



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

EL EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA COMPOSICIÓN DEL  
MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO EN MÉDULA ÓSEA NORMAL.

TESIS  
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:  
ALICIA GUADALUPE AGUILAR NAVARRO

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. EUGENIA FLORES FIGUEROA  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR  
DR. JESÚS CHIMAL MONROY  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CDMX, NOVIEMBRE DE 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Reconocimientos

Este trabajo fue realizado bajo la tutoría de la Dra. Eugenia Flores Figueroa, en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), ubicada en la UMAE Hospital de Oncología de Centro Médico Nacional Siglo XXI, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-CB-2012-179417, FC-2015-2-1341) y el Programa Conjunto de Investigación en Salud Canadá Israel del Centro Internacional de Investigación en Desarrollo en Salud de Canadá.

Agradezco el apoyo financiero otorgado por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y el Programa de Cooperación Internacional del Fondo de Investigación en Salud del IMSS, para la asistencia al Congreso de la Sociedad Internacional de Hematología Experimental y la realización de una estancia en el laboratorio del Dr. John E. Dick en el Princess Margaret Cancer Centre en Toronto, Canadá.

Por último, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para la realización de mis estudios de posgrado (246604), asimismo, al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por apoyarme con una beca complementaria (99096800).

## Agradecimientos

A la Dra. Kena Flores Figueroa, en primer lugar por haberme aceptado para formar parte de su equipo de trabajo y apoyarme en la realización de mis estudios, tanto académica como personalmente. Gracias por confiar en mí, por ser ese guía, que reta, impulsa y motiva. Además, de ser un modelo a seguir como persona y como investigadora. Gracias por enseñarme que pueden disfrutarse las frustraciones y las alegrías que conlleva el camino de la ciencia. ¡Muchas, muchas gracias!

Al Dr. Jesús Chimal Monroy y al Dr. Iván Velasco Velázquez por su apoyo en el desarrollo de este estudio, gracias por sus comentarios, sugerencias y preguntas, que sin duda semestre tras semestre me motivaban a mejorar, a cuestionarme más y a enriquecer mi trabajo. Muchas gracias por su tiempo y por su disposición para apoyarme. ¡Gracias!

Al Dr. John E. Dick por su apoyo en la realización de este estudio y por sus aportaciones que indudablemente lo enriquecieron. En especial, le agradezco su disposición y su tiempo para ayudarnos en realizar este proyecto.

Al Dr. Ricardo Esquivel Gómez y al Servicio de Reemplazo Articular de la UMAE Hospital de Traumatología Lomas Verdes, por su apoyo y colaboración para brindar las muestras de médula ósea utilizadas en este proyecto.

A la Dra. Fany Juárez Aguilar, a la Dra. Dita Gratzinger y al Dr. Hubert Tsui por su apoyo invaluable en el desarrollo de este proyecto, gracias por resolver mis dudas y enseñarme la belleza de la histopatología.

Al Laboratorio de Microscopía Avanzada y al Laboratorio de Citometría de Flujo del IMSS por capacitarme y permitirme hacer uso de sus equipos para la realización de este estudio.

A la Dra. Qing Chang y la Dra. Olga Ornatsky por su apoyo técnico y académico en la realización de la técnica de Imagenología por Citometría de Masas.

En especial agradezco a la QFB. Mónica Reynoso, a Víctor Pérez, Jorge Anaya y a Fernando Valverde por todo su apoyo técnico, indispensable para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Berenice, Damián, Dinorah e Ian, por hacer cada día más divertido que el anterior. Gracias por su apoyo, sus consejos y su paciencia. En especial,

agradezco a Berenice, el que haya sido mi compañera durante todo este viaje llamado doctorado, gracias por todo tu apoyo, por tus ideas y por siempre motivarme para seguir adelante.

Agradezco a mis papás, por estar siempre acompañándome en los nuevos retos que decido emprender, gracias por apoyarme y por brindarme las palabras adecuadas en los momentos más complicados. Los amo, muchas gracias.

A mis hermanos, muchas gracias por siempre estar a mi lado, por apoyarme, acompañarme, motivarme y recordarme que las metas se alcanzan y los sueños se cumplen.

A Ian, por todo su apoyo incondicional y por siempre creer en mí. Gracias por acompañarme, motivarme e impulsarme a ser mejor día con día. No hay palabras para agradecerte el que seas mi compañero en esta travesía. Gracias, gracias, gracias.

# Índice

Índice.....	5
Índice de Figuras .....	8
Índice de Tablas .....	9
Índice de Anexos .....	10
Resumen .....	11
Abstract .....	12
Introducción .....	13
Hematopoyesis .....	13
Microambiente Hematopoyético .....	16
Envejecimiento del Sistema Hematopoyético .....	29
Factores intrínsecos .....	33
Factores extrínsecos .....	36
Antecedentes.....	37
Cambios en el microambiente hematopoyético asociados al envejecimiento .....	37
Justificación .....	44
Planteamiento del problema .....	45
Hipótesis.....	46
Objetivo general.....	46
Objetivos específicos .....	46
Estrategia experimental .....	47
Materiales y Métodos.....	48
Muestras de Médula Ósea .....	48
Criterios de Inclusión .....	48
Criterios de exclusión.....	48
Procesamiento de Muestras de médula ósea.....	48
Eluido .....	48
Triturado .....	49
Obtención de Células Mononucleares (CMN) .....	50
Evaluación de frecuencia de Células hematopoyéticas y de MSC por citometría de flujo .....	50
Ensayo de colonias de Progenitores Hematopoyéticos.....	51

Ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F).....	52
Criopreservación.....	52
Obtención de MSC .....	53
Determinación de fenotipo de MSC en cultivo .....	53
Ensayos de diferenciación de MSC hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos.....	53
Ensayos de proliferación de MSC.....	56
Ensayos de la capacidad de soporte hematopoyético mediante un sistema de cocultivos.....	56
Procesamiento de cabeza femoral .....	60
Fijación .....	60
Descalcificación.....	60
Deshidratación e inclusión en parafina .....	60
Evaluación histológica de las biopsias de médula ósea.....	60
Inmunohistoquímica (IHQ).....	61
Análisis de imagen.....	62
Imagenología por citometría de masas (IMC) .....	64
Estadística.....	64
Resultados.....	66
Muestras de médula ósea de Adultos y Adultos Mayores.....	66
Frecuencia de Poblaciones Troncales y Progenitoras Hematopoyéticas y MSC en Médula ósea de Adultos y Adultos Mayores por citometría de flujo.....	66
Frecuencia y funcionalidad de Progenitores Hematopoyéticos y MSC en Médula Ósea de Adultos y Adultos Mayores mediante ensayos de formación de colonia in vitro ...	67
Biopsias de Médula Ósea obtenidas de Adultos y Adultos Mayores.....	71
Evaluación histopatológica y selección de muestras funcionales.....	71
Evaluación in situ de la densidad de Poblaciones Hematopoyéticas en médula ósea de adultos y adultos mayores .....	73
Evaluación in situ de la densidad de Poblaciones Estromales en médula ósea de adultos y adultos mayores .....	75
Evaluación de la asociación entre densidades de poblaciones hematopoyéticas y estromales en médula ósea.....	76
Evaluación de la asociación in situ entre la población de adipocitos y las poblaciones hematopoyéticas de HSPCs CD34+ y células MPO+ .....	79
Detección de poblaciones celulares residentes de médula ósea mediante imagenología por citometría de masas .....	82
Evaluación de la funcionalidad de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores .....	86

Determinación de fenotipo MSC de células adherentes derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores .....	86
Evaluación de la capacidad de diferenciación in vitro de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores, hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos ....	87
Evaluación de la capacidad de proliferación in vitro de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores .....	88
Evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético in vitro de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores .....	90
Discusión .....	95
Conclusiones .....	100
Perspectivas .....	101
Referencias .....	101
Anexos .....	115

## Índice de Figuras

Figura 1. Modelo de hematopoyesis humana actual. ....	14
Figura 2. Estrategia experimental del estudio.. ....	47
Figura 3. Zonas anatómicas de obtención de muestra de médula ósea. ....	49
Figura 4. Estrategia experimental del ensayo de cocultivos de HSPCs CD133+CD34+ en capas de MSC derivadas de médula ósea de adultos y de adultos mayores. ....	59
Figura 5. Tinción de CD34 para determinar funcionalidad de la muestra. ....	62
Figura 6. Imagenología por citometría de masas. ....	65
Figura 7. Frecuencia de poblaciones hematopoyéticas y MSC en médula ósea de adultos y adultos mayores por citometría de flujo.....	68
Figura 8. Frecuencia de progenitores hematopoyéticos y MSC in vitro a partir de CMN de médula ósea de adultos y adultos mayores.. ....	70
Figura 9. Comparación histológica entre biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.....	72
Figura 10. Cuantificación de la densidad de poblaciones hematopoyéticas <i>in situ</i> en biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores.. ....	74
Figura 11. Cuantificación de la densidad in situ de poblaciones estromales residentes en médula ósea en biopsias de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.. .....	78
Figura 12. Asociación por densidad in situ entre las poblaciones hematopoyéticas y estromales de médula ósea de adultos y adultos mayores. ....	79
Figura 13. Asociación in situ entre HSPCs CD34+ y adipocitos en médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.....	80
Figura 14. Asociación in situ entre las células MPO+ y los adipocitos en médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.. ....	81
Figura 15. Análisis de marcadores de poblaciones hematopoyéticas y estromales mediante imagenología por citometría de masas en biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores.....	83
Figura 16. Asociación in situ entre HSPCs CD34+ y células MPO+ con MSC NGFR+ y adipocitos en médula ósea de adultos y adultos mayores.....	84
Figura 17. Asociación in situ entre poblaciones hematopoyéticas y estromales en biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos. ....	85
Figura 18. Fenotipo de células adherentes en cultivo derivadas de muestras de médula ósea.....	87

