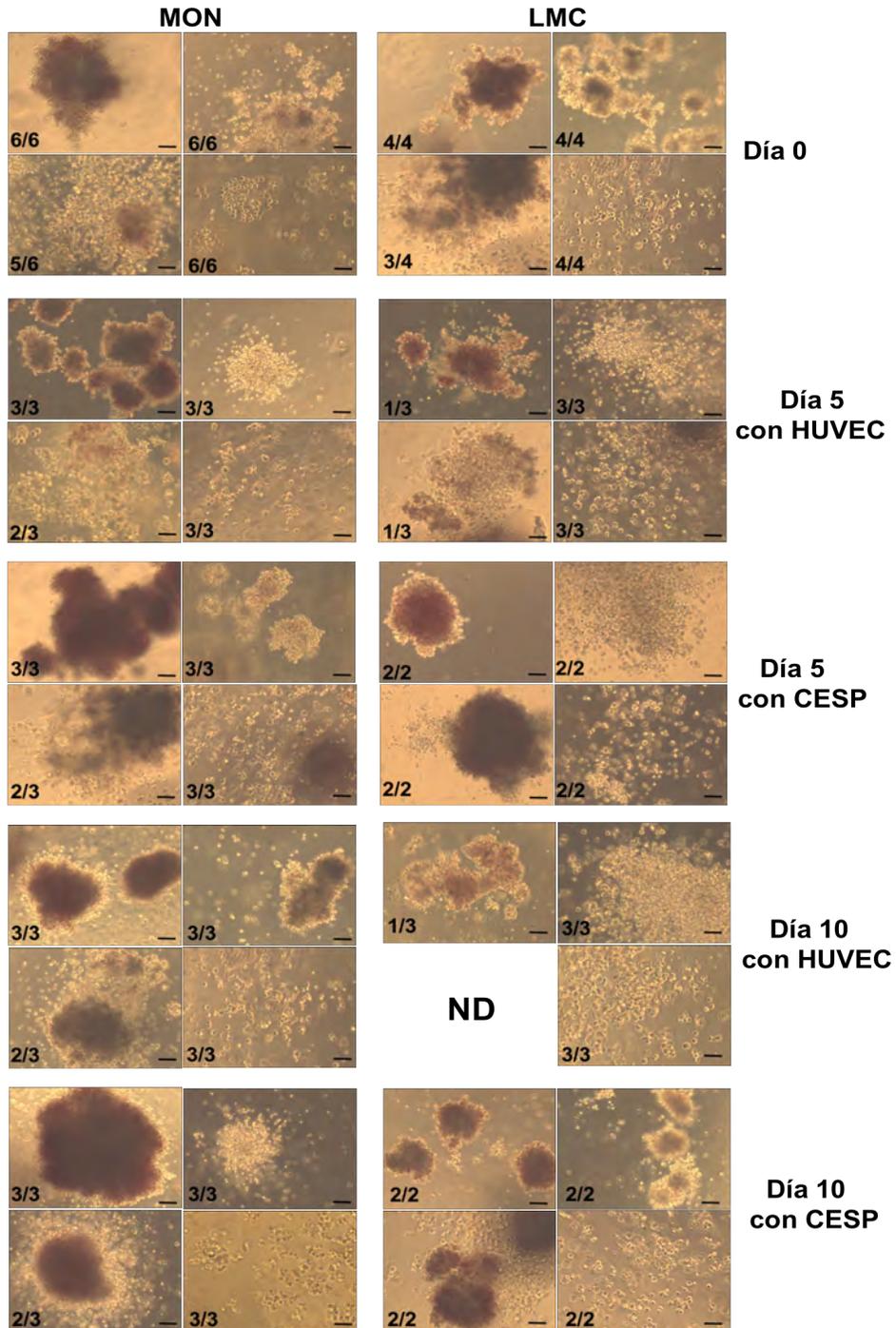


Figura 4. Las células HUVEC disminuyen la frecuencia de colonias eritroides y mixtas en células hematopoyéticas de LMC.

Cinco mil células hematopoyéticas provenientes de 5 o 10 días en co-cultivo, fueron sembradas en medio semisólido para después de 14 días evaluar las Células Formadoras de Colonias, mismas que de acuerdo a su morfología fueron agrupadas en: BFU-E, izquierda superior; CFU-G, derecha superior; CFU-GEMM, izquierda inferior; CFU-M, derecha inferior. Las fotografías muestran las colonias obtenidas en un solo experimento y los números en el inferior derecho de cada foto indican el número de ese tipo específico de colonias (numerador) observadas en experimentos independientes (denominador). ND= No detectada. La barra corresponde a 200 μ m.

Al contar y analizar el número total de CFC encontradas en cada una de las condiciones de co-cultivo, observamos un mayor número de CFC en LMC con respecto a las encontradas en MON. Sin embargo, conforme avanza el tiempo de co-cultivo las CFC se agotan, tanto en MON como en LMC. Es de particular importancia que en LMC/HUVEC el número total de CFC tiende a aumentar al día 5, a diferencia de lo observado en la normalidad (MON/HUVEC) (Fig. 5).

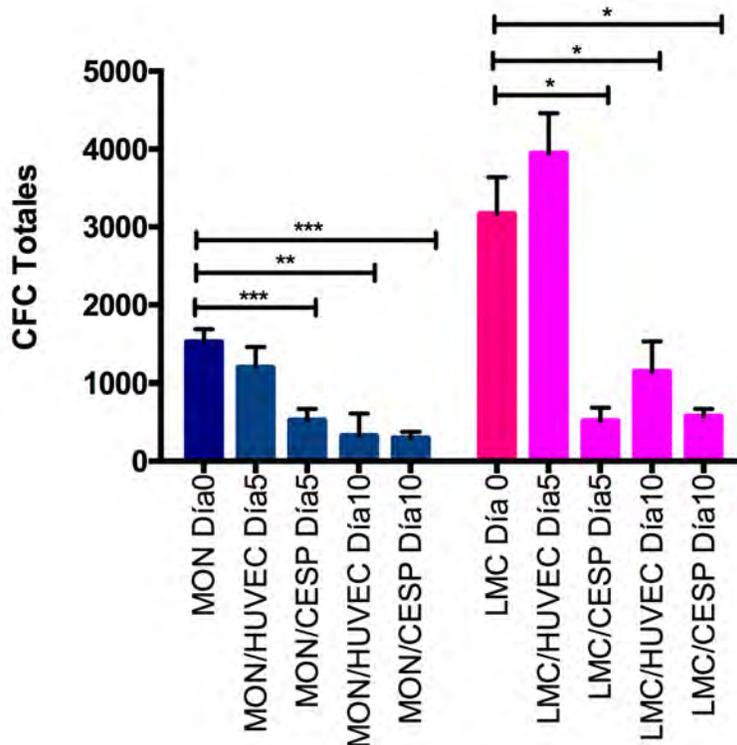


Figura 5. Las células endoteliales no mantienen la expansión de progenitores de MON y LMC. El número total de colonias encontrado en los diferentes días del co-cultivo fue evaluado y comparado de acuerdo al correspondiente control de día cero. Los valores representan la media ± SEM del número total de colonias a partir de 3 experimentos independientes por duplicado. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

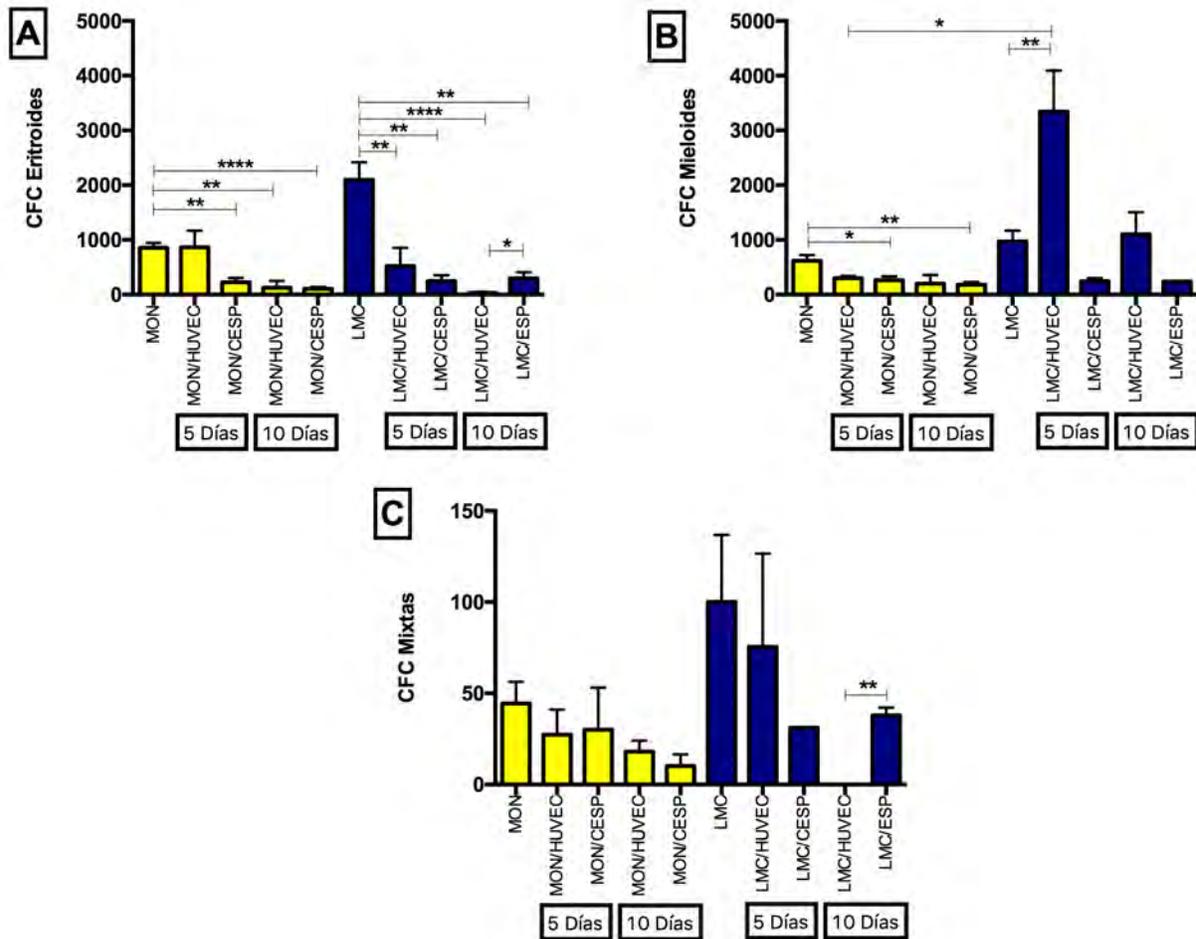


Figura 6. Las células endoteliales HUVEC favorecen la expansión de progenitores mieloides en LMC.

Las colonias totales obtenidas en cada uno de los co-cultivos, fueron agrupadas de acuerdo al tipo particular de progenitor en colonias: **A**, Eritroides; **B**, mieloides y **C**, mixtas, para después compararlas con el mismo tipo de colonias obtenidas al día cero. Los valores representan la media \pm SEM del número total de cada tipo de colonias a partir de 4 experimentos independientes por duplicado. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

Por otro lado, observamos que conforme avanza el tiempo de co-cultivo de MON, con HUVEC o CESP, disminuyen notablemente los tres tipos de colonias: Eritroides, Mieloides y Mixtas, aunque en esta última tan sólo observamos una tendencia hacia su disminución (Fig. 6). En el caso de los co-cultivos de LMC con HUVEC observamos que a partir del día 5 hay un incremento de colonias mieloides, de casi 4 veces más comparado con el tiempo 0, y casi 5 veces comparado con su contraparte normal (MON/HUVEC al día 5) (Fig. 5 B).