Figura 19. Evaluación de la capacidad de diferenciación de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos. ....	90
Figura 20. Evaluación de la capacidad de proliferación de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores. ....	90
Figura 21. Evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores. ....	93
Figura 22. Modelo de cambios asociados al envejecimiento fisiológico en la organización del microambiente hematopoyético.....	100

## Índice de Tablas

Tabla 1. Marcadores de superficie utilizados para la identificación de progenitores hematopoyéticos.....	15
Tabla 2. Poblaciones residentes en médula ósea y las proteínas que producen con implicación en la hematopoyesis.....	18
Tabla 3. Panel de tinción de CMN derivadas de médula ósea para evaluación por citometría de flujo. ....	51
Tabla 4. Detalle de anticuerpos utilizados en la tinción por citometría de flujo. ....	51
Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la evaluación del fenotipo de MSC en cultivo por citometría de flujo. ....	53
Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la detección de las poblaciones celulares residentes en médula ósea. ....	63
Tabla 7. Anticuerpos acoplados a metales no esenciales utilizados para la tinción por IMC de cortes de médula ósea de adultos y adultos mayores. ....	65
Tabla 8. Parámetros de sangre periférica de pacientes hematológicamente sanos entre 50 y 92 años de edad. ....	66
Tabla 9. Fenotipo de células en cultivo derivadas de muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores.....	87

## Índice de Anexos

Anexo 1 Aprobación Ética del Protocolo .....	115
Anexo 2 Formato de Consentimiento Verbal.....	116
Anexo 3 Anticuerpos utilizados para IHQ.....	117
Anexo 4 Artículo aceptado en Stem Cell Reports. ....	117

## Resumen

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para la transformación oncogénica. En el sistema hematopoyético, el envejecimiento se relaciona con la hematopoyesis clonal y el sesgo de diferenciación hacia linaje mieloide. Existen alteraciones intrínsecas a las células troncales hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés, hematopoietic stem cells) que se asocian con el envejecimiento, incluyendo; cambios en su polaridad, autofagia, actividad mitocondrial y alteraciones epigenéticas. Factores extrínsecos a las HSC como un incremento en el contenido adiposo de la médula ósea y alteraciones en su microambiente también se han reportado. Sin embargo, algunos hallazgos son contradictorios o se basan únicamente en modelos murinos, y hasta el momento no se conoce claramente si el envejecimiento tiene un impacto en la arquitectura espacial de la médula ósea. En este estudio, comparamos sistemáticamente la frecuencia y relación espacial entre las poblaciones celulares que conforman los dos compartimentos del microambiente de la médula ósea: el compartimento hematopoyético, incluyendo células troncales/progenitoras hematopoyéticas CD34+ (HSPC CD34+), células mieloides en maduración, linfocitos, megacariocitos y progenitores eritroides tempranos; y el compartimento estromal constituido por las células mesenquimales estromales (MSC), adipocitos, macrófagos, arterias, capilares y osteoblastos en la médula ósea de individuos hematológicamente sanos desde 50 a 92 años de edad. Encontramos, que el envejecimiento incrementa la densidad de adipocitos, de células mieloides y de células progenitoras y troncales CD34+ (HSPC). El uso de imagenología por citometría de masas (IMC) confirmó el mantenimiento del contacto entre las HSPC y las MSC y un incremento en el contacto con adipocitos en individuos mayores. Además, encontramos que con el envejecimiento, la densidad de células mieloides incrementa en las áreas hematopoyéticas que rodean a los adipocitos. Con respecto a las demás poblaciones hematopoyéticas y estromales, no encontramos diferencias en su frecuencia y en su asociación en los dos grupos de estudio. Sin embargo, encontramos que las poblaciones hematopoyéticas se encuentran adyacentes a las MSC o a los adipocitos, y en ocasiones a ambas poblaciones, en ambos grupos estudiados, sugiriendo que ambas poblaciones estromales tienen un papel muy importante en la regulación de la hematopoyesis. En este estudio, describimos que las HSPC en adultos y adultos mayores se localizan en una zona perivascular, adyacentes a MSC, adipocitos y células mieloides. El envejecimiento, incrementa ésta interacción entre adipocitos, HSPC y células mieloides. Proponemos que el incremento en

la adyacencia de las HSPC CD34+ hacia los adipocitos en el microambiente de la médula ósea puede influir en el sesgo hacia linaje mieloide de las HSPC envejecidas, contribuyendo al riesgo de desarrollo de transformación mieloide asociada al envejecimiento. Por lo cual, concluimos que cambios en la arquitectura espacial de la médula ósea contribuyen a los cambios asociados al envejecimiento de las HSC.

## Abstract

Age-related clonal hematopoiesis is a major risk factor for myeloid malignancy and myeloid skewing is a hallmark of aging. Meanwhile, changes in hematopoietic stem cell (HSC) polarity, autophagy, mitochondrial activity and epigenetic remodeling have been associated to HSC aging, there have been few studies of how the spatial architecture of human bone marrow (BM) changes with aging. In this study, we systematically compared the frequency and spatial relationship between cell populations which comprise the two compartments constituting the bone marrow microenvironment: the hematopoietic compartment, including CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs), maturing myeloid cells, lymphocytes, megakaryocytes, early erythroid progenitors; and the stromal compartment, composed by BMSCs, adipocytes, macrophages, arteries and capillaries and osteoblasts within the BM of individuals from 50-92 years old. BM adiposity increased with age which correlated with increased density of maturing myeloid cells and CD34+HSPCs and an increased proportion of CD34+HSPCs adjacent to adipocytes. By contrast, MSC density and distance of HSPCs from vessels remained stable. Imaging mass cytometry confirmed maintenance of contact between HSPCs and MSCs and increased contact with adipocytes in aged individuals. Interestingly, we found that upon aging, maturing myeloid cell density increases in hematopoietic areas surrounding adipocytes. Regarding other hematopoietic and stromal cell populations, no differences in their frequency or association was observed in both age groups. However, we found that other hematopoietic cell populations are adjacent to MSCs or adipocytes in both age groups, and in some cases to both populations, suggesting both populations play important roles in hematopoietic regulation. We propose that increased adjacency to adipocytes in the BM microenvironment may influence myeloid skewing of aging HSPCs. We conclude that changes in BM spatial architecture contributes to HSC aging-related changes.

# Introducción

## Hematopoyesis

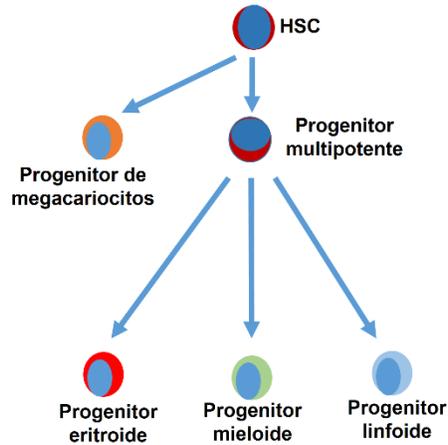
La hematopoyesis es el proceso mediante el cual se producen todas las células que constituyen el tejido sanguíneo. La hematopoyesis es responsable de la generación de más de 10 tipos celulares diferentes y de más de 300 billones de células al día. Las células producidas cumplen funciones cruciales para el organismo, tales como formar parte del sistema inmunológico y transportar el oxígeno a todas las partes de cuerpo. La hematopoyesis es un proceso jerárquico, el cual tiene como base a las células troncales hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés, Hematopoietic Stem Cells), células con la capacidad de diferenciarse en todos los linajes hematopoyéticos y con la capacidad de autorenovarse. Las HSC se diferencian en progenitores multipotentes, y éstos a su vez en progenitores comprometidos a linajes específicos y posteriormente, estos se diferencian en células maduras<sup>1-3</sup>.

### Modelos de hematopoyesis

La hematopoyesis es un proceso que involucra una red de progenitores jerárquicamente distintos que son producidos por los procesos de diferenciación de las HSC. El modelo clásico de hematopoyesis, postula que el primer destino celular a partir de las HSC, es la divergencia de los linajes mieloides y linfoides, dando lugar al progenitor común mieloide (CMP, por sus siglas en inglés, Common Myeloid Progenitor) y al progenitor común linfoide (CLP, por sus siglas en inglés, Common Lymphoid Progenitor)<sup>4,5</sup>. Posteriormente el CMP, tiene capacidad para diferenciarse en el progenitor megacariocítico-eritroide (MEP, por sus siglas en inglés, Megakaryocyte-Erythroid Progenitor) y al progenitor granulomonocítico (GMP, por sus siglas en inglés, Granulocyte-Monocyte Progenitor). A su vez, el MEP dará lugar a las células eritroides y a los megacariocitos, mientras que el GMP producirá granulocitos (basófilos, neutrófilos y eosinófilos) y monocitos (monocitos-macrófagos).

Recientemente, el modelo clásico de hematopoyesis fue modificado, debido a observaciones realizadas por el grupo del Dr. John Dick, en el cual reportan que el progenitor megacariocítico diverge temprano en la diferenciación hematopoyética, produciéndose directamente a partir de la HSC. Además, reportan que tanto el linaje eritroide, mieloide y linfoide, se diferencian a partir de un progenitor multipotente común (MPP), el cual tiene la capacidad de dar lugar a progenitores unipotentes: mieloides, eritroides y linfoides (Fig. 1)<sup>3</sup>. En la tabla 1, se especifican los marcadores que hasta el

momento se han utilizado para estudiar a las poblaciones de progenitores hematopoyéticos<sup>2</sup>.



**Figura 1. Modelo de hematopoyesis humana actual.** HSC: Células Troncales Hematopoyéticas.

### **Células troncales hematopoyéticas (HSC)**

Las HSC fueron identificadas por primera vez gracias a los estudios realizados por Till & McCulloch en 1961, en los cuales exploraron como la radiación ionizante afectaba a las células de los mamíferos. Sus experimentos consistieron en trasplantar células hematopoyéticas de médula ósea, a ratones previamente irradiados con dosis letales. Las células hematopoyéticas de médula ósea fueron capaces de reconstituir la médula ósea y además de formar nódulos en el bazo<sup>32</sup>. Posteriormente, al realizar el trasplante de células hematopoyéticas marcadas con rompimiento de cromosomas, observaron que los nódulos formados en el bazo, contenían colonias de células mieloides, eritroides y linfoides que compartían los mismos rompimientos cromosómicos, por lo que provenían de una misma clona. Los investigadores dedujeron que existían células muy inmaduras capaces de formar colonias de los tres linajes y de reconstituir la médula ósea, las cuales denominaron como HSC<sup>33</sup>. Estos estudios utilizaron ensayos clonogénicos que permitían evaluar la capacidad funcional de las células para dar lugar a los múltiples linajes hematopoyéticos. Posteriormente, con el uso de marcadores celulares se logró aislar por primera vez a las HSC en ratón, la cual era una población que presentaba baja expresión de la proteína de superficie Thy-1(CD90)<sup>3</sup>.

El estudio de la identificación y aislamiento de las HSC ha tenido como principal problema, la pureza de la población obtenida, ya que aunque se descubrieron diversos marcadores de superficie para las HSC en ratón (Thy-1<sup>lo</sup>Sca-1<sup>c-kit</sup>Linaje<sup>-</sup> o Sca-1<sup>c-kit</sup>

Linaje<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>), esas poblaciones solo contenían un 20% de células con capacidad de repoblación a largo plazo<sup>6-8</sup>. Por lo cual, a partir de entonces se ha trabajado en buscar marcadores con los cuales se pueda asilar a una población de HSC más pura. Utilizando perfiles de expresión genética de poblaciones purificadas de HSC y de MPP, el grupo del Dr. Morrison, identificó marcadores de superficie que estaban expresados de manera diferencial en el compartimento de células troncales y progenitoras. Identificaron a las proteínas de la familia SLAM como candidatos principales para distinguir a las HSC de progenitores. Las HSC expresaban CD150 y carecían de la expresión de CD244 y CD48, mientras que el inmunofenotipo de las MPP era CD244<sup>+</sup>CD150<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup> y los progenitores comprometidos expresaban solo los antígenos CD244 y CD48<sup>9</sup>. Este fue el primer estudio que pudo aislar a una población más pura de HSC utilizando solo tres marcadores de superficie para su identificación. Estudios más recientes han agregado a estos marcadores, la expresión de  $\alpha$ -catulina para obtener una población más pura de HSC<sup>10</sup>.

Tabla 1. Marcadores de superficie utilizados para la identificación de progenitores hematopoyéticos.

POBLACIÓN CELULAR	FENOTIPO	LINAJES CELULARES
<b>MPP</b>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> Thy1 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup> FIt3 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> CD10 <sup>-</sup>	Todos los linajes
<b>MLP7-</b>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> Thy1 <sup>neg-lo</sup> CD45RA <sup>+</sup> FIt3 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> CD10 <sup>+</sup>	B, T, NK, MDC
<b>MLP7+</b>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> Thy1 <sup>neg-lo</sup> CD45RA <sup>+</sup> FIt3 <sup>+</sup> CD7 <sup>+</sup> CD10 <sup>+</sup>	B, T, NK, MDC
<b>CMP</b>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> Thy1 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup> FIt3 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> CD10 <sup>-</sup>	EMK, G, MDC
<b>GMP</b>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> Thy1 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> FIt3 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> CD10 <sup>-</sup>	G, MDC
<b>MEP</b>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> Thy1 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> FIt3 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> CD10 <sup>-</sup>	EMK
<b>B-NK</b>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> Thy1 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> FIt3 <sup>+</sup> CD7 <sup>-</sup> CD10 <sup>+</sup>	B o NK

Tabla modificada de Doulatov et al. 2010 Nature. MPP: progenitores multipotenciales. MLP7/7+: progenitor multilineal con o sin expresión de CD7. CMP: Progenitor mielóide común. GMP: Progenitor de granulocitos y monocitos. MEP: Progenitor eritroide-megacariocítico. B-NK: Progenitor de B o células NK. MDC: Monocitos y células dendríticas. EMK: Eritroides y megacariocitos.

En humano, la primera población identificada con la capacidad de responder a citocinas hematopoyéticas y diferenciarse *in vitro* a los diferentes linajes hematopoyéticos, fue la población positiva para la glicoproteína CD34<sup>11,12</sup>. Sin embargo, se demostró que la población CD34<sup>+</sup> estaba enriquecida en progenitores hematopoyéticos, por lo que utilizando marcadores reportados previamente en ratón como Thy1 (CD90), en combinación con CD34, Baum y colaboradores pudieron identificar una población de células CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>. Esta población contenía progenitores pluripotentes capaces de generar colonias en sistemas de cultivo mielóide-eritroide, linfóide de tipo B y T, además, tenían la

capacidad de formar cultivos a largo plazo<sup>13</sup>. Estudios *in vivo*, utilizando un modelo de ratón inmunodeficiente NOD/SCID, el cual tiene como característica la ausencia de diferenciación linfóide de tipo T y B, han reportado que la población de HSC reside dentro de la población CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Linaje<sup>-</sup>. Dicha población contenía células capaces de reconstituir a largo plazo la hematopoyesis humana en ratones, además de ser capaz de llevar a cabo trasplantes secundarios y terciarios<sup>14</sup>. Sin embargo, la población CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Linaje<sup>-</sup> era heterogénea en su composición de HSC y progenitores. Realizando una combinación de los marcadores previamente reportados y utilizando un modelo de xenotrasplante y complementando con estudios *in vitro*, Majeti y colaboradores demostraron que, en cordón umbilical, la población CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>Linaje<sup>-</sup> contenía a las HSC humanas y que sus características troncales podían observarse hasta con una dilución de sólo 10 células<sup>1</sup>. En 2011, Notta y colaboradores, agregaron a la integrina CD49f como un marcador capaz de identificar a la población de HSC, encontrando que una célula CD49f<sup>+</sup> era altamente eficiente en la generación de injertos multilínea a largo plazo, y que las células CD49f<sup>-</sup> pertenecían a progenitores multipotentes con capacidad de injerto (MPPs)<sup>15</sup>. Hasta el momento, la población CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>Linaje<sup>-</sup> es la que identifica de mejor manera la población de HSC en humanos.

### Microambiente Hematopoyético

La hematopoyesis se lleva a cabo en la médula ósea, tejido donde residen las HSC dentro de un complejo y dinámico microambiente, donde múltiples tipos celulares y factores moleculares se encargan de regular la hematopoyesis<sup>16</sup>. Al conjunto de poblaciones celulares y factores que se encargan de la regulación y mantenimiento de la hematopoyesis se les conoce como microambiente hematopoyético. Todas las células hematopoyéticas, desde las HSC hasta las maduras que salen a circulación, se encuentran dentro del microambiente hematopoyético. Sin embargo, Schofield postuló que las HSC se localizan en un sitio específico dentro de éste microambiente, asociadas fuertemente a otros tipos celulares que regulan su fisiología y las protegen de señales de inducción (maduración o proliferación)<sup>17</sup>. Schofield nombró a éste sitio acuñando el término de nicho, lugar en el que son reguladas específicamente las funciones de las HSC.

El microambiente hematopoyético está formado por factores tróficos y por diversos tipos celulares, entre los que se encuentran osteoblastos (OBs), células endoteliales (ECs), células mesenquimales estromales (MSC), macrófagos y adipocitos. En la tabla 2, se

resumen los factores producidos por las poblaciones presentes en médula ósea y su implicación en la hematopoyesis.

### **Factores tróficos**

Uno de los primeros factores que se descubrió con potencial para regular a las HSC fue el factor de células troncales (SCF, por sus siglas en inglés, Stem Cell Factor). Esto se debió a la observación de que ratones homocigotos para mutaciones en el gen de c-Kit (lo cuales producen una proteína no funcional), morían perinatalmente de anemia severa<sup>18</sup>. Esto llevó a la conclusión de que este receptor junto con su ligando SCF eran indispensables para la hematopoyesis. En un estudio posterior, en donde se bloqueó la función de c-Kit utilizando un anticuerpo monoclonal, encontraron que todos los progenitores hematopoyéticos desaparecieron de médula ósea, y por consiguiente, no había maduración hacia linaje mielóide ni eritroide<sup>19</sup>.