En cuanto a las colonias eritroides y mixtas, observamos que, tanto en LMC/HUVEC como en LMC/CESP, disminuyen a lo largo del co-cultivo, al igual que en la normalidad (Fig. 5A y 5C). Es importante resaltar que en los co-cultivos de LMC/HUVEC al día 10 hay una disminución significativa de las colonias eritroides y mixtas, en comparación con los co-cultivos de LMC/CESP (Fig. 5A y 5C). Estos resultados muestran que aunque se trata de poblaciones normales y leucémicas, inmunofenotípicamente equivalentes, el hecho de tener una fuente endotelial diferente, promueve la expansión de linajes específicos; en este caso HUVEC es capaz de favorecer la expansión de progenitores mieloides de LMC y no promueve la expansión de progenitores eritroides y mixtos. Sin embargo, los resultados muestran que los progenitores, tanto de LMC como de MON, se agotan a lo largo del co-cultivo.

Aunado a lo anterior y con la intención de conocer si existe un cambio en las poblaciones primitivas ($CD34^+Lin^-$) durante el co-cultivo, se evaluó la expresión de los antígenos de superficie asociados al inmunofenotipo primitivo: $CD34^+CD38^-$ para identificar a la población con inmunofenotipo troncal, $CD34^+CD38^+$ para identificar a la población progenitora, y $CD34^-CD38^+$ para la población precursora. También evaluamos la expresión de los antígenos CD14 y CD10, asociados a antígenos expresados en células mieloides y progenitores linfoides, respectivamente.

Los resultados muestran que cuando las células primitivas de MON o LMC se mantienen en co-cultivo con endotelio HUVEC o CESP, existe una tendencia a la reducción en la fracción con inmunofenotipo troncal, al mismo tiempo que se incrementa la población progenitora y precursora, sin encontrar diferencia entre la parte normal y leucémica (Fig. 7 y 8).

CD34

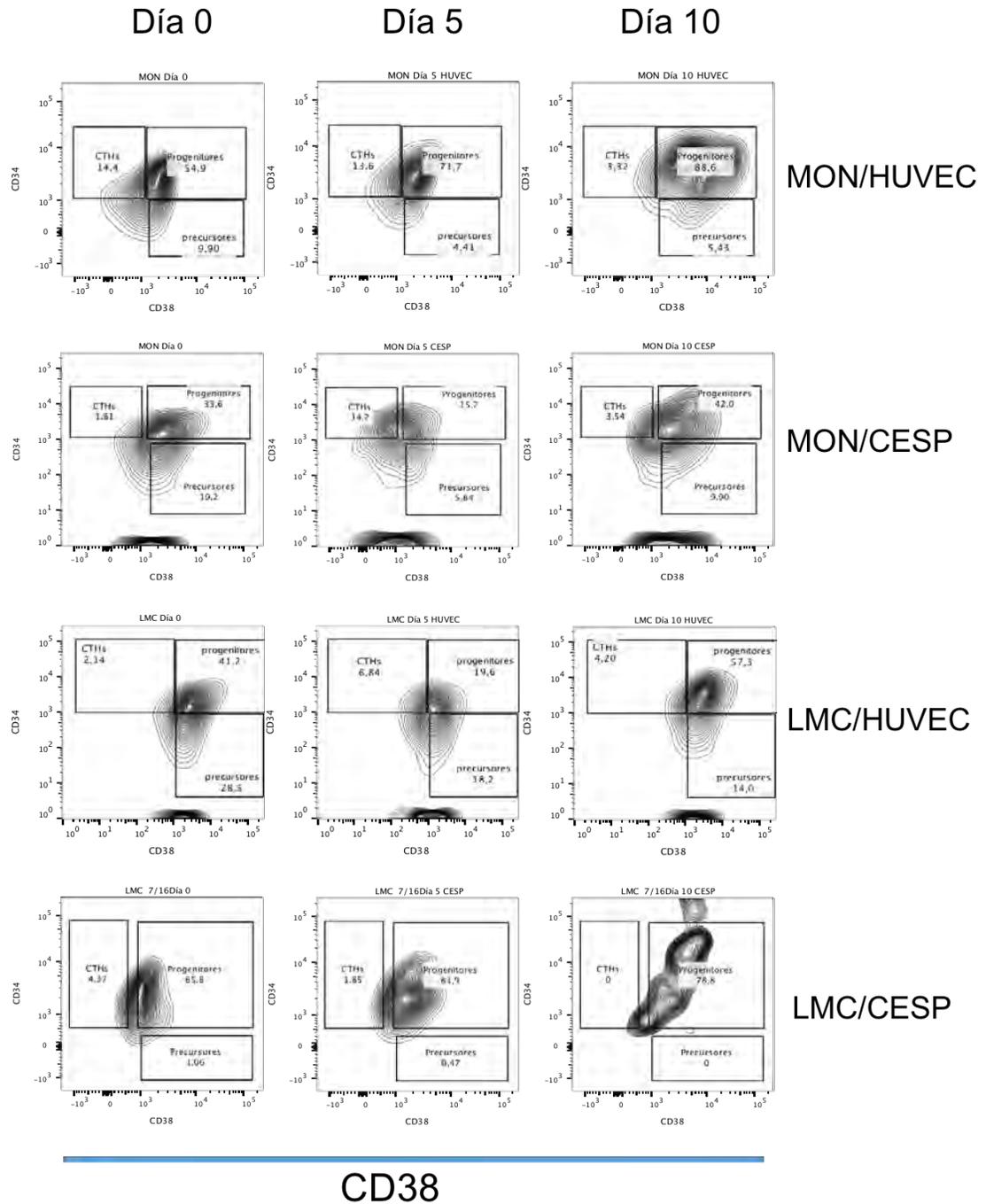


Figura 7. El co-cultivo con células endoteliales, induce la disminución del Inmunofenotipo primitivo. La presencia de células hematopoyéticas primitivas ($D34^+CD38^-$) fue analizado mediante citometría de flujo, a lo largo de los diferentes días del co-cultivo con células endoteliales. La figura muestra plots representativos en donde se observan las poblaciones troncales ($CD34^+CD38^-$), progenitoras ($CD34^+CD38^+$) y precursoras ($CD34^-CD38^+$). El número de cada recuadro indica el porcentaje detectado para cada una de las poblaciones celulares.

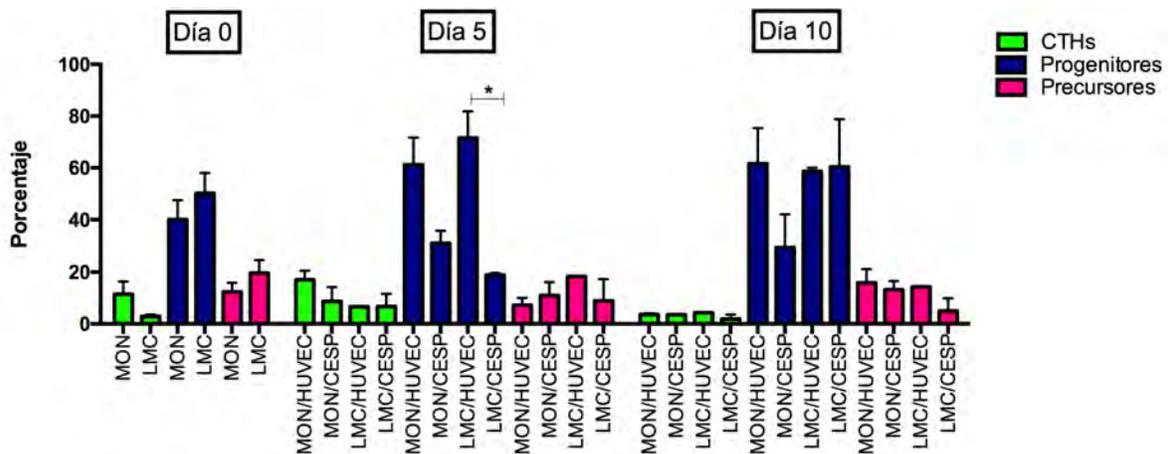


Figura 8. Pérdida del Inmunofenotipo primitivo durante el co-cultivo con células endoteliales.

El fenotipo de las células hematopoyéticas fue analizado antes y después del co-cultivo con células endoteliales, sin contacto, en ausencia de factores de crecimiento y SFB. Los valores representan la media \pm SEM del porcentaje de las diferentes poblaciones celulares a partir de 3 experimentos independientes, por duplicado. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$

Puesto que las células hematopoyéticas de MON y LMC, parecen perder el inmunofenotipo primitivo a lo largo de los co-cultivos, evaluamos si los diferentes co-cultivos modifican el patrón de diferenciación celular. Encontramos que el porcentaje y los tiempos de diferenciación celular varía dependiendo de la condición de co-cultivo evaluada. En las células $CD34^{+}Lin^{-}$ de MON y LMC en presencia de CESP observamos una diferenciación gradual (Fig. 9), observada por medio de la expresión de CD14 desde el día 5. Sin embargo, el porcentaje de diferenciación tiende a ser mayor en LMC/CESP en comparación con MON/CESP al día 10 (Fig. 10)

En cuanto a las células $CD34^{+}Lin^{-}$ de MON y LMC, que fueron cultivadas en presencia de HUVEC se detectó un patrón de diferenciación diferente, ya que mientras las células de MON con HUVEC se diferencian gradualmente a lo largo del tiempo, las células de LMC con HUVEC presentan una diferenciación lenta en los primeros 5 días de cultivo, pero se diferencian de manera abrupta hacia el día 10 del cultivo (Fig. 9), donde el porcentaje de expresión de CD14 es superior al 50%.

Tanto en MON con HUVEC como en MON con HUVEC, el porcentaje de expresión de CD14 hacia el día 10 es mayor al 50%, porcentaje mayor a lo observado en LMC y MON en presencia de CESP (Fig. 10). En conjunto, estos resultados nos sugieren que las células HUVEC promueven una rápida diferenciación hacia el linaje mieloide en MON y LMC, en comparación con lo observado en presencia de CESP.

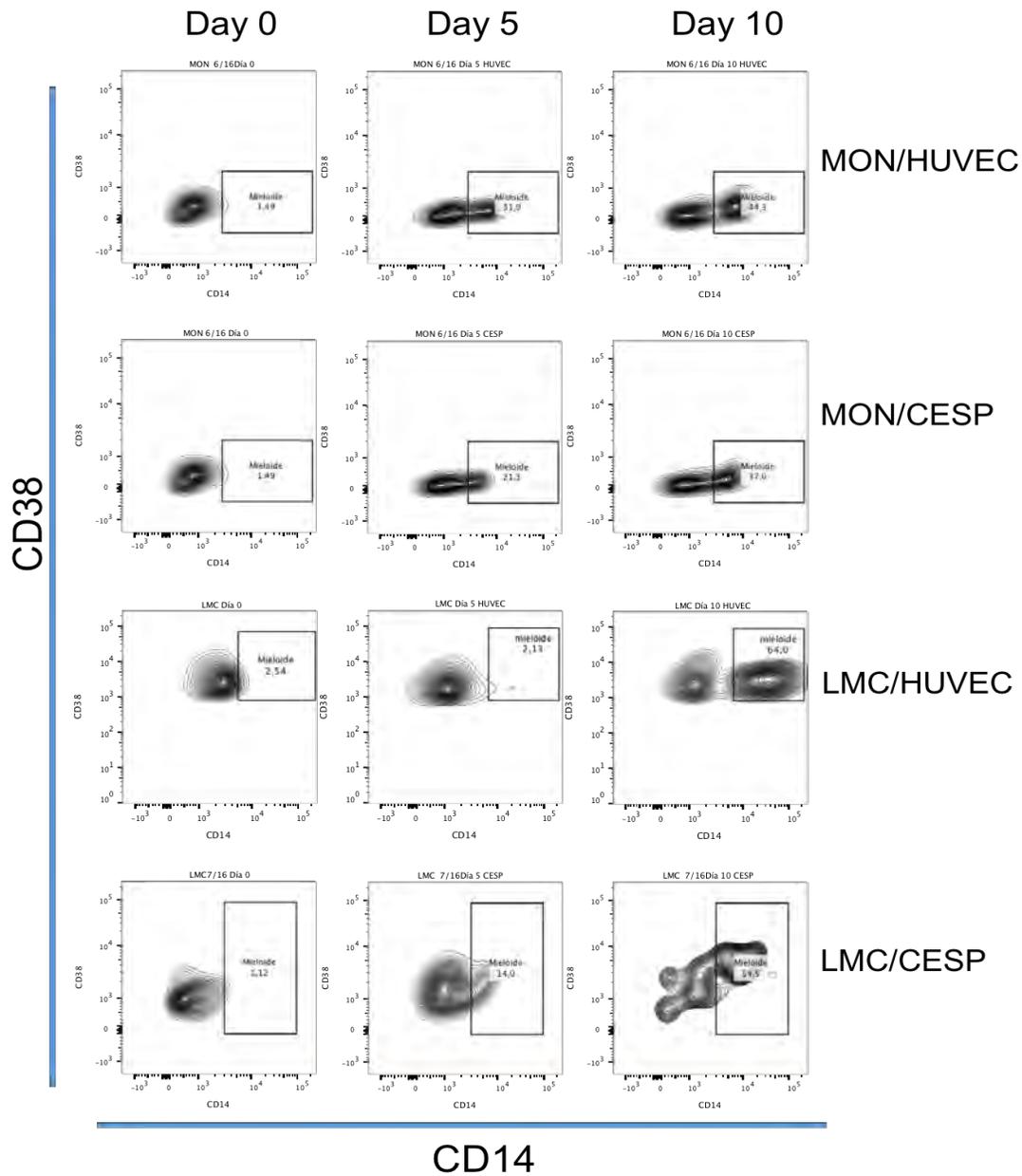


Figura 9. El co-cultivo con células endoteliales favorece la diferenciación al linaje mieloide. A lo largo de los diferentes co-cultivos, se analizó la presencia de células con fenotipo mieloide. La figura muestra plots

representativos en donde se observa un incremento en la fracción de células CD14 positivas cuyo porcentaje se indica en los recuadros.

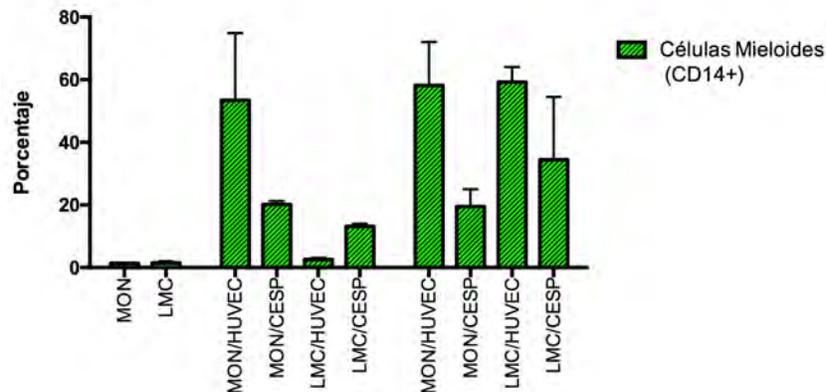


Figura 10. El co-cultivo con células endoteliales favorece la diferenciación al linaje mieloide. La presencia de células CD14+ fue analizado antes y después del co-cultivo con células endoteliales, sin contacto, en ausencia de factores de crecimiento y SFB. Los valores representan la media \pm SEM del porcentaje de expresión a partir 3 experimentos independientes por duplicado en el caso de MON/HUVEC, MON/CESP, LMC/HUVEC y de 2 experimentos independientes por duplicado para LMC/CESP. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$

Dado que los co-cultivos ocurrieron en ausencia de citocinas y bajo el supuesto que en estas condiciones podrían producirse moléculas capaces de modular diferentes linajes hematopoyéticos, también se procedió a evaluar la generación de células que expresaran el antígeno CD10, el cual se ha asociado con etapas tempranas de la diferenciación linfóide.

En los co-cultivos de MON con CESP y MON con HUVEC la expresión de CD10 es baja, llegando a menos del 10% al día 10. Por otro lado, las células de LMC con CESP o HUVEC muestran una expresión mayor de CD10, que comienza al día 5 en LMC con CESP, y después del día 5 en LMC con HUVEC, pero en ambos casos alcanza una expresión superior al 50% en el día 10 (Fig. 11 y 12).

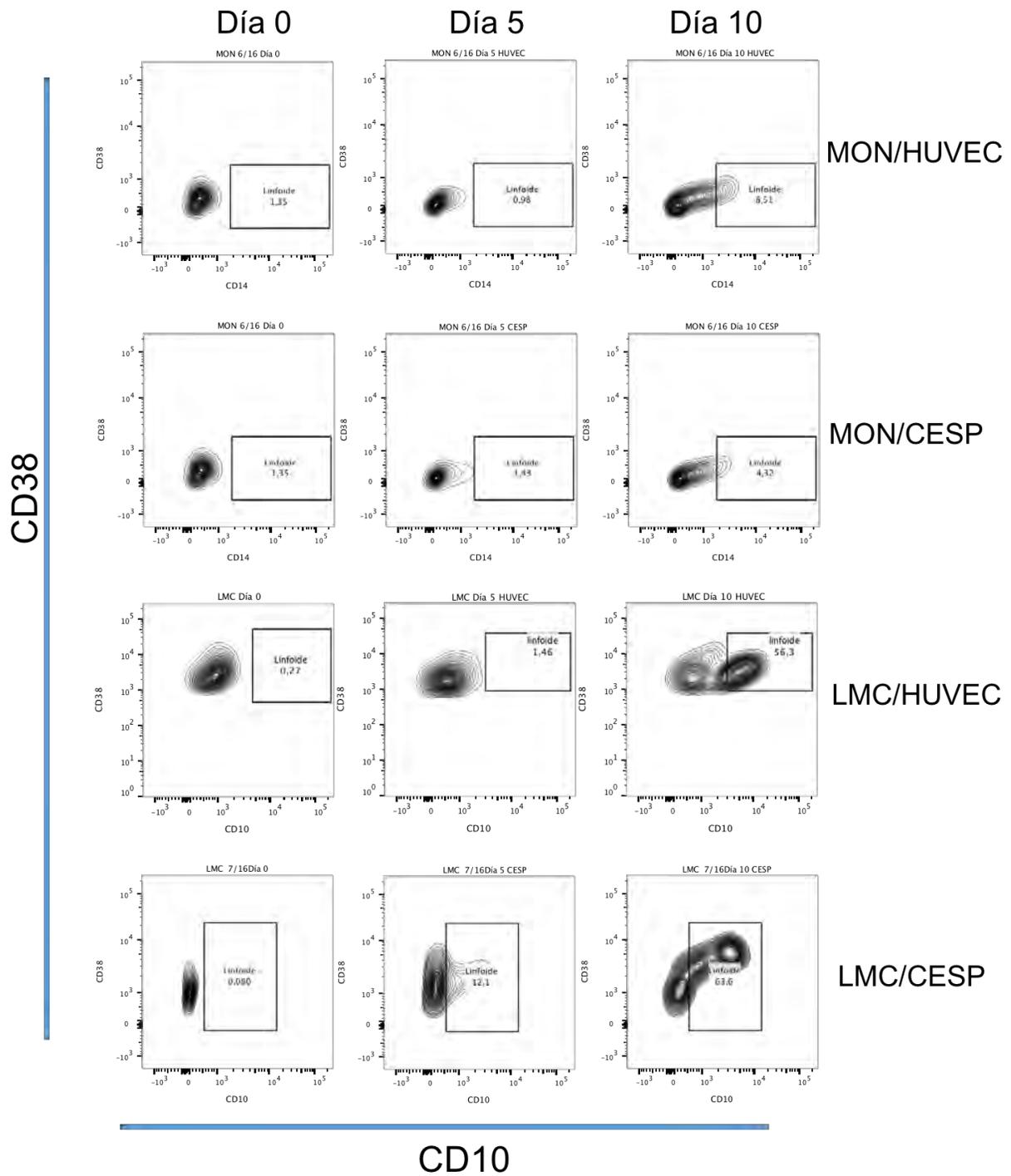


Fig. 11. Expresión del marcador CD10 durante el co-cultivo con endotelio. La presencia de células hematopoyéticas CD10+ fue analizado mediante citometría de flujo, a lo largo de los diferentes días del co-cultivo con células endoteliales y el porcentaje se muestra en cada uno de los recuadros.

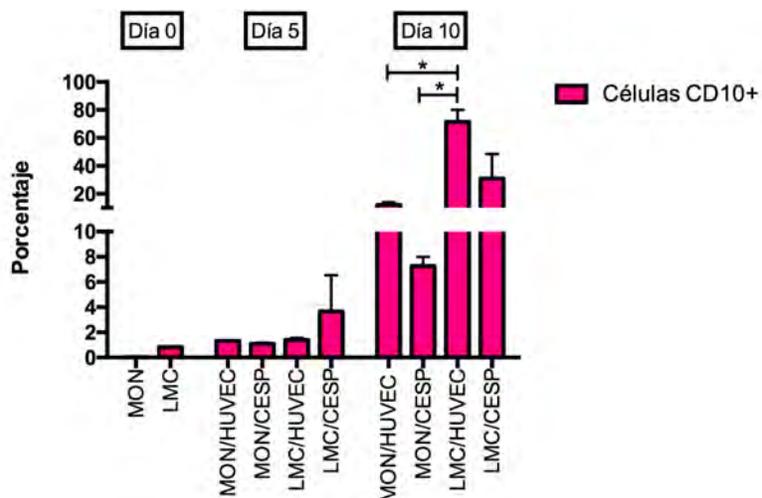


Figura 12. Expresión del marcador CD10 durante el co-cultivo con células endoteliales. La presencia de células CD10+ fue analizado antes y después del co-cultivo con células endoteliales, sin contacto, en ausencia de factores de crecimiento y SFB. Los valores representan la media \pm SEM del porcentaje de expresión de 3 experimentos independientes en el caso de MON/HUVEC, MON/CESP, LMC/HUVEC y de 2 experimentos independientes para LMC/CESP. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$

Esta alta expresión de CD10 (Fig. 11 y 12) y CD14 (Fig. 9 y 10) en las células hematopoyéticas de LMC fue un resultado que llamó nuestra atención, ya que ambos marcadores parecen expresarse al mismo tiempo y los porcentajes son similares. Por esta razón, se procedió a evaluar si existía una co-expresión de ambos marcadores y en consecuencia sugiriera la expresión de una población de células con inmunofenotipo de neutrófilos maduros, que se han documentado como CD14⁺CD10⁺ y que pueden expresarse, dependiendo del estímulo de citocinas que reciban durante la diferenciación (Matsushima *et al.*, 2013).

Los resultados muestran que en MON con HUVEC y CESP, existe un comportamiento de diferenciación gradual que parece conducir hacia la diferenciación de neutrófilos (Fig. 13). Este proceso comienza con la ganancia de expresión de CD14 a partir del día 5, y para el día 10 comienza la expresión de CD10, de manera que para este tiempo menos del 15% de células de MON co-expresan ambos marcadores (Fig. 14). En contraste, en el caso de las células de LMC con CESP observamos una diferenciación que comienza con una baja co-expresión de CD10 y CD14 a partir del día 5 (6%), y para el día 10 cerca del 50%

de la población mantiene un fenotipo CD14⁺CD10⁺ con granularidad característica de neutrófilos. En cuanto a las células primitivas de LMC que se cultivaron con HUVEC observamos una diferenciación retrasada hacia un inmunofenotipo de neutrófilos, comparada con LMC/CESP, ya que la co-expresión de CD14⁺CD10⁺ comienza después del día 5, pero una vez que comienza la diferenciación, ésta ocurre de manera rápida observando que para el día 10 existe más del 60% de células con fenotipo de neutrófilos (Fig. 13 y 14).