El factor derivado del estroma 1 (CXCL-12 o SDF1, por sus siglas en inglés, Stroma-derived Factor 1) y su receptor el C-X-C receptor de quimiocinas tipo 4 (CXCR4) constituyen un eje conocido como el principal regulador de la localización de las HSC en médula ósea. Sugiyama y colaboradores eliminaron la expresión del receptor CXCR4 y reportaron una reducción severa en el número de HSC en médula ósea<sup>20</sup>. Por otra parte, se describió que el eje CXCL12-CXCR4, era indispensable para el reclutamiento y mantenimiento (homing) de las HSC en médula ósea, ya que al disminuir los niveles de CXCL12 mediada por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés, granulocyte colony stimulating factor), las HSC se movilizaban a sangre periférica<sup>21</sup>. Además del eje CXCL12-CXCR4, angiopoyetina 1 (ANG1) a través de su receptor Tie2, regula la quiescencia de las HSC y su capacidad de repoblación a largo plazo<sup>22</sup>. A su vez, trombopoyetina también regula la quiescencia de las HSC<sup>23,24</sup>.

Las proteínas de la vía WNT regulan las funciones de las HSC. Reya y colaboradores demostraron que el ligando WNT3A, activa la vía canónica de WNT en las HSC y promueve su expansión y autorenovación *in vitro*<sup>25</sup>. Sin embargo, una activación constitutiva de esta vía lleva eventualmente a la pérdida de la población de HSC<sup>26</sup>. Por otro lado, la activación de la vía no canónica de WNT, mediada por el ligando WNT5A, inhibe la actividad de la vía canónica, promueve la capacidad multilinaje de las HSC e incrementa su capacidad de repoblación de corto y largo plazo, manteniendo a las HSC en un estado quiescente<sup>27</sup>.

Tabla 2. Poblaciones residentes en médula ósea y las proteínas que producen con implicación en la hematopoyesis.

<b>Poblaciones de Médula Ósea</b>	<b>Proteínas expresadas</b>	<b>Implicación hematopoyética</b>	<b>Referencias</b>
<b>Osteoblastos</b>	Jagged1	Incremento en las HSC	Calvi et al. 2013
	Angiopoyetina	Mantenimiento de las HSC	Arai et al. 2004
	Osteopontina	Regulación negativa del tamaño de la población de HSC	Nilsson et al. 2005; Stier et al. 2005.
	CXCL12	Mantenimiento de progenitores linfoides	Ding et al. 2013.
<b>Células Endoteliales</b>	Ligandos de Notch	Proliferación y supervivencia de las HSC	Butler et al. 2010
	SCF y CXCL12	Mantenimiento de las HSC	Ding et al. 2012; Ding et al. 2013
<b>Megacariocitos</b>	Trombopoyetina	Quiescencia y mantenimiento de las HSC	Nakamura-Ishizu et al. 2014
	CXCL4	Regulación del ciclo celular de las HSC	Bruns et al. 2014
<b>MSC</b>	G-CSF, SCF, LIF, M-CSF, IL-11 y IL-6	Soporte hematopoyético <i>in vitro</i>	Haynesworth et al. 1996
	CXCL12, SCF, Ang1 y IL-7.	Mantenimiento en médula ósea, supervivencia y diferenciación de las HSC	Méndez-Ferrer et al. 2010; Sugiyama et al. 2012; Ding et al. 2012; Ding et al 2013
<b>Adipocitos</b>	SCF	Mantenimiento de las HSC y regeneración de la médula ósea después de la irradiación	Zhou et. al 2017
	IL-3	Diferenciación mieloide	Mattiucci et al 2018
	Adiponectina	Regeneración hematopoyética y diferenciación mieloide	Cuminetti et al. 2019; Masamoto et al. 2017
	Ang2 y IGF1	Mantenimiento de las HSC	Mattiucci et al 2018
	Leptina	Diferenciación mieloide	Cuminetti et al. 2019

La vía de señalización de Notch también ha sido bastante estudiada con respecto a su papel en la regulación de las HSC. Los primeros estudios reportaron que realizando un cocultivo de células precursoras en un capa de células que expresaban el ligando de Notch, Jagged1, encontraron un incremento de 2 a 3 veces en el número de precursores,

concluyendo que la vía de Notch promovía la expansión de las HSC<sup>28</sup>. Posteriormente, se reportó su expresión en células del microambiente hematopoyético que participan activamente en la regulación de las HSC<sup>29-31</sup>.

- **Osteoblastos (OBs)**

Los osteoblastos son células de origen mesodermal, los cuales se encargan principalmente de la producción de proteínas de matriz extracelular que forman el hueso<sup>32</sup>. Los osteoblastos pertenecen a la zona endosteal y trabecular de la médula ósea. La zona endosteal es la superficie interna del hueso, en la interface entre el hueso y la médula ósea. Esta superficie está cubierta por una capa protectora de células que delimitan al hueso, las cuales, son un conjunto de células heterogéneas en su grado de diferenciación, y solo una pequeña proporción de estas son osteoblastos<sup>33</sup>. La zona trabecular se refiere al hueso que se localiza dentro de la zona hematopoyética, formado una red ósea, conocido como hueso esponjoso. Los osteoblastos y los osteoclastos se encuentran en un equilibrio bajo condiciones normales, pero pueden incrementar o disminuir en frecuencia dependiendo si el hueso está siendo formado o remodelado<sup>32,34</sup>.

Los primeros reportes acerca del papel que los osteoblastos juegan en la regulación de las HSC, vino de dos grupos que, utilizando diferentes estrategias metodológicas, simultáneamente reportaron que los OBs eran el nicho de las HSC. El grupo del Dr. Scadden, utilizó un modelo de ratón genéticamente modificado para tener constitutivamente activo el eje de la hormona paratiroidea en los osteoblastos, lo cual a su vez mantiene a los OB constitutivamente activados. Lo que encontraron fue que este eje aumenta el número de OBs y estos a su vez, producen mayores niveles del ligando de Notch, Jagged1, el cual soporta e incrementa el número de HSC<sup>29</sup>. Por su parte, el grupo del Dr. Li, utilizó un modelo de ratón con inactivación condicional de la vía de señalización de la proteína morfogénica de hueso (BMP). Encontraron que al inactivar esta vía, había un incremento en el número de osteoblastos N-caderina<sup>+</sup> y las HSC se incrementaban considerablemente, incluso demostraron que las HSC hacían contacto directo con los OBs<sup>35</sup>. Es importante resaltar, que un problema con los estudios anteriores fue que estos modelos no afectaban exclusivamente a los osteoblastos, sino también a las MSC en diferentes estadios de diferenciación hacia osteoblastos. Asimismo, se ha demostrado que los osteoblastos producen factores que regulan el mantenimiento de las HSC en médula ósea, incluyendo factores positivos tales como angiopoyetina<sup>22</sup> y reguladores negativos como osteopontina<sup>36,37</sup>.

Estudios en los cuales fueron eliminados selectivamente factores fundamentales para la regulación de las HSC, tales como SCF y CXCL12, de poblaciones específicas de la médula ósea, demostraron que los osteoblastos no participan directamente en la regulación de las HSC. Al eliminar condicionalmente la expresión de SCF de la población de osteoblastos, el grupo del Dr. Morrison reportó que los ratones presentaban hematopoyesis normal, con conteos sanguíneos normales, celularidad y linajes normales en médula ósea y en el bazo. Además, las HSC obtenidas de estos ratones presentaban capacidades normales de repoblación, concluyendo que el SCF producido por los OB no era indispensable para las HSC<sup>38</sup>. En un estudio posterior, el grupo del Dr. Morrison, eliminó condicionalmente la expresión de CXCL12 de los OBs y lo que encontraron fue, que nuevamente la población de HSC no presentaba cambios. Sin embargo, la población de progenitores linfoides tempranos desaparecía, indicando que los OBs tienen un papel fundamental en el mantenimiento de los progenitores linfoides<sup>39</sup>. Hallazgo que confirmó lo antes reportado por Emerson y colaboradores, quienes reportaron el papel indispensable de los OBs en la diferenciación linfóide, desde HSC comprometidas a linaje linfóide, progenitores de tipo B hasta células B maduras<sup>40</sup>.

- **Células endoteliales (ECs)**

Las células endoteliales son células aplanadas de origen mesodérmico, que forman parte de una de las capas celulares que forman a los vasos sanguíneos. Las células vasculares endoteliales forman una red que participa en la regulación de la homeostasis y el metabolismo, llevando oxígeno, nutrientes y otros componentes a los distintos órganos. Esta red tan diversa sirve como una carretera celular que permite el tránsito de células sanguíneas y otros tipos celulares a través de todo el cuerpo<sup>41</sup>. Además, las ECs llevan a cabo un rol muy importante como reguladores de la homeostasis y regeneración de los órganos, a través de la interacción directa con células troncales y progenitoras locales y la secreción de factores angiogénicos<sup>42</sup>. En médula ósea, las ECs forman una barrera mecánica que previene la entrada de eritrocitos maduros y plaquetas desde la circulación, además de regular el tráfico celular, la hematopoyesis y la osteogénesis<sup>43</sup>.

Los primeros reportes acerca de la participación de las ECs en la regulación de la hematopoyesis, provinieron de estudios de hematopoyesis extramedular en hígado de ratón, en los cuales se reportó que dicha hematopoyesis se llevaba a cabo en contacto con ECs sinusoidales. Además estas células eran capaces de soportar *in vitro* la diferenciación y proliferación de las células hematopoyéticas primitivas<sup>44</sup>. Después, aislando ECs de

diferentes órganos no hematopoyéticos y cultivándolas con poblaciones progenitoras hematopoyéticas (Sca<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Linaje<sup>-</sup>), Yoder y colaboradores demostraron que ECs derivadas de corazón y cerebro eran capaces de incrementar el número de progenitores. Asimismo, ECs derivadas de corazón e hígado eran capaces de mantener a los progenitores en cultivos a largo plazo<sup>45</sup>, demostrando que independientemente del lugar de extracción, las ECs eran capaces de soporte hematopoyético.

Con la identificación de las HSC de ratón, utilizando solo tres marcadores (CD150<sup>+</sup>CD244<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>), fue posible determinar que en médula ósea las HSC se localizan adyacentes a las ECs, específicamente de los sinusoides<sup>9</sup>. Raffi y colaboradores, demostraron que en cocultivos de ECs con HSCs de ratón (libres de suero y citocinas), el contacto célula-célula incrementaba la expansión de las HSCs, las cuales mantenían su capacidad de autorenovación en ensayos de trasplantes seriales. Aunado a esto, reportaron que la expresión de ligandos de Notch por parte de las ECs promovía la proliferación de las HSC y prevenía el agotamiento de la población<sup>31</sup>.

Evidencias que descartaron al nicho endosteal como nicho de las HSC, propusieron en su lugar al nicho endotelial. Morrison y colaboradores, demostraron que al eliminar la expresión de SCF de las ECs y las células perivasculares, la población de HSCs se eliminaba de la médula ósea, concluyendo que las HSCs se encontraban en un nicho perivascular<sup>38</sup>. A su vez, la eliminación de expresión de CXCL12 de las ECs también eliminaba la población de HSCs, concluyéndose que la producción de SCF y CXCL12 por parte de las ECs es indispensable para el mantenimiento de la población de HSCs<sup>39</sup>. Estudios posteriores arrojaron controversia acerca del tipo de vasos sanguíneos en los que se localizaban, el grupo del Dr. Morrison demostró que la localización de las HSC era específicamente cerca de los sinusoides<sup>10</sup>, mientras que el grupo del Dr. Lapidot las localizó cerca de las arterias<sup>41</sup>. Estudios en humano, también han posicionado a las HSPCs CD34<sup>+</sup> en un nicho perivascular, cerca de los sinusoides<sup>46,47</sup>.

- **Células hematopoyéticas maduras**

En la médula ósea interactúan diferentes tipos de poblaciones celulares, tanto estromales como hematopoyéticas, las cuales mantienen un equilibrio para que se lleven a cabo procesos tanto del sistema hematopoyético como del esquelético. Por lo cual, la existencia de retroalimentación en el proceso de hematopoyesis, no se descarta. Como se mencionó anteriormente, la hematopoyesis inicia con las HSC, los cuales dan origen a los progenitores y éstos a células maduras que llevan a cabo una función efectora específica.

Existen células maduras hematopoyéticas que llevan a cabo su función en médula ósea, tales como los megacariocitos, macrófagos y células linfoides B. Existen reportes de la participación de los megacariocitos y macrófagos en la regulación de la hematopoyesis. En un estudio realizado por el grupo del Dr. Suda, reportaron la producción de trombopoyetina por parte de los megacariocitos y como esta era indispensable para el mantenimiento y quiescencia de las HSC<sup>48</sup>. Además, se demostró que las HSC se encontraban en contacto con los megacariocitos y que son capaces de regular el estado de ciclo celular en el que se encuentran las HSC gracias a la expresión de CXCL4<sup>49</sup>. Con respecto a los macrófagos, la participación de estos en la eritropoyesis fue sugerida hace muchas décadas, cuando fueron descritas las islas eritroblásticas en la médula ósea, las cuales están compuestas por un macrófago rodeado de eritroblastos en desarrollo. El grupo del Dr. Frenette, describió que al depletar la población de macrófagos CD169<sup>+</sup>, se redujo significativamente la población de eritroblastos en médula ósea. Además, su depleción no permitía la recuperación eritroide de la anemia hemolítica, la cual involucra pérdida aguda de sangre y de la mieloablación, sugiriendo que los macrófagos son indispensables para el mantenimiento de la eritropoyesis<sup>50</sup>. En estudios posteriores, se reportó que al depletar una población de macrófagos asociados a la zona endosteal (osteomacs), había pérdida de los osteoblastos endosteales y movilización de las HSC a sangre periférica, concluyendo que estos participan en el mantenimiento de las HSC en médula ósea<sup>51</sup>.

- **Células mesenquimales estromales (MSC)**

Las células mesenquimales estromales son células de forma fibroblastoide que se distribuyen a lo largo de la médula ósea, haciendo contacto con las demás poblaciones celulares residentes. Las MSC fueron descritas por primera vez por Friedenstein en 1970, como células adherentes, de forma alargada y capaces de formar colonias *in vitro*<sup>52</sup>. Las colonias de MSC fueron denominadas como unidades formadoras de colonia de fibroblastos (CFU-F)<sup>53</sup>. Posteriormente, fue descrito que las MSC derivadas de humano, tenían la capacidad para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos *in vitro*. Asimismo, demostraron que la diferenciación no se debía a una población heterogénea de progenitores, sino que las MSC eran células pluripotentes con la capacidad de diferenciación a los tres linajes<sup>54</sup>.

Aunado a su capacidad pluripotente, las MSC han sido propuestas como una población celular fundamental para el mantenimiento de las células hematopoyéticas. Años después de que Friedenstein describiera a las MSC, Dexter y colaboradores propusieron

un sistema en el cual las MSC servían como andamiaje para las HSC y las mantenían en cultivo por periodos largos de tiempo, describiendo así la capacidad de soporte hematopoyético de las MSC<sup>55</sup>. Utilizando análisis de expresión de citocinas, Haynesworth y colaboradores, reportaron que las MSC producían *in vitro* G-CSF, SCF, factor inhibidor de la leucemia (LIF, por sus siglas en inglés, Leukemia Inhibitory Factor), factor estimulador de colonias de monocitos (M-CSF, por sus siglas en inglés, Monocyte Colony Stimulating Factor), interleucina 11 (IL-11) e interleucina 6 (IL-6), citocinas fundamentales para el soporte hematopoyético<sup>56</sup>. En modelos *in vivo*, se ha descrito que las MSC producen CXCL12 y SCF, las cuales son fundamentales para el mantenimiento de las HSC en médula ósea. Utilizando un ratón transgénico que expresa la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés, Green Fluorescent Protein) cuando la célula expresa nestina, se describió que las MSC Nestina<sup>+</sup> estaban en contacto con las HSC en la médula ósea. Este fue el primer reporte posicionando a las MSC como el nicho de las HSC, demostrando además que las MSC Nestina<sup>+</sup> producían CXCL12, Ang-1, SCF e IL-7<sup>57</sup>. Ese mismo año, Nagasawa y colaboradores, publicaron un estudio en el cual al eliminar poblaciones progenitoras de adipocitos y osteoblastos productoras de CXCL12 de la médula ósea, la población de HSPC disminuía considerablemente, población a la que denominaron como productoras de CXCL12<sup>58</sup>. Años después, utilizando una técnica diferente para eliminar la expresión de CXCL12 selectivamente de poblaciones específicas de la médula ósea, el grupo del Dr. Morrison, determinó que las HSC dependían esencialmente del CXCL12 producido por las MSC y las células endoteliales<sup>38</sup>.

En humanos, se conoce muy poco acerca de la regulación *in vivo* de las HSC por parte de las MSC, ya que la mayoría de los reportes provienen de estudios *in vitro*. Sin embargo, existen evidencias acerca de la asociación espacial que existe entre las MSC y HSC en la médula ósea. En 2005, fue reportado que las MSC constituían nichos para los progenitores linfoides. Mediante inmunohistoquímica y utilizando marcadores para las diferentes etapas de diferenciación linfóide de tipo B, el grupo de la Dra. Torlakovic reportó que las MSC CD10<sup>+</sup> estaban en contacto con más de una célula en diferentes estadios de diferenciación del linaje B<sup>59</sup>. Por otra parte, un estudio posterior demostró contacto directo entre HSPC CD34<sup>+</sup> y MSC en médula ósea humana, reportando que el 80% de las células CD34<sup>+</sup> hacían contacto con MSC NGFR<sup>+</sup><sup>46</sup>.

Debido al papel tan importante que desempeñan las MSC en la regulación de la hematopoyesis y a sus capacidades de diferenciación hacia linaje condrogénico,

adipogénico y osteogénico, el estudio de éstas se ha enfocado en identificarlas y aislarlas para su posible uso en terapia celular. Desde su descubrimiento se ha buscado encontrar marcadores celulares específicos que permitan aislarlas.

### **Poblaciones de MSC identificadas en ratón**

Estudios en ratón han identificado diferentes marcadores para las MSC. Utilizando inmunohistoquímica, el grupo del Dr. Nagasawa identificó una población de células reticulares con alta expresión de CXCL12, las cuales hacían contacto directo con células c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup><sup>20</sup>. Por otra parte, el grupo del Dr. Frenette identificó a las MSC Nestina<sup>+</sup>, las cuales eran las principales productoras de CXCL12 y SCF y se encontraban en contacto directo con las HSC. Asimismo, describieron que esta población era capaz de diferenciarse *in vitro* a los tres linajes descritos para las MSC y de formar colonias *in vitro*<sup>57</sup>. Sin embargo, datos controversiales han sido publicados acerca de la existencia de esta población de MSC, ya que diferentes grupos han publicado que la población Nestina<sup>+</sup> no tiene capacidad para formar colonias *in vitro* y que no son las productoras principales de factores esenciales para las HSC<sup>60,61</sup>. El grupo que descartó primero las capacidades de MSC de la población Nestina<sup>+</sup> fue el grupo del Dr. Morrison, el cual describió la existencia de una población positiva para el receptor de Leptina (Lepr), la cual era la principal fuente de hueso en la médula ósea de ratón adulto. Utilizando un ratón transgénico, en el cual la expresión de la proteína Tomato dependía de la expresión de Lepr, demostraron que la población Lepr<sup>+</sup> tenía la habilidad de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condrocitos *in vitro*. Además esta población producía factores esenciales para las HSC y a su vez, daba lugar a adipocitos y osteoblastos *in vivo* durante el desarrollo y en respuesta a daño<sup>60</sup>.