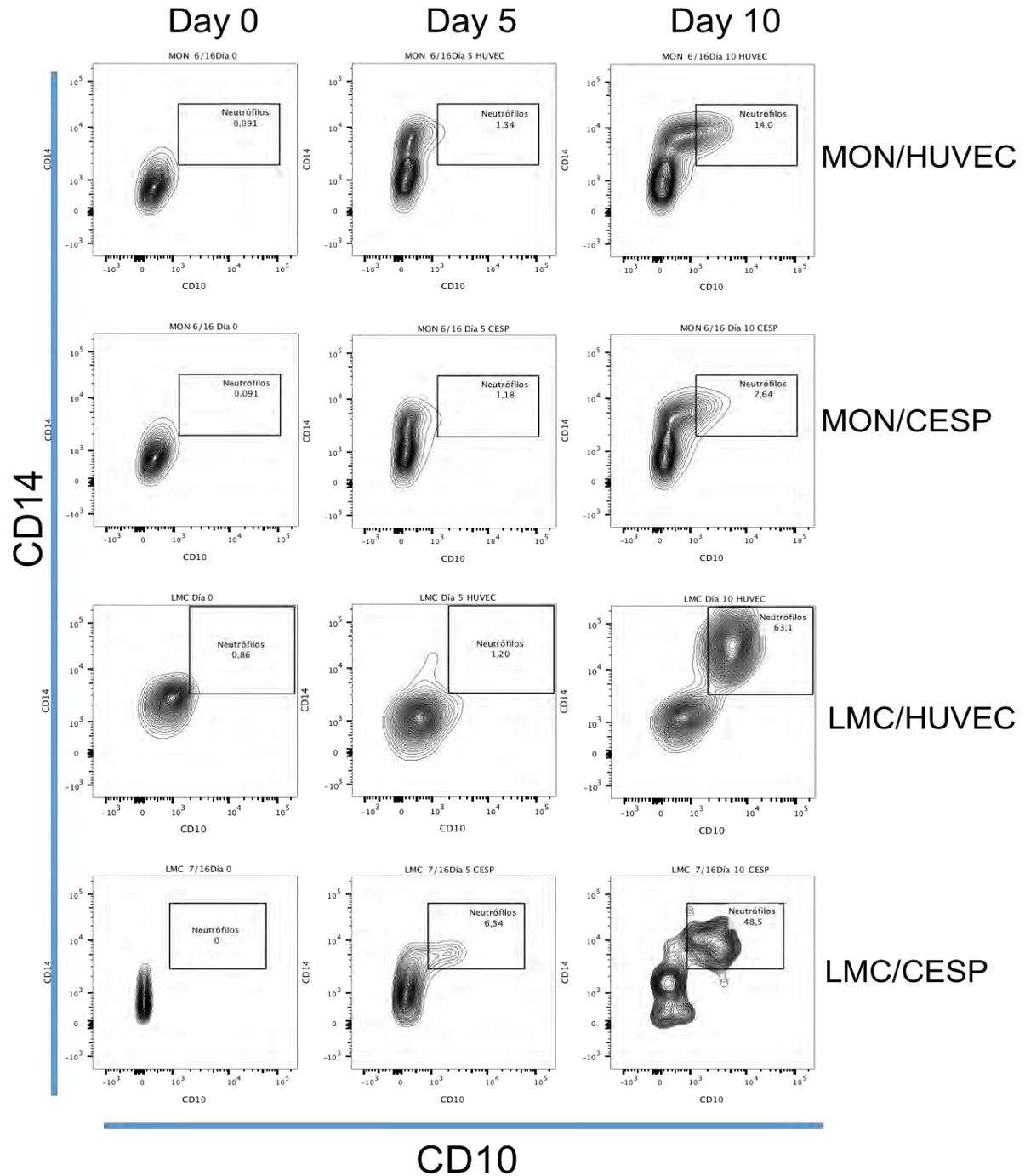


Fig. 13. La presencia de células endoteliales favorece la generación de células con fenotipo neutrófilo en las células hematopoyéticas de LMC. La presencia de células con fenotipo neutrófilo (CD14+CD10+) fue analizado mediante citometría de flujo, a lo largo de los diferentes días del co-cultivo con células endoteliales. La figura muestra plots representativos, en el recuadro se indica los porcentajes para cada caso.

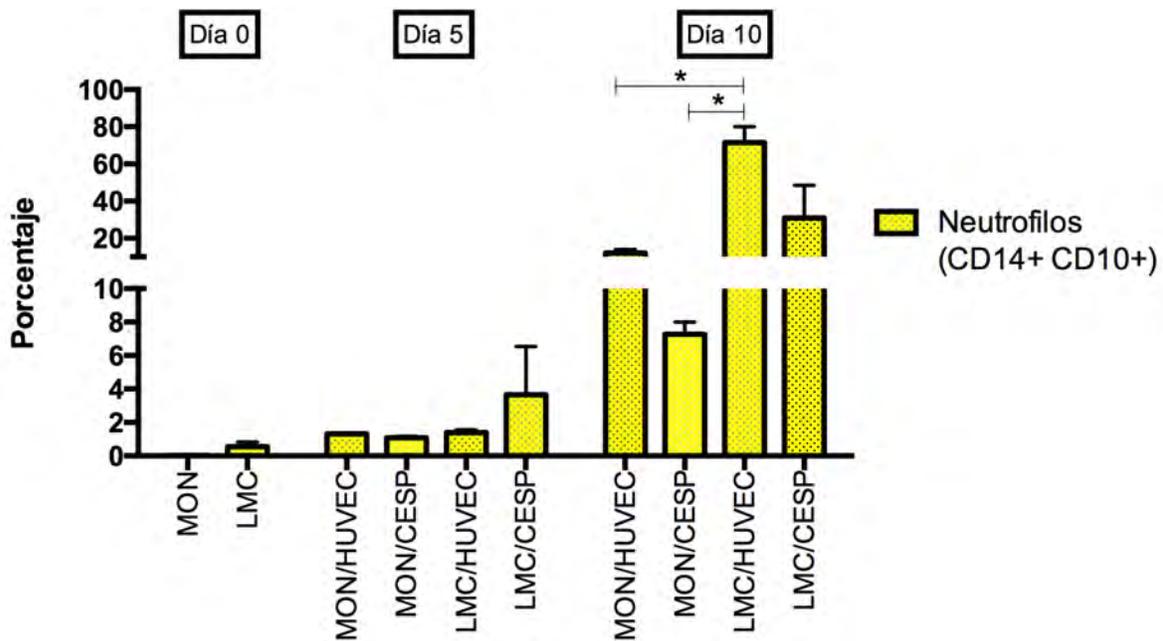


Fig. 14. El co-cultivo con células endoteliales favorece la presencia de células con fenotipo de neutrófilos en las células hematopoyéticas de LMC. La presencia de células doble positivas (CD14+ CD10+) fue analizado antes y después del co-cultivo con células endoteliales, sin contacto, en ausencia de factores de crecimiento y SFB. Los valores representan la Media \pm SEM del porcentaje de células doble positivas a partir de 3 experimentos independientes para MON/HUVEC, MON/CESP, LMC/HUVEC y de 2 experimentos independientes por duplicado para LMC/CESP. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$

Estos datos sugieren que la presencia de células endoteliales, no solo favorece la diferenciación mieloide en LMC, sino que además se induce particularmente la diferenciación hacia el linaje neutrofilico, mismo que se incrementa en algunos casos de LMC *in-vivo* (Kobayashi *et al.*, 2009). Además, estos datos sugieren una comunicación bi-direccional entre las células del co-cultivo y muy probablemente esto se asocie a la existencia de factores solubles secretados tanto por las células endoteliales (HUVEC y CESP), como por las células hematopoyéticas, de manera que se favorezca la permanencia de células hematopoyéticas (tanto normales como leucémicas).

En ese sentido y con la intención de verificar la permanencia de células leucémicas a lo largo de los co-cultivos, fueron recuperadas las colonias generadas después de la evaluación en metilcelulosa y se procedió a la detección de BCR-ABL por medio de PCR de punto final. Encontramos que a lo largo del co-cultivo, las células Ph⁺ se

conservan (Figura 15). Incluso encontramos en algunos co-cultivos la presencia de otra isoforma de BCR-ABL (que corresponde a 444pb), la cual ya ha sido reportada en pacientes con LMC (Tabassum *et al.*, 2014), y explicada como consecuencia de un evento alternativo en el gen BCR.

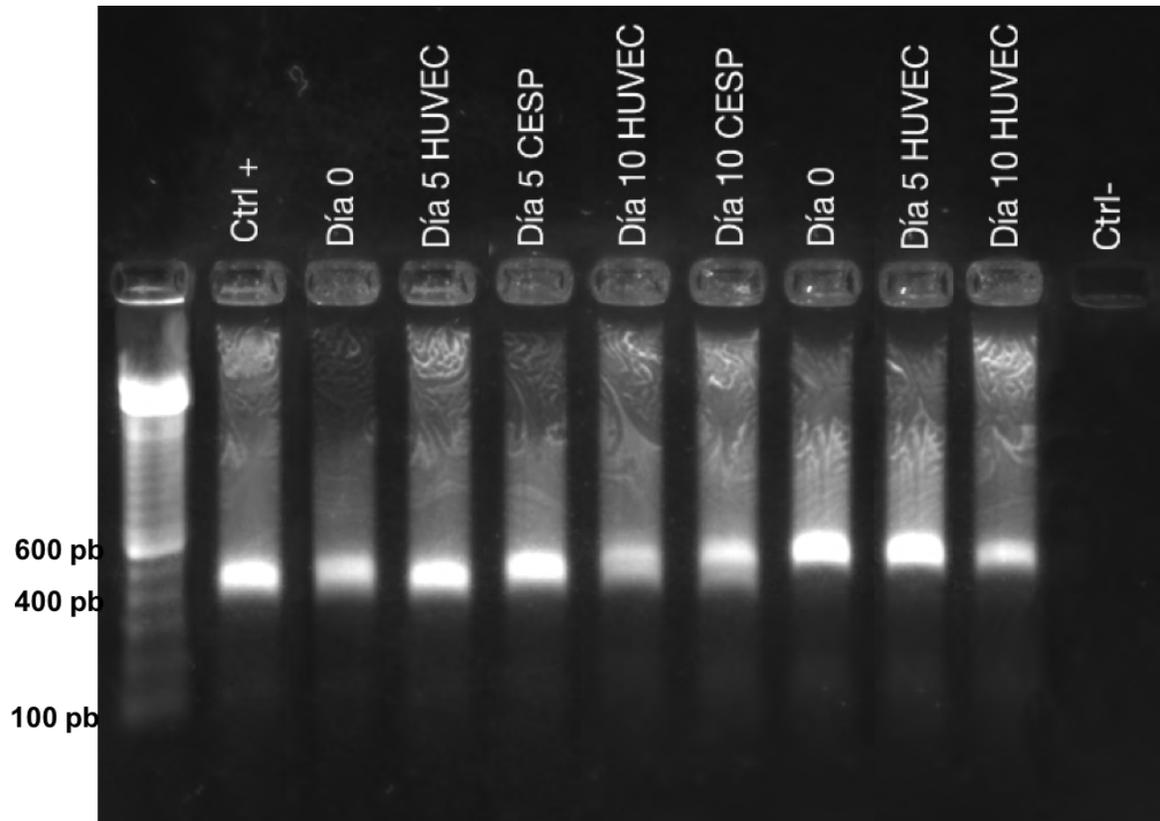


Figura 15. El co-cultivo con células endoteliales no modifica la expresión de BCR-ABL. Detección del transcrito BCR-ABL por PCR de punto final en células hematopoyéticas antes y después del día 5 y 10 del co-cultivo con células endoteliales (HUVEC y CESP). Las bandas corresponden al tamaño en pares de bases de las dos isoformas de Bcr-Abl (de 456 y 444 pb), que pueden presentarse en los pacientes con LMC. Los controles negativo y positivo corresponden a experimentos en donde se utilizó agua y ARN de la línea celular K562 como muestra, respectivamente.

Finalmente y en cuanto a la probable secreción de moléculas solubles que favorezcan la proliferación y expansión hematopoyética, se procedió a analizar la producción de citocinas en cada uno de los co-cultivos evaluados.

La evaluación de analitos en el sobrenadante de los co-cultivos se realizó a los días 3, 6 y 10, por medio del sistema de detección múltiple de analitos Milliplex. Los analitos detectados se separaron en 2 tipos importantes: las citocinas pro-

inflamatorias (G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-6, MIP-1 α y TNF- α) y las citocinas no-inflamatorias (EGF, FGF, FLT3L, IL-3, LIF, SCF y SDF-1).

Los resultados muestran un incremento en la concentración de las citocinas pro-inflamatorias G-CSF, MIP-1 α y TNF- α , en el co-cultivo de LMC con HUVEC, en comparación tanto con su contraparte normal (MON/HUVEC y MON/CESP) como con la condición LMC/CESP. Aunque en algunas de las citocinas pro-inflamatorias, no notamos un aumento significativo en LMC/HUVEC, con respecto al resto de las condiciones, sí observamos una clara tendencia hacia una mayor secreción de GM-CSF, IL-1 α e IL-6, desde los primeros 3 días de co-cultivo en el co-cultivo LMC/HUVEC, en comparación con el resto de los co-cultivos (Fig. 16).

El patrón de expresión de las citocinas pro-inflamatorias en los co-cultivos de LMC con HUVEC resulta interesante, ya que difiere mucho de lo encontrado en la normalidad, ya que todas las citocinas pro-inflamatorias tienden a presentar concentraciones altas en los primeros 3 días; incluso algunas de ellas mantienen concentraciones similares a lo largo del co-cultivo (IL-1 α , IL-6, MIP-1 α), mientras que otras disminuyen gradualmente a lo largo del tiempo (G-CSF, GM-CSF, TNF- α) (Fig. 16). Además, en LMC/HUVEC también se encontró un aumento en IL-3, citocina que se ha asociado a la diferenciación del linaje mieloide (Fig. 17).

En relación a los co-cultivos con células hematopoyéticas normales (MON/HUVEC y MON/CESP), la concentración de algunas citocinas pro-inflamatorias tienden a aumentar gradualmente (G-CSF, GM-CSF, IL-1 α , IL-6 y TNF- α) y no se expresan desde el inicio del co-cultivo como ocurre en LMC/HUVEC (Fig. 16).

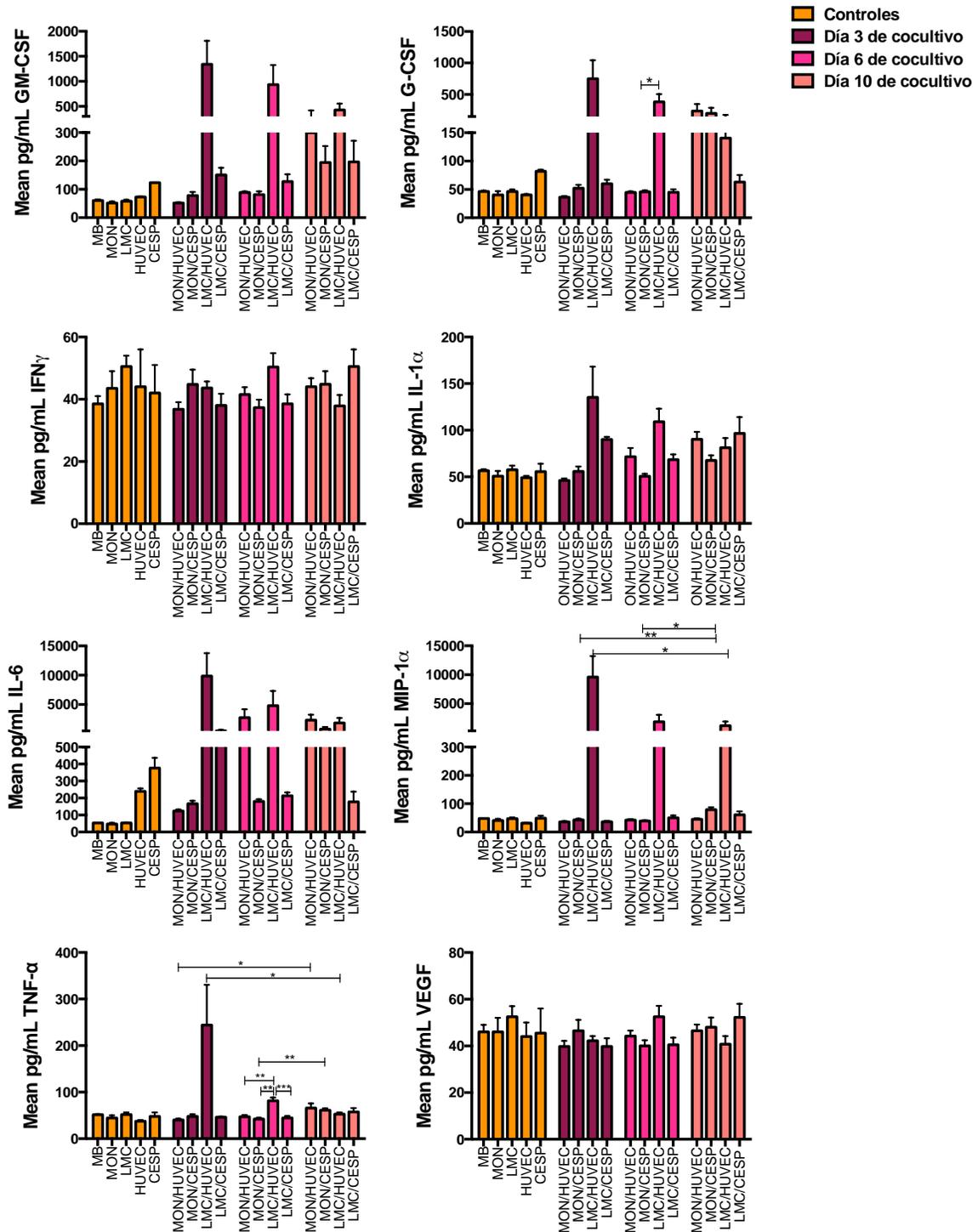


Fig. 16. Citocinas Pro-inflamatorias secretadas durante el co-cultivo con células endoteliales. El medio condicionado proveniente de diferentes días de co-cultivo (3, 6 y 10 días) fue colectado y analizado en cuanto al contenido de citocinas pro-inflamatorias (G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-6, MIP-1 α , TNF- α , VEGF) mediante el sistema Milliplex. Los datos representan la media \pm SEM de la concentración (pg/ml) detectada para cada una de las citocinas a partir de tres experimentos independientes por duplicado. En todos los casos se utilizaron como control: medio basal (MB) y medio condicionado proveniente de células de MON, LMC, HUVEC y CESP después de 3 días de cultivo con MB. Valores de significancia: *p \leq 0,5, ** p \leq 0.005, *** p \leq 0.0005.

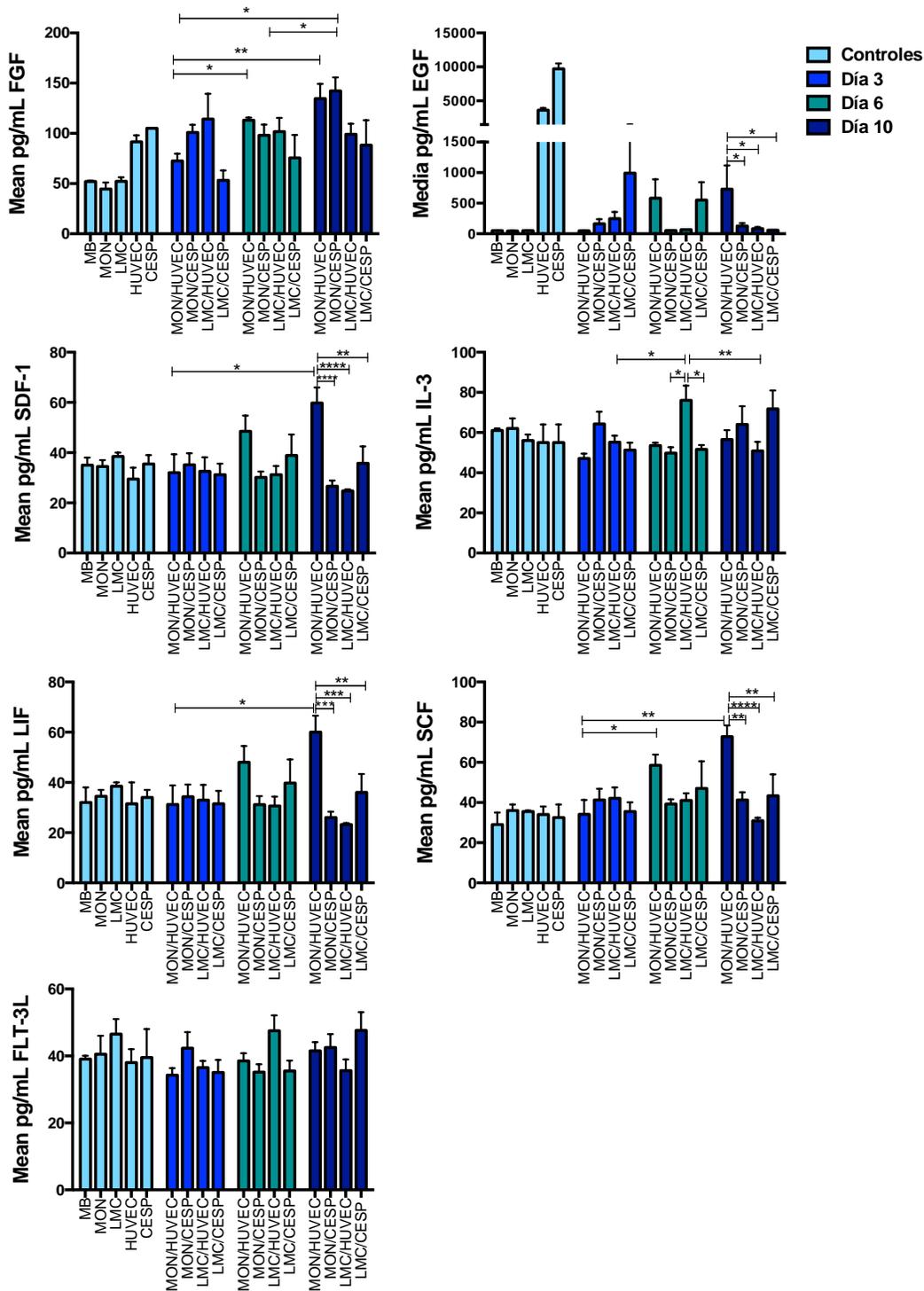


Figura 17. Citocinas No inflamatorias secretadas durante el co-cultivo con células endoteliales. El medio condicionado proveniente de diferentes días de co-cultivo (3, 6 y 10 días) fue colectado y analizado en cuanto al contenido de citocinas no inflamatorias (EGF, FGF, FLT3L, IL-3, LIF, SCF, SDF-1) mediante el sistema Milliplex. Los datos representan la media \pm SEM de la concentración (pg/ml) detectada para cada una de las citocinas a partir de tres experimentos independientes por duplicado. En todos los casos se utilizaron como control: medio basal (MB) y medio condicionado proveniente de células de MON, LMC, HUVEC y CESP después de 3 días de cultivo con MB. Valores de significancia: * $p \leq 0.5$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

Por otro lado, en el grupo de las citocinas no pro-inflamatorias (EGF, FGF, FLT3L, IL-3, LIF, SCF y SDF-1), observamos un incremento paulatino y significativo en las citocinas EGF, FGF, LIF y SCF en el co-cultivo de MON con HUVEC, citocinas que son importantes para el mantenimiento de la población hematopoyética primitiva. Además, en el mismo co-cultivo de MON/HUVEC aumentó significativamente CXCL12 (SDF-1), con respecto a MON/CESP y con respecto a los co-cultivos con LMC (Fig. 17).