Recientemente, utilizando análisis de secuenciación de RNA de una sola célula, se describió la heterogeneidad presente en las poblaciones estromales en médula ósea de ratón, incluyendo la población de MSC, tomando en cuenta sus patrones de expresión de genes de diferenciación y de soporte hematopoyético. De forma interesante, fue descrito que éstas cambian en situaciones de estrés y en un modelo de leucemia<sup>62,63</sup>. Tikhonova y colaboradores describieron que dentro de la población de MSC Lepr<sup>+</sup> se podían identificar cuatro subtipos celulares, dividiéndose de acuerdo a sus patrones de expresión de genes de diferenciación hacia linaje osteogénico y adipogénico. De forma interesante, los subconjuntos de MSC que expresaban genes de linaje adipogénico, eran los principales productores de citocinas importantes para el soporte hematopoyético, tales como CXCL12, SCF e IL-7. Incluso reportaron que estos subtipos eran favorecidos en condiciones de

estrés<sup>63</sup>. A su vez, el grupo del Dr. Scadden identificó 17 subtipos de poblaciones celulares que conforman el estroma de la médula ósea de ratón, siendo conformado por MSC, progenitores y precursores de los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, incluyendo también poblaciones de fibroblastos, pericitos y células endoteliales<sup>62</sup>. Sin embargo, describieron que la producción de SCF y CXCL12 está restringido a las poblaciones de MSC Lepr+, una población de osteoprogenitores tempranos y algunas poblaciones de pericitos y células endoteliales. Ambos estudios confirman que Lepr representa el marcador de MSC en ratón y que dicha población se encuentra conformada por subpoblaciones diferenciadas por patrones de expresión.

### **Poblaciones de MSC identificadas en humano**

En humanos, el estudio de las MSC se ha enfocado principalmente para su uso en terapia, debido a su capacidad de diferenciación a cartílago, hueso y tejido adiposo. Muchos esfuerzos se han realizado para el aislamiento de poblaciones de MSC tanto de médula ósea como de otros tejidos, por lo cual, se han publicado estudios con respecto al inmunofenotipo de las MSC enfocándose en establecer parámetros para la identificación de las MSC. Algunos de los marcadores reportados para las MSC, *in vitro*, son los siguientes: CD105, CD106, CD146, CD140b, CD29, CD44, CD73, CD90, CD166, CD13, CD10<sup>64-66</sup>. Desde el año 2006, un criterio mínimo de identificación fue establecido: la población debe ser positiva para los marcadores CD90, CD73 y CD105; negativa para los marcadores hematopoyéticos y endoteliales CD45, CD14, CD31; y por último, el mayor requerimiento es que dicha población tenga la capacidad de diferenciarse *in vitro* a adipocitos, condrocitos y osteoblastos<sup>67</sup>.

La primer población de MSC identificada *in vivo* fue la positiva para el anticuerpo monoclonal Stro-1, ya que marca células con morfología fibroblastoide en médula ósea y a elementos no hematopoyéticos en cultivos a largo plazo de médula ósea<sup>68</sup>. Sin embargo, el anticuerpo Stro-1 también identifica a células Glicoforina+, por lo cual no es un marcador específico de MSC.

Catoretta y colaboradores demostraron que utilizando anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento neural (NGFR, por sus siglas en inglés, nerve growth factor receptor) se identificaban células estromales en médula ósea humana. Además describieron que las células estromales NGFR+ eran positivas a los marcadores estromales vimentina y fosfatasa alcalina, mientras que eran negativos a marcadores endoteliales o

hematopoyéticos, con lo cual concluyeron que NGFR era un marcador específico de células estromales<sup>69</sup>. Posteriormente, Quirici y colaboradores, reportaron que la población NGFR<sup>+</sup> estaba enriquecida en precursores con capacidad clonogénica, evaluado mediante su capacidad de formar colonias, las cuales eran capaces de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos *in vitro*, además de ser capaces de soporte hematopoyético<sup>70</sup>. Asimismo, confirmaron que el anticuerpo NGFR no identificaba ningún componente de la fracción hematopoyética de células mononucleares de médula ósea. Cabe destacar que el marcador NGFR también ha sido utilizado para aislar poblaciones de MSC a partir de tejido adiposo y placenta<sup>71,72</sup>. La población NGFR<sup>+</sup> correlaciona fuertemente con la firma de expresión génica de las MSC Lepr<sup>+</sup> de ratón, esto evaluado mediante secuenciación de RNA de una sola célula<sup>63</sup>.

Otro marcador que se describió para identificar MSC *in vivo*, es la molécula de adhesión de células de melanoma (CD146). La población positiva a CD146 fue capaz de recapitular el microambiente de la médula ósea al ser trasplantadas en un ratón inmunodeficiente<sup>30</sup>. Posteriormente, se demostró la capacidad de diferenciación y soporte hematopoyético de la población CD146<sup>+</sup>, al producir factores tales como Flt3, SCF, IL-3, GM-CSF, M-CSF, ANG1 y BMP-2<sup>73</sup>. Asimismo, fue reportada la presencia de subpoblaciones positivas para CD146 y NGFR (NGFR<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> and NGFR<sup>+</sup>CD146<sup>low/-</sup>), las cuales podían recapitular el microambiente de la médula ósea *in vivo*, formaban colonias y podían diferenciarse a los tres linajes. Sin embargo, la diferencia entre estas poblaciones fue en su localización, mientras que la población NGFR<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> se localizaba alrededor de los vasos sanguíneos, la población NGFR<sup>+</sup>CD146<sup>low/-</sup> se localizaba alrededor de vasos y a lo largo de las trabéculas<sup>74</sup>.

En médula ósea humana, solo los marcadores de MSC NGFR y CD146 han sido identificados directamente en biopsias de médula ósea humana<sup>46,74</sup>. Es importante señalar que la población NGFR<sup>+</sup> fue reportada en contacto con >80% de las HSPC CD34<sup>+</sup> en médula ósea humana<sup>75</sup>. Además de estos, la endopeptidasa CD10 también fue utilizada en biopsias de médula ósea, identificando una población de MSC en contacto con progenitores de tipo linfoide<sup>59</sup>.

- **Adipocitos**

Los adipocitos son una población celular terminalmente diferenciada, caracterizada por la presencia de una vesícula de lípidos citoplásmica grande que corresponde a

aproximadamente el 90% de su volumen celular. Los adipocitos son una población heterogénea asociada principalmente al almacenamiento de energía y a su utilización, además de ser productores de una gama amplia de moléculas endócrinas, de las cuales su secreción varía dependiendo del estado nutricional del organismo<sup>76</sup>. Se ha descrito que los adipocitos provienen de la diferenciación de las MSC, específicamente en médula ósea de ratón, se describió que la población de MSC Lepr<sup>+</sup> da origen a los adipocitos en médula ósea de ratón adulto<sup>60</sup>, mientras que en humano se originan a partir de las MSC NGFR<sup>+</sup><sup>63</sup>.

Existen diferentes poblaciones de adipocitos, dependiendo del tejido donde se encuentren y de las funciones que se les atribuyen siendo adipocitos blancos, marrones o beige<sup>77</sup>. Los adipocitos blancos son aquellos que se encuentran localizados en tejido adiposo subcutáneo y en los depósitos de tejido adiposo presentes en la zona visceral. Tiene como función principal ser una reserva de lípidos y producción de factores endocrinos<sup>78</sup>. Los adipocitos marrones son menos abundantes que los blancos, con depósitos distintivos de tejido adiposo marrón localizados dentro de la escapula en ratones y en el cuello y región supraclavicular en humanos<sup>79</sup>. Al contrario de los adipocitos blancos, cuya función es almacenar y proveer lípidos como una fuente de energía para otros tejidos, los adipocitos marrones se encargan de metabolizar activamente ácidos grasos para generar calor<sup>80</sup>. Por último, los adipocitos beige se encuentran en las zonas de tejido adiposo blanco, representando una población de adipocitos con funciones semejantes a las del tejido adiposo marrón<sup>81,82</sup>. Se ha descrito que el hueso contiene un cuarto tipo de tejido adiposo, el tejido adiposo de médula<sup>76</sup>.

Los adipocitos constituyen el componente mayoritario de las células residentes en médula ósea, representando en adultos entre el 50-70% de su volumen<sup>83</sup>. Después del primer año de vida en el humano, la médula ósea denominada roja, la cual está constituida principalmente por células hematopoyéticas y osteogénicas, comienza a ser reemplazada por la médula ósea amarilla, constituida por adipocitos<sup>84,85</sup>. Fue en 1976 cuando se identificaron dos diferentes poblaciones de adipocitos en médula ósea, uno presente en la médula "roja" y el otro como componente de la médula "amarilla"<sup>86</sup>. Posteriormente, Scheller y colaboradores caracterizaron diferencias entre estas poblaciones de adipocitos y las nombraron de acuerdo a su capacidad de adaptarse en respuesta a estímulos fisiológicos<sup>87</sup>. De acuerdo a sus resultados, el tejido adiposo amarillo más estable, menos reactivo y que aparece temprano en el desarrollo en ratones y humanos, el cual se localiza en las zonas distales del esqueleto apendicular, es denominado tejido adiposo constitutivo de médula.