En conjunto estos resultados, nos sugieren que la presencia de HUVEC se favorece la producción de citocinas en los co-cultivos sin contacto, tanto en MON como en LMC (Fig. 16 y 17). No obstante, la presencia de células hematopoyéticas normales o leucémicas cambia el tipo de citocinas presentes en los co-cultivos. Es decir, en co-cultivos de LMC con HUVEC la secreción de citocinas es mayoritariamente pro-inflamatoria, y muchas de ellas están involucradas en la diferenciación hacia el linaje mieloide. Mientras que en co-cultivos de MON con HUVEC detectamos mayoritariamente citocinas no inflamatorias, algunas de ellas involucradas con el mantenimiento de la población primitiva.

Nosotros mostramos que es suficiente el cultivo sin contacto entre células hematopoyéticas primitivas y células endoteliales, para provocar un cambio importante en ambos tipos celulares. La primer evidencia que encontramos del cambio producido tanto en las células endoteliales, como en las células hematopoyéticas, después del co-cultivo, fue a nivel de secreción de citocinas. Cuando colocamos cada tipo celular tan sólo en presencia de medio basal observamos que el número de citocinas encontrado es mínimo (Fig. 16 y 17), en comparación con las citocinas encontradas cuando las células están en co-cultivo. HUVEC con medio basal es capaz de producir tan sólo 3 citocinas: EGF, FGF e IL-6. Las CESP producen 5 citocinas: EGF, FGF, G-CSF, GM-CSF e IL-6, todas en mayores concentraciones de lo visto con HUVEC. Mientras que en las células hematopoyéticas de MON o LMC no observamos presencia de ninguna citocina (Fig. 14).

Los resultados muestran que la comunicación por factores solubles entre células primitivas (CD34⁺Lin) hematopoyéticas de LMC y células endoteliales, tiene implicaciones importantes en el destino celular de las células hematopoyéticas, lo que probablemente tiene implicaciones relevantes en la progresión de la LMC.

DISCUSIÓN

La leucemia mieloide crónica es sin duda uno de los mejores modelos biológicos para analizar y entender la regulación de la hematopoyesis anormal, ya que presenta, desde estados muy primitivos de la jerarquía hematopoyética, al cromosoma Philadelphia y su producto proteico Bcr-Abl, mediante el cual se pueden analizar exclusivamente a las poblaciones leucémicas.

Sin embargo, y a pesar de toda la información existente con respecto a las señales intrínsecas de las células Ph⁺ que favorecen su mantenimiento, aún no se conoce la relación que existe entre las células hematopoyéticas CD34⁺Lin⁻ Ph⁺ y los diferentes componentes del microambiente (células endoteliales, mesenquimales, osteoblastos, etc.), por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de las células endoteliales sobre la permanencia *in vitro* de las células primitivas hematopoyéticas leucémicas.

Inicialmente nuestros resultados muestran que la sólo presencia del componente endotelial es suficiente para mantener la viabilidad y proliferación de las células hematopoyéticas CD34⁺Lin⁻ de MON, mientras que en las células CD34⁺Lin⁻ de LMC mantiene la viabilidad y la diferenciación mieloide, además es de particular importancia mencionar que dicho comportamiento biológico se asocia únicamente con la comunicación celular a través de factores solubles.

Un hallazgo que llamó inicialmente nuestra atención fue el detectar que tanto las células endoteliales como las células hematopoyéticas, son capaces de sobrevivir hasta por 10 días en cultivos sin contacto celular y en ausencia de suero y citocinas. En ese sentido, reportes previos mencionan que tanto las células hematopoyéticas como las endoteliales requieren la presencia de citocinas estimuladoras para permanecer *in-vitro* (Chávez-González *et al.*, 2004; Seandel *et al.*, 2008; Alvarado-Moreno *et al.*, 2016;); sin embargo, en dichos trabajos las células fueron mantenidas de forma independiente.

Aunado a lo anterior, en este trabajo mostramos que el origen de las células endoteliales resulta significativo en el comportamiento que se observa sobre las células hematopoyéticas, ya que si las células endoteliales provienen de una fuente biológicamente inmadura -como podría especularse que sucede con las células endoteliales provenientes de progenitores endoteliales de Sangre Periférica (CESP)-, las respuestas biológicas evaluadas son menos marcadas que cuando las células hematopoyéticas son mantenidas en presencia de células HUVEC, que en nuestro modelo de estudio representarían una población celular con mayor madurez y con la capacidad para responder de manera rápida ante diferentes estímulos, dentro de los que se puede incluir el co-cultivo con células hematopoyéticas.

Esta reflexión se plantea en función de reportes previos en la literatura en donde se menciona que las CESP son una fuente más primitiva que las células HUVEC, a pesar de provenir de una fuente adulta, puesto que son derivadas de progenitores endoteliales de médula ósea (Gunsilius *et al.*, 2000; Nuzzolo *et al.*, 2014) y esta diferencia en la maduración podría involucrar cambios en su respuesta a estímulos externos.

De forma particular y en cuanto a la proliferación, nuestros resultados indican que las células hematopoyéticas normales tienen mayor capacidad de proliferación en presencia de células endoteliales, en comparación con lo observado en las células hematopoyéticas leucémicas. Este efecto ya había sido reportado previamente por Chávez y colaboradores, quien en cultivos líquidos mostró que las células leucémicas tienen deficiencias en la proliferación aún en presencia de citocinas, con relación a su contraparte normal, lo que ponía de manifiesto la importancia del microambiente hematopoyético. En este momento se amplía el panorama en cuanto a la regulación del microambiente y la hematopoyesis, ya que nuestros datos sugieren fuertemente que es necesaria la interacción física entre los elementos del co-cultivo y no sólo la interacción entre moléculas solubles. Aunado a lo anterior y aunque el efecto de células HUVEC no ha sido previamente reportado en la literatura para modelos humanos, sí se ha sugerido que en modelos murinos la

presencia de células HUVEC es suficiente para el mantenimiento de distintos tipos de leucemia (Poulos *et al.*, 2014; Dias *et al.*, 2000).

Si bien es cierto que no se detectó un incremento en la proliferación de las células leucémicas en presencia del componente endotelial, nuestros datos muestran contundentemente que en el caso de las células leucémicas se favorece la expansión hacia el linaje mieloide, respuesta que no se detecta en las células hematopoyéticas normales que son capaces de producir los linajes mieloide y eritroide.

Cabe mencionar, que previamente se había reportado que las células leucémicas, en cultivos libres de estroma y en presencia de citocinas, favorecen la producción de células del linaje eritroide (Chávez *et al.*, 2009), e incluso existen reportes que mencionan que al transfectar células de hígado fetal de ratón con Bcr-ABI, se induce la diferenciación al linaje eritroide (Ghaffari *et al.*, 1999), evento que está relacionado con la expresión de factores de transcripción como PU.1. Por lo que los progenitores eritroides son independientes de la presencia de Eritropoyetina y su número se ve incrementado en pacientes en fase crónica; sin embargo, dichos progenitores no completan su maduración por lo que la mayoría de los pacientes presenta anemia (Eaves *et al.*, 1987).

En relación a este punto, el hecho de haber detectado diferenciación preferencialmente mieloide en células leucémicas en co-cultivo, indica que el microambiente es de vital importancia para el mantenimiento del fenotipo leucémico, (que para este tipo de leucemia está inclinado a la producción de células mieloides) y más aún, en el caso particular del soporte endotelial, éste parece dirigir preferencialmente la diferenciación hacia el linaje neutrofilico. Nuestros datos muestran que las células leucémicas en presencia de células HUVEC favorecen la producción de células con fenotipo CD14⁺CD10⁺ el cual sugiere la presencia de neutrófilos maduros (Rodeberg *et al.*, 1997). Dicho hallazgo podría estar relacionado con lo reportado previamente ya que se ha descrito que la

diferenciación a neutrófilos se favorece bajo estímulos inflamatorios, mismos que pueden provenir de infecciones o del desarrollo de distintas patologías (Denny *et al.*, 2010).

Aunado a lo anterior, se ha reportado que la diferenciación hacia neutrófilos es mediada principalmente por las citocinas G-CSF y GM-CSF (Dumortier *et al.*, 2003) y se ha observado que la presencia de dichas citocinas incrementa al factor de transcripción C/EBP α , quien cumple una función muy importante en la diferenciación hacia granulocitos (neutrófilos y eosinófilos). A su vez, los receptores de G-CSF y GM-CSF se encuentran regulados por los factores de transcripción PU.1 y C/EBP α (Dahl *et al.*, 2003), por lo que tan sólo la presencia de G-CSF y GM-CSF son señales suficientes para inducir la diferenciación hacia neutrófilos tanto en células de MON, como en LMC. A ese respecto, nuestros datos muestran que ambas citocinas son producidas durante el co-cultivo de células leucémicas en presencia del soporte endotelial y aunque las concentraciones varían considerablemente, sí podríamos sugerir que dichas citocinas están involucradas en la producción neutrofilica observada.

No obstante, también se debe considerar que se ha reportado que la sola presencia de BCR-ABL induce la activación de PI3k-Akt y en consecuencia se reducen los niveles del factor de transcripción c-Jun, el cual a su vez provoca el aumento de C/EBP α y C/EBP β , factores que son esenciales en la transición del Progenitor Mieloide Común (CMP) hacia progenitores de granulocitos/monocitos y neutrófilos (Kobayashi *et al.*, 2009). Además, se conoce que en células Philadelphia positivas, existe una activación constitutiva de la vía STAT5, que también se ha involucrado en la diferenciación hacia neutrófilos (Jiang *et al.*, 200). Por lo que podríamos sugerir que sumado a la secreción de citocinas, las células de LMC se encuentran predisuestas a diferenciarse hacia un inmunofenotipo de neutrófilos, debido a eventos intrínsecos que ocurren durante la transformación hacia un fenotipo leucémico, lo que provoca que un estímulo muy bajo de citocinas sea suficiente para desencadenar el proceso de diferenciación celular hacia linajes mieloides.

En relación a este último punto, nuestros resultados claramente muestran que las células endoteliales y hematopoyéticas son capaces de comunicarse *in vitro*, ya que cuando se coloca cada tipo celular en presencia de medio basal, el número de citocinas es mínimo en comparación con el número y concentración de citocinas detectadas cuando las células están en co-cultivo (las células HUVEC con medio basal producen solo 3 citocinas: EGF, FGF e IL-6, las CESP producen 5 citocinas: EGF, FGF, G-CSF, GM-CSF e IL-6 y las células hematopoyéticas de MON o LMC no parecen producir ninguna de las citocinas que evaluamos).

Un evento que ha llamado particularmente la atención es que al igual que lo detectado por Alvarado y Nuzolo, en nuestro estudio encontramos que las citocinas producidas por las CESP son pro-inflamatorias, mientras que las células HUVEC tienen una producción casi nula de ellas. Sin embargo, y de forma muy interesante al co-cultivar las células endoteliales con las células hematopoyéticas, los patrones de secreción cambian considerablemente ya que las CESP reducen el nivel de citocinas pro-inflamatorias, mientras que las células HUVEC en presencia de células hematopoyéticas leucémicas lo incrementan, evento que no se detecta en los co-cultivos HUVEC con células hematopoyéticas normales y que podría correlacionarse con lo previamente reportado en donde se comenta que las citocinas inflamatorias tienen un impacto directo en el mantenimiento de diversas neoplasias (Butler *et al.*, 2010; Hoermann *et al.*, 2015; Hoggatt *et al.*, 2016). Aunado a lo anterior, se ha mostrado que la presencia de BCR-ABL *in vivo* aumenta la producción de citocinas pro-inflamatorias en LMC, como G-CSF, IL-1 α , MIP-1 α , IL-6 y TNF- α , lo cual favorece el mantenimiento y progresión de la enfermedad en modelos de trasplante murino (Zhang *et al.*, 2012). Nosotros mostramos que el endotelio puede estar fuertemente involucrado en la producción de dichas citocinas pro-inflamatorias.

Este último hallazgo sugiere que las células leucémicas son capaces de modular su comunicación con el endotelio, de manera que en presencia de un endotelio

maduro, se favorece la diferenciación hacia el linaje mieloide. En este sentido, es importante comentar que si bien las células HUVEC no representan un modelo directo en el que las células puedan permanecer *in vivo* en la médula ósea, sí proporcionan un buen modelo de endotelio funcional, mismo que ha sido utilizado en diversos estudios para analizar fenotipos transformantes, tal y como se ha reportado por el equipo liderado por Butler, donde al cultivar células primitivas de leucemia mieloide aguda (LMA) con HUVEC induce la proliferación y expansión de fenotipos primitivos de células de LMA, lo cual recapitula una leucemia mucho más agresiva en modelos murinos (Poulos *et al.*, 2014).

Cabe mencionar, que si bien es cierto que la interacción célula endotelial-célula hematopoyética ha sido mínimamente estudiada en la literatura, existe un amplio número de reportes que mencionan que las células mesenquimales (que constituyen una proporción mayoritaria de las células de la médula ósea), son capaces de mantener la hematopoyesis normal, evento que se ha asociado a la capacidad que éstas células tienen para producir citocinas como SCF, VEGF, FLT3, FGF, IL6, IL-11, G-CSF, y GM-CSF (Chabannon y Torok-Storb, 1992; *Frenette et al.*, 2013). Además, y en el caso particular de LMC, existen estudios en modelos murinos donde se ha demostrado que las células del microambiente leucémico son altas productoras de citocinas como: G-CSF, IL-6 y MIP-1 α , las cuales se asocian al mantenimiento del fenotipo leucémico. Además, G-CSF favorece la disminución de CXCL12, lo que provoca la salida prematura de células leucémicas a circulación.

Así mismo, Reynaud encontró que las células de LMC secretan altas cantidades de IL-6, citocina que en su modelo de estudio es capaz de inhibir la diferenciación hacia el linaje linfóide, al mismo tiempo que favorece la diferenciación mieloide (Reynaud *et al.*, 2011). Gallipoli, por su parte; ha reportado que las células progenitoras de LMC son capaces de producir TNF α , citocina que aunque históricamente se había catalogado como inhibidora de la hematopoyesis normal, en el caso de la LMC es capaz de estimular la proliferación mediante la inducción de la vía NF κ B, evento que tiene como consecuencia el estímulo en la producción de IL3 (Gallipoli *et al.*,

2013), que es otra de las citocinas que en nuestro modelo de estudio se ha encontrado elevada tras el co-cultivo. Además, el estímulo de $TNF\alpha$ por parte de las células de LMC es suficiente para activar a las células endoteliales, que a su vez se estimulan para producir una mayor cantidad de citocinas como IL-6, G-CSF y GM-CSF.

Con base en lo anteriormente descrito, nuestros resultados demuestran que las células primitivas leucémicas mantienen una estrecha comunicación con células endoteliales (basada en la secreción de citocinas) resultando en un mantenimiento de la viabilidad y proliferación anormal, al tiempo que se favorece la diferenciación hacia el linaje mieloide.

Además, nuestros hallazgos apoyan la idea de que nichos específicos del microambiente hematopoyético (representado por diferentes tipos celulares), pueden ser los responsables de la presencia y permanencia de subpoblaciones hematopoyéticas particulares, por lo que en el caso de la hematopoyesis leucémica es de suma importancia evaluar también los nichos vasculares y osteoblasticos, así como las diferentes interacciones que en cada uno de ellos se establecen a través del contacto celular directo y no sólo los eventos mediados por la producción de factores solubles.

CONCLUSIONES

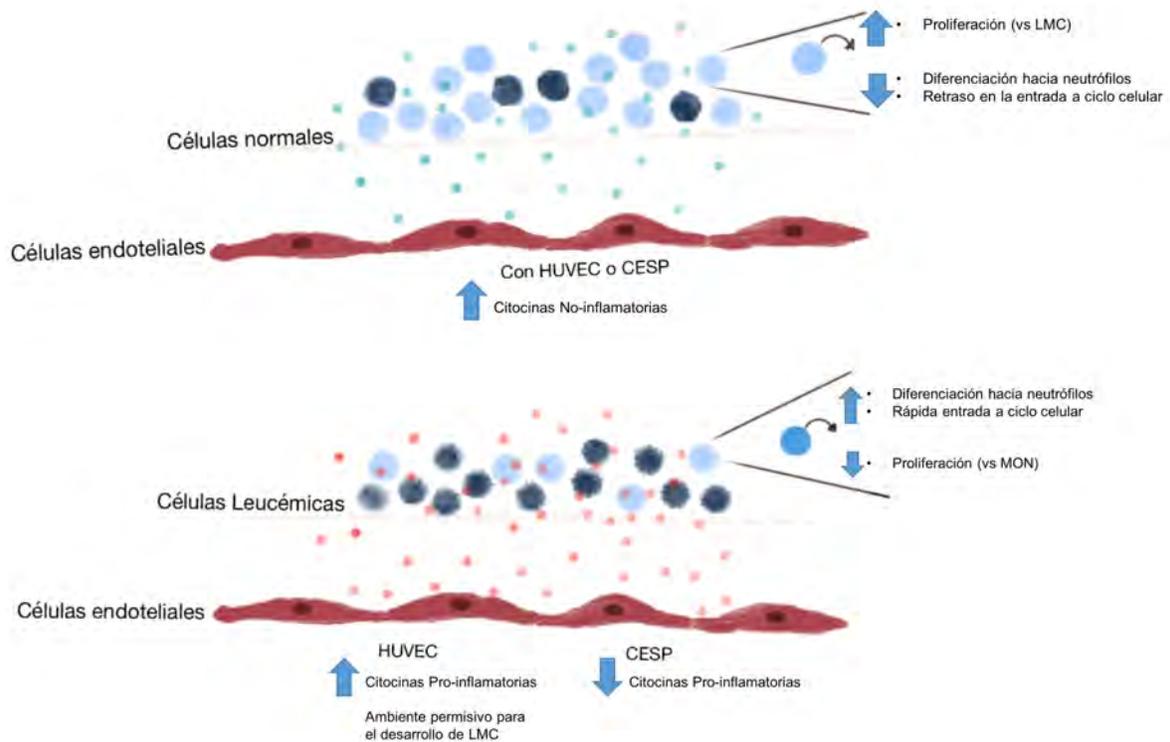


Figura 18. Contribución de las células endoteliales al mantenimiento del fenotipo leucémico.

El modelo propone que en la normalidad, las células endoteliales contribuyen al mantenimiento y reducida proliferación celular, a través de un ambiente no inflamatorio (A). Sin embargo, en la hematopoyesis leucémica, la sola presencia de células endoteliales maduras (representada por células HUVEC), favorece un aumento de la diferenciación hacia el linaje mieloide (neutrófilos), al tiempo que se induce la existencia de un ambiente pro-inflamatorio mediante la secreción de citocinas como GM-CSF, G-CSF, IL-6, MIP-1 α y TNF α (B). Todo ello podría contribuir al mantenimiento del fenotipo y permanencia leucémica.

Los resultados demuestran que las células hematopoyéticas, tanto normales como de LMC, mantienen comunicación con las células endoteliales mediada por factores solubles. En el caso de las células leucémicas permite una rápida diferenciación hacia un fenotipo mieloide, particularmente hacia neutrófilos maduros. Dicha diferenciación podría estar asociada a factores intrínsecos de las células leucémicas, así como a la secreción de citocinas pro-inflamatorias que se secretan en presencia de HUVEC, las cuales crean un ambiente permisivo para el desarrollo de la LMC. No obstante, en el caso de las células hematopoyéticas normales, existe un mantenimiento regulado de los diferentes linajes hematopoyéticos; además, la secreción de citocinas se mantiene en un estado no inflamatorio.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo sienta las bases para evaluar el efecto del contacto entre el componente microambiental endotelial normal sobre células primitivas hematopoyéticas provenientes de médula ósea normal y de sujetos con LMC, por lo que sería interesante evaluar:

- La proliferación y expansión de células primitivas hematopoyéticas (normales y de LMC) en co-cultivos con contacto con células endoteliales.
- La permanencia de células primitivas hematopoyéticas Bcr-Abl positivas después del co-cultivo en contacto con el componente endotelial.
- La producción diferencial de citocinas que resulta del co-cultivo en contacto de células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas) con células endoteliales.
- La respuesta de las células primitivas hematopoyéticas a inhibidores de Bcr-Abl cuando se encuentran en contacto con el componente endotelial.
- El efecto del contacto con el componente endotelial (normal y leucémico) sobre el estado del ciclo celular de células primitivas hematopoyéticas (normales y leucémicas), antes y después del tratamiento *in vitro* con inhibidores de Bcr-Abl.
- La expresión de moléculas de adhesión celular relacionadas con la permanencia de células troncales en un microambiente endotelial

LITERATURA CITADA

Aguayo, A., Estey, E., Kantarjian, H., Mansouri, T., ... Albitar, M. (1999) Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloidleukemia. *Blood* 94, 3717–3721

Aguayo A., Kantarjian H., Manshouri T., Gidel C., Estey, E., ... Albitar, M. (2000) Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 96, 2240-2245.

Aggoune, D., Magnani, J. L., Van Etten, R. A., & Krause, D. S. (2014). The Vascular Niche Is Involved in Regulating Leukemic Stem Cells in Murine Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood*, 124, 516 LP-516.

Alvarado-Moreno, J. A., Hernandez-Lopez, R., Chavez-Gonzalez, A., Yoder, M. C., Rangel-Corona, R., Isordia-Salas, I., ... Majluf-Cruz, A. (2016). Endothelial colony-forming cells: Biological and functional abnormalities in patients with recurrent, unprovoked venous thromboembolic disease. *Thrombosis Research*, 1–12.

Avilés-Vázquez, S., Chávez-González, A., & Mayani, H. (2013). Inhibidores de cinasas de tirosina (ICT): la nueva revolución en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). *Gaceta Médica de México*; 149: 646-54.

Bonnet D, Dick JE. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 3: 730–737.

Butler J., Nolan D., Vertes E., Varnum-Finney B., Kobayashi H., ... Rafii S. (2010) Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent HSC. *Cell Stem Cell.* 6, 251-264.

Calabretta B, Perrotti D. (2004) The biology of CML blast crisis. *Blood.* 103: 4010-4022.