Por otra parte, los adipocitos que se encuentran en la médula hematopoyética, localizados en el esqueleto axial y proximal de los huesos apendiculares es considerado tejido adiposo regulador de médula<sup>87</sup>. El tejido adiposo regulador fue considerado durante mucho tiempo como un relleno de espacio en sustitución por tejido hematopoyético, básicamente en respuesta a una disminución en la demanda de eritrocitos<sup>88</sup>. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que los adipocitos residentes en médula ósea realizan funciones importantes en la regulación del microambiente, tales como promover la regeneración hematopoyética después de la irradiación, producir factores de soporte hematopoyético tales como SCF y favorecer la diferenciación mieloide y eritroide<sup>89,90</sup>.

Las primeras evidencias acerca de la participación de los adipocitos en la regulación de la hematopoyesis fueron presentadas por Yamasaki y colaboradores hace 30 años, en las cuales reportaban que el número de adipocitos en médula ósea incrementaba después de una dosis de radiación subletal. Lo cual generaba un aumento en la proliferación de HSC, proponiendo un posible papel de los adipocitos en la reconstitución de la médula ósea después de la irradiación<sup>91</sup>. En contraste, Naveiras y colaboradores reportaron que los adipocitos correlacionaban de forma negativa con la población de HSC<sup>92</sup>, al demostrarse que las HSC y los progenitores de corto plazo estaban reducidos en zonas ricas en adipocitos, tales como las vértebras de la cola del ratón, con respecto a zonas donde los adipocitos estaban ausentes, tales como las vértebras del torax<sup>92</sup>. Asimismo, se reportó que utilizando un modelo de ratón lipoatrófico A-ZIP/F1, cuya principal característica es que son incapaces de formar adipocitos y utilizando ratones wildtype tratados con un inhibidor de la adipogénesis (BADGE, por sus siglas en inglés, Bisphenol A diglycidyl ether), la reconstitución de la médula ósea después de la irradiación de dichos ratones era acelerada con respecto a ratones wildtype y que no recibieron tratamiento<sup>93</sup>. Sin embargo, estudios recientes han aportado evidencia que confirma la observación del papel importante que desempeñan los adipocitos en el mantenimiento de las HSC. Zhou y colaboradores, demostraron que los adipocitos sintetizan SCF y promueven junto con las MSC Lepr+ la recuperación del tejido hematopoyético después de la irradiación<sup>89</sup>. Utilizando un ratón transgénico al cual se le eliminó condicionalmente la expresión de SCF de los adipocitos, encontraron que la regeneración hematopoyética se inhibió después de la irradiación o tratamiento con 5-fluouracilo, siendo eliminada la población de HSC, disminuyendo el tiempo de vida de los ratones<sup>89</sup>. Esta observación sugirió que la adipogénesis en médula ósea representa una respuesta rápida y eficiente para promover la regeneración hematopoyética de emergencia después de la irradiación.

En humanos, el grupo del Dr. Bhatia demostró que los adipocitos en médula ósea representan el nicho para la maduración del linaje mieloide y eritroide<sup>90</sup>. Su principal enfoque fue la observación de que en biopsias de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés, Acute Myeloid Leukemia), los adipocitos se encuentran escasos o ausentes, mientras que en biopsias de pacientes sanos, estos representan más del 50% de la médula ósea. Utilizando muestras de pacientes con AML y realizando estudios *in vitro* e *in vivo*, demostraron que las células de AML eliminan el nicho adipocítico en médula ósea. En consecuencia, se produce una regulación desbalanceada de las HSC y progenitoras, resultando en disfunciones en la maduración mieloide y eritroide. Además, utilizando el sistema de cocultivos de adipocitos y HSC derivadas de pacientes sanos, encontraron que la diferenciación mieloide y eritroide estaba favorecida e incluso incrementada, con respecto a cocultivos de HSC y MSC<sup>90</sup>. Anteriormente, realizando cocultivos de adipocitos con HSPC CD34<sup>+</sup>, fue demostrado que los adipocitos tenían la misma capacidad de soporte hematopoyético que las MSC<sup>94</sup>. Asimismo, fue demostrado que los adipocitos fueron capaces de mantener y sostener la sobrevivencia de las HSC en cocultivos a largo plazo, de 5 semanas<sup>95</sup>. En dichos cocultivos, los adipocitos producían más IL-3, sobreexpresaban angiopoyetina 2 y el factor de crecimiento asociado a la insulina 1, comparados con las MSC. Confirmando la importancia de los adipocitos en el mantenimiento de las HSC y en la diferenciación mieloide de éstas.

## Envejecimiento del Sistema Hematopoyético

El envejecimiento es un proceso fisiológico normal dependiente del tiempo, el cual está caracterizado por pérdida en la integridad fisiológica, lo cual conlleva a una función deteriorada y un aumento en la vulnerabilidad hacia la muerte<sup>96</sup>. A pesar de ser un proceso paulatino, el declive funcional se ve acelerado a partir de los 65 años<sup>97,98</sup>. Esta pérdida de funcionalidad es el principal factor de riesgo para importantes patologías humanas, tales como el cáncer, diabetes, desórdenes cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas<sup>96</sup>. Asimismo, las enfermedades infecciosas se presentan con frecuencia en la población de adultos mayores. Esto se debe a una amplia variedad de cambios en el sistema inmune, algunos mediados por inflamación crónica o por la presencia de un estado proinflamatorio crónico. Por ejemplo, las infecciones por influenza son más comunes y severas en la población de adultos mayores y la vacuna es menos efectiva<sup>98</sup>. Esto como consecuencia de cambios en el sistema inmune, el cual desarrolla respuestas ineficientes hacia los patógenos y vacunas<sup>99</sup>. Pero no solo las infecciones son comunes en

los adultos mayores, también la aparición de leucemias de tipo mieloide, siendo la media de aparición de la leucemia mieloide aguda los 67 años de edad<sup>100</sup> y de la leucemia mieloide crónica los 65 años<sup>101</sup>. El aumento en las infecciones y en la incidencia de cáncer hematopoyético en adultos mayores, puede deberse principalmente a los efectos del envejecimiento en las poblaciones de HSC hasta las células maduras. Existen evidencias acerca de diferencias funcionales importantes entre HSC provenientes de organismos jóvenes y de organismos envejecidos, tales como diferencias en frecuencia, en potencial de regeneración, de diferenciación, de autorenovación, de movilización y mantenimiento en médula ósea.

- **Frecuencia de las HSC**

La utilización de marcadores para identificar a las HSC ha permitido estudiar su frecuencia y evaluar cambios que puedan ser asociados a diversas condiciones fisiológicas, entre ellas el envejecimiento. Contrario a lo esperado, la frecuencia de las HSC se ha reportado que aumenta asociado al envejecimiento. En ratones, utilizando un modelo de cocultivo de células estromales con células hematopoyéticas, conocido como “empedrado”, debido al patrón morfológico de las células estromales *in vitro*, se ha demostrado que el número de células formadoras de colonia aumenta. En este estudio, se utilizaron células derivadas de ratones jóvenes y viejos de 5 diferentes cepas de ratón, las cuales tienen una sobrevivencia de 500 a 800 días. De forma interesante, encontraron que en todas las cepas, el compartimento más primitivo de HSC se encontraba incrementado en tres o cuatro veces en ratones viejos comparado con ratones jóvenes<sup>102</sup>. Además, encontraron una correlación entre el número absoluto de HSC y el tiempo de sobrevivencia de los ratones, entre mayor es del número de HSC mayor el tiempo de sobrevivencia. Posteriormente, Rossi y colaboradores, reportaron que la frecuencia de HSC, utilizando la población Sca<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> Linaje<sup>-</sup>, aumentaba en ratones de 23 meses comparados con ratones de 2-12 meses<sup>103</sup>. Estudios posteriores, reportan también un aumento en el compartimento de HSC, específicamente en las HSC de largo plazo<sup>104,105</sup>.

En humanos también se ha reportado un aumento en la población de HSC asociado al envejecimiento. Estudios diversos utilizando células mononucleares (CMN) derivadas de médula ósea de donadores jóvenes (18-35 años) y adultos mayores a 60 años en cirugía de reemplazo de cadera, cuantificaron la frecuencia de la población CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Linaje<sup>-</sup>, reportando que ésta aumenta en adultos mayores<sup>106-108</sup>. Estudios en los cuales se delimitó la población de HSC, utilizando una mayor cantidad de marcadores, tales como

CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD123<sup>low/-</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>Linaje<sup>-</sup>, reportan de igual manera un aumento en esta población en adultos mayores en comparación con adultos jóvenes<sup>109,110</sup>.

- **Potencial de regeneración**

Debido al aumento en la frecuencia de las HSC asociado al envejecimiento, se esperaría que las funciones del sistema hematopoyético se mantuvieran eficientes durante toda la vida del organismo. Sin embargo, se ha demostrado en modelos murinos, que bajo condiciones de estrés y regeneración, tales como en ensayos de trasplantes seriales, las HSC provenientes de organismos envejecidos, muestran defectos funcionales, incluidos una disminución en su potencial de regeneración. Al evaluar la reconstitución, en ratones previamente irradiados, de las HSC provenientes tanto de ratones jóvenes como viejos, reportaron que a las 4 semanas, la reconstitución de HSC provenientes de ratones viejos eran 1.7 veces menos, sin embargo, a las 20 semanas la reconstitución era 28 veces menor<sup>103</sup>. Los efectos del envejecimiento en la capacidad de regeneración de las HSC humanas, se ha estudiado trasplantándolas en ratones y evaluando el porcentaje de quimerismo de células humanas con respecto a las células de ratón. Se ha reportado que el grado de quimerismo de las células humanas derivadas de HSC provenientes de adultos mayores, era dos veces menor con respecto a las derivadas de jóvenes<sup>109</sup>.

- **Potencial de diferenciación**

Una de las características que definen a las HSC es su capacidad de diferenciación, fundamental para el mantenimiento del sistema hematopoyético, ya que debido a este proceso se producen todos los diferentes linajes hematopoyéticos. La primera decisión de diferenciación que ha sido estudiada de las HSC es hacia linaje mieloide y linfoide. En ratones envejecidos, las HSC presentan predisposición a diferenciarse en linaje mieloide con respecto al linfoide<sup>111</sup>. Cuando se trasplantan HSC provenientes de ratones viejos en ratones inmunosuprimidos, hay disminución significativa en el linaje linfoide, mientras que el linaje mieloide aumenta considerablemente<sup>104,105,111</sup>. Recientemente, después de publicarse un nuevo esquema de diferenciación en donde el linaje megacariocítico se deriva directamente de las HSC en lugar de un progenitor mieloide como anteriormente se creía<sup>3</sup>, estudios han reportado que el linaje megacariocítico-eritroide se encuentra incrementado en organismos envejecidos, tanto en ratón como en humano<sup>110,112</sup>.

En humanos, las evidencias no han sido tan concluyentes. Al igual que en ratón, se han publicado estudios en los que la población linfoide disminuye en adultos mayores, comparado con jóvenes<sup>106,109,110</sup>, mientras que la determinación del aumento en el linaje

mieloide permanece poco esclarecido. Al evaluar las poblaciones de progenitores mieloides en médula ósea, se ha encontrado que no hay cambios en la frecuencia de estas en médula ósea de jóvenes y de adultos mayores<sup>106,109</sup>, incluso un estudio reporta una disminución en la frecuencia de progenitores granulocíticos-monocíticos (GMP)<sup>110</sup>.

- **Potencial de autorenovación**

La segunda característica fundamental de las HSC, es su capacidad de autorenovación. Dicha capacidad se refiere al potencial que tienen las HSC para dividirse y generar dos células con las mismas capacidades que ella. La autorenovación es la función responsable de que se mantenga la población de HSC durante toda la vida del organismo. Por lo tanto, la capacidad de autorenovación está fuertemente ligada al potencial funcional de las HSC, medido por su capacidad de reconstitución. Como se mencionó anteriormente, esta capacidad funcional disminuye conforme las HSC envejecen, y se ha descrito que esto es debido a una disminución en su capacidad de autorenovación a largo plazo<sup>113</sup>. La capacidad de autorenovación es estudiada con trasplantes seriales, utilizando éstos varios estudios han demostrado que la capacidad de las HSC de reconstitución se va perdiendo en los trasplantes seriales, siendo esta pérdida más rápida en HSC derivadas de ratones viejos<sup>114</sup>.

- **Movilización y mantenimiento en médula ósea**

Las HSC se encuentran en la médula ósea en lugares específicos donde sus funciones son estrictamente reguladas, llamados nichos. Las HSC de organismos jóvenes se localizan en zonas diferentes con respecto a las HSC de organismos envejecidos. Las HSC de organismos jóvenes se localizan más cercanas a la zona endosteal, mientras que las de organismos viejos se localizan más alejadas<sup>115</sup>. En un estudio en el cual se evaluó la capacidad de las HSC de mantenerse adheridas a un cultivo de células estromales, se encontró que las HSC derivadas de ratones viejos tenían una reducción de dos veces en su eficiencia de adhesión al cultivo, en comparación con las HSC derivadas de ratones jóvenes<sup>114</sup>. De forma interesante, el envejecimiento también afecta la movilización de las HSC a circulación, ya sea por estrés causado por quimioterapia o por la administración de citocinas, incrementándose en las HSC de organismos viejos con respecto a las de organismos jóvenes<sup>116</sup>.

Los efectos asociados al envejecimiento en la función de las HSC han sido atribuidos tanto a factores intrínsecos como a factores extrínsecos, como su microambiente.

## Factores intrínsecos

Las evidencias acerca de la disminución en la eficiencia de repoblación de las HSC provenientes de organismos viejos, comparadas con las derivadas de organismos jóvenes después de ser trasplantadas en ratones jóvenes, sugiere que el envejecimiento en las HSC se manifiesta como una consecuencia fuertemente asociada a cambios celulares y moleculares intrínsecos<sup>113</sup>. Se han realizado estudios de perfiles de transcriptoma, en los cuales se han encontrado patrones de expresión génica que correlacionan con los efectos funcionales del envejecimiento en las HSC, tales como disminución en la expresión de genes de especificación hacia linaje linfóide y por el contrario, sobreexpresión en genes de especificación hacia linaje mielóide y genes involucrados en la transformación leucémica<sup>103</sup>. Posteriormente, se reportó que en las HSC provenientes de ratones de 21 meses de edad, genes involucrados en la respuesta al estrés, la inflamación y la agregación proteica se encontraban sobreexpresados, mientras que aquellos genes involucrados en la preservación de la integridad del genoma y la remodelación de la cromatina presentan disminución en su expresión<sup>117</sup>. Los cambios funcionales intrínsecos asociados al envejecimiento de las HSC, provienen de diferentes causas, tales como daño al ADN, cambios en la polaridad celular, disfunción en los procesos de autofagia y de la actividad mitocondrial y reprogramación epigenética.

- **Daño al ADN**

Un denominador común del envejecimiento es la acumulación de daños en el material genético durante toda la vida del organismo<sup>118</sup>. El ácido desoxirribonucleico (ADN) está expuesto constantemente a posibles mutágenos, los cuales pueden ser exógenos, tales como la radiación y agentes químicos; o endógenos como los radicales libres y los productos de desecho de la producción de energía de la cadena de transporte de electrones<sup>119</sup>. La célula tiene mecanismos eficientes encargados de reparar el daño al ADN<sup>120</sup>, sin embargo, la maquinaria de reparación no es perfecta, por lo cual algunos daños pueden escapar a dicha reparación, y de esta forma, las mutaciones y el daño pueden acumularse al paso del tiempo<sup>118</sup>. De esta forma, entre más longeva sea la célula, la probabilidad de la acumulación de inestabilidad genómica es mayor, la cual puede incluir desde mutaciones puntuales a grandes rompimientos cromosomales y translocaciones; con implicaciones que van desde una mutación silenciosa que codifica para el mismo aminoácido, hasta la activación de oncogenes o silenciamiento de genes supresores de tumores<sup>119</sup>.

En el sistema hematopoyético, Rossi y colaboradores estudiaron la población de HSC y su función en ratones deficientes en mecanismos de reparación del genoma, tales como reparación de excisión de nucleótidos, mantenimiento de telómeros y de recombinación no homologa, encontrando que deficiencias en estas vías de señalización no eliminaban por completo las reservas de HSC con la edad. Sin embargo, encontraron que los procesos funcionales de las HSC se encontraban afectados severamente, tales como su capacidad de repoblación, proliferación, de autorenovación, lo cual ocasionaba incrementos en apoptosis y al final agotamiento celular<sup>121</sup>.

En humanos, Rube y colaboradores estudiaron rompimientos no reparados en el ADN de células CD34+ y CD34-, provenientes de individuos sanos de diferentes edades, encontrando que el número de rompimientos de ADN no reparados, medidos por la cantidad de foci  $\gamma$ H2AX por célula, era mayor en las células CD34+ derivadas de adultos mayores a 70 años<sup>122</sup>. Sin embargo, existe evidencia con respecto a que las vías de señalización que se encienden en respuesta al daño al ADN son las que están involucradas en los efectos asociados al envejecimiento en las HSC<sup>123</sup>.

- **Cambios en la polaridad celular**

Disminución en la polaridad celular es una característica importante de las HSC provenientes de organismos envejecidos<sup>104,105</sup>. De forma interesante, en un estudio de asociación de genoma se reportó que un aumento en la expresión de la proteína de control de división celular 42 (Cdc42) en células mononucleares hematopoyéticas estaba asociado fuertemente al envejecimiento y a la morbilidad en humanos<sup>124</sup>. La proteína Cdc42 está involucrada en la regulación de la distribución de las proteínas y los organelos durante la división celular, al activar a las cinasas activadas de p21, las cuales reorganizan los filamentos de actina<sup>125</sup>. Estudios en ratón han demostrado que las HSC derivadas de ratones viejos tienen una elevada actividad de la proteína Cdc42, lo cual está asociado a una pérdida de la polaridad celular, lo cual involucra una distribución azarosa de tubulina, de Cdc42 y de otros marcadores de polaridad celular, además de una distribución nuclear al azar de la histona acetilada H4K16<sup>104,105</sup>. Incluso, al inhibir farmacológicamente la actividad de Cdc42, se rejuvenece a las HSC, aumentándose el porcentaje de células polarizadas en la población de HSC provenientes de ratones viejos y se restaura la distribución espacial de la histona H4 a niveles similares a las de HSC