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

Chávez-González, A., Rosas-cabral, A., Vela-ojeda, J., Carlos, J., & Mayani, H. (2004). Severe functional alterations in vitro in CD34 + cell subpopulations from patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 28, 639–647.

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

Chute, J.P., Saini, A.A., Chute, D.J., Wells, M.R., Clark, W.B., Harlan, D.M., Park, J., Stull, M.K., Civin, C., and Davis, T.A. (2002). Ex vivo culture with human brain endothelial cells increases the SCID-repopulating capacity of adult human bone marrow. *Blood* 100, 4433–4439.

Chute, J.P., Muramoto, G., Fung, J., and Oxford, C. (2004). Quantitative analysis demonstrates expansion of SCID-repopulating cells and increased engraftment capacity in human cord blood following ex vivo culture with human brain endothelial cells. *Stem Cells* 22, 202–215.

Chute, J.P., Muramoto, G.G., Fung, J., and Oxford, C. (2005). Soluble factors elaborated by human brain endothelial cells induce the concomitant expansion of purified human BM CD34+CD38- cells and SCID-repopulating cells. *Blood* 105, 576–583.

Chute, J.P., Muramoto, G.G., Dressman, H.K., Wolfe, G., Chao, N.J., and Lin, S. (2006). Molecular profile and partial functional analysis of novel endothelial cell-derived growth factors that regulate hematopoiesis. *Stem Cells* 24, 1315–1327.

Colmone, A., Amorim, M., Pontier, A. L., Wang, S., Jablonski, E., & Sipkins, D. A. (2008). Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 322, 1861–1865.

Columbel L., Eaves C., Kalousek D., Gupta C., Eaves A. (1983) Long-Term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 308: 1493-1498

Critser, P. J., & Yoder, M. C. (2010). Endothelial colony-forming cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Current Opinion in Organ Transplantation* 15, 68–72.

Dahl, R., Walsh, J.C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S.R., Singh, H., and Simon, M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* 4, 1029–1036.

Davis, T. A., Black, A. T., Kidwell, W. R., Lee, K. P. (1997). Conditioned medium from primary porcine endothelial cells alone promotes the growth of primitive human haematopoietic progenitor cells with a high replating potential: evidence for a novel early haematopoietic activity. *Cytokine*, 9(4), 263–275.

Denny, M. F., Yalavarthi, S., Zhao, W., Thacker, S. G., Anderson, M., Sandy, A. R., ...Kaplan M.J. (2010). A distinct subset of Proinflammatory Neutrophils Isolated from Patients with Systemic Lupus Erythematosus Induces Vascular Damage and Synthesizes Type I IFNs. *The Journal of Immunology*. 184; 3284-3297.

Dias, S., Hattori, K., Zhu, Z., Heissig, B., Choy, M., Lane, W., ... Rafii, S. (2000). Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration, *106*, 511–521.

Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Zhu, Z., Wu, Y., Witte, L., & Hicklin, D. J. (2001). Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF⁻VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias, *98*, 10857–10862.

Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., & Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*, 481, 457–462.

Dumortier, A., Kirstetter, P., Kastner, P., & Chan, S. (2003). Ikaros regulates neutrophil differentiation, *101*, 2219–2226.

Eaves CJ, Eaves AC. (1987) Cell culture studies in CML. *Baillieres Clin Haematol.* 1, 931-961

Eaves C, Cashman J, Eaves A (1998) Defective regulation of leukemic hematopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 22:1085–1096

Fabbro, D. (2012). A new STATus in CML. *Nature*, 8, 228–229.

Ghaffari, S., Wu, H., Gerlach, M., Han, Y., Lodish, H. F., Daley, G. Q. (1999). BCR-ABL and v-SRC tyrosine kinase oncoproteins support normal erythroid development in erythropoietin receptor-deficient progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 13186–13190.

Gunsilius E., Duba H., Petzer A., Kahler C., Grunewald K., Stockhammer G., ... Gastl G. (2000) Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 355, 1688–1691

Herrmann, H., Sadovnik, I., Cerny-reiterer, S., Thomas, R., Stefanzi, G., Willmann, M., ... Valent, P. (2014). Dipeptidylpeptidase IV (CD26) defines leukemic stem cells (LSC) in chronic myeloid leukemia, 123, 3951–3963.

Himburg, H. A., Harris, J. R., Ito, T., Daher, P., Russell, J. L., Quarmyne, M., ... Chute, J. P. (2012). Pleiotrophin Regulates the Retention and Self-Renewal of Hematopoietic Stem Cells in the Bone Marrow Vascular Niche. *Cell Reports*, 2, 964–975.

Höfer, T., Busch, K., Klapproth, K., & Rodewald, H.-R. (2016). Fate Mapping and Quantitation of Hematopoiesis In Vivo. *Annual Review of Immunology*, 34, 449–478.

Hoermann, G., Greiner, G., & Valent, P. (2015). Cytokine Regulation of Microenvironmental Cells in Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators of Inflammation* 2015, 1-17.

Hoggatt, J., Kfoury, Y., & Scadden, D. T. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11, 555–581

Ishikawa, F., Yoshida, S., Saito, Y., Hijikata, A., Kitamura, H., Tanaka, S., ... Shultz, L. D. (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region, 25, 1315–1321.

Iwasaki, H., & Akashi, K. (2007). Reviews Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. 6, 726-740.

Järås, M., Johnels, P., Hansen, N., Agerstam, H., Tsapogas, P., Rissler, M., ... Fioretos, T. (2010). Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein. *Proceedings of the Nat. Acad. Sci.*, 107, 16280–16285.

Jiang, X., Fujisaki, T., Nicolini, F., Berger, M., Holyoake, T., Eisterer, W., ... Eaves, A. (2000). Autonomous multi-lineage differentiation in vitro of primitive CD34 + cells from patients with chronic myeloid leukemia, 1112–1121.

Jonuleit, T., Kuip, H. Van Der, Miething, C., Michels, H., Hallek, M., Duyster, J., & Aulitzky, W. E. (2000). Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines, 96, 1933–1940.

Kiel, M. J., Yilmaz, Ömer H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C., & Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121, 1109–1121.

Kobayashi, S., Kimura, F., Ikeda, T., Osawa, Y., Torikai, H., Kobayashi, a, ... Motoyoshi, K. (2009). BCR-ABL promotes neutrophil differentiation in the chronic phase of chronic myeloid leukemia by downregulating c-Jun expression. *Leukemia Research* 23, 1622–1627.

Kopp H.G., Avecilla S.T., Hooper A.T., Shmelkov S.V., Ramos C.A., Zhang F., Rafii S. (2005). Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. *Blood* 106, 505–513

Krause, D. S., Lazarides, K., Lewis, J. B., Andrian, U. H. Von, & Etten, R. A. Van. (2016). Selectins and their ligands are required for homing and engraftment of BCR-ABL1 1 leukemic stem cells in the bone marrow niche. *123*, 1361–1372.

Krause D. S., Scadden D. T. (2015). A Hostel For The Hostile: The Bone Marrow Niche In Hematologic Neoplasms. *Haematologica* 100, 1376-1387.

Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502, 637–643.

Laslo P., Pongubala J., Lancki D., Singh H. (2008) Gene regulatory networks directing myeloid and lymphoid cell fates within the immune system. *Semin Immunology*. 20, 228–235.

Lo Celso C., Fleming H.E. Wu J.W., Zhao C.X., Miake-Lye S. Fujusaki J., ... Scadden D.T. (2009). Live-animal tracking to find individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 457, 92–96

Mayani, H., Flores, E., Chávez, MA. (2009). In vitro biology of human myeloid leukemia, *Rev. Leukemia Reserch* 33, 662-637.

Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., ... Frenette P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 466, 829–834

Mendelson, A., Frenette, P. S. (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature Medicine*, 20, 833–46.

Nilsson S.K., Johnston H.M., Whitty G.A., Williams B., Webb R.J., Denhardt D.T., ... Haylock. D.N. (2005) Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*.106,1232–1239

Nombela-arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K. J., Harley, B., Mahoney, J. E., ... Silberstein, L. E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature Cell Biology*, 15, 533–543.

Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., Dobson, S., Gan, O. I., Wilson, G., ... Dick, J. E. (2016). Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*, 351, aab2116. .

Nowell PC, Hungerford DA (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25, 85–109.

Nuzzolo, E. R., Capodimonti, S., Martini, M., Iachinoto, M. G., Bianchi, M., Cocomazzi, A., ... Teofili, L. (2014). Adult and cord blood endothelial progenitor cells have different gene expression profiles and immunogenic potential. *Blood Transfusion*, 12, s367-s374.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33, 387–399.

Passegué, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C. Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J. Exp. Med.* 202, 1599–1611.

Pedersen M., Löfstedt T., Sun J., Holmquist-Mengelbier L., Pahlman S., Rönstrand L. (2008). Stem cell factor induces HIF-1 α at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 377, 98-103

Pina C., Fugazza C., Tipping A. J., Brown J., Soneji S., Teles J., Peterson C., Enver T. (2012). Inferring rules of lineage commitment in haematopoiesis. *Nat. Cell Biol.* 14, 287–294

Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., & Frenette, P. S. (2013). PDGFR and CD51 mark human Nestin⁺ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *Journal of Experimental Medicine*, 210, 1351–1367.

Poulos, M. G., Gars, E. J., Gutkin, M. C., Kloss, C. C., Ginsberg, M., Scandura, J. M., ... Butler, J. M. (2014). Activation of the vascular niche supports leukemic progression and resistance to chemotherapy. *Experimental Hematology*, 42, 976–986.e3.

Rodeberg, D. A., & Morris, R. E. (1997). Azurophilic Granules of Human Neutrophils Contain CD14, 65, 4747–4753.

Rowley JD (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293

Sadovnik, I., Hoelbl-kovacic, A., Herrmann, H., Eisenwort, G., Cerny-reiterer, S., Warsch, W., ... Valent, P. (2016). Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph β CML. 5, 17–19.

SEER Cancer Statistics Factsheets: Chronic Myeloid Leukemia. National Cancer Institute. Bethesda, MD. Recuperado el 16 de agosto de 2016, de <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmly.html>

Stier S., Ko Y., Forkert R., Lutz C., Neuhaus T., Grünewald E., ... Scadden D. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med.* 201,1781–1791

Sugiyama T., Kohara H., Noda M., Nagasawa T. (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 25, 977–988

Tabe Y., Jin L., Leysath C. L., Kimura S., Kantarjian H., Andreeff M., Konoplev S. (2008). CXCR4 upregulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther.* 7, 48–58

Taichman, B. R. S., Reilly, M. J., & Emerson, S. G. (1996). Human Osteoblasts Support Human Hematopoietic Progenitor Cells in In Vitro Bone Marrow Cultures, 87, 518–524.

Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 605, 431–59.

Warr M., Pietras E., Passegue E. (2011). Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 6, 681-701.

Winkler I. G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R. N., Forristal, C. E., Patton, J. T., ... Lévesque, J. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and

chemoresistance, 18, 1651-1659.

Xie, Y., Yin T., Wiegraebe W., He XC., ... Miller D (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 457, 97–101

Zhang J., Niu C, Ye L., Huang H., He X., Tong W., ... Li L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature Methods in Mol. Biol.*, 425, 0–5.

Zhang, B., Ho, Y. W., Huang, Q., Maeda, T., Lin, A., Lee, S., ... Bhatia, R. (2012). Article Altered Microenvironmental Regulation of Leukemic and Normal Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. *Cancer Cell*, 21, 577–592.

Zhang H, Li H, Xi HS, Li S. (2012) HIF1a is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood*.119, 2595-2607.

Zhang, B., Li, M., McDonald, T., Holyoake, T. L., Moon, R. T., Campana, D., ... Bhatia, R. (2013). Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt- β -catenin signaling. *Blood*, 121, 1824–1838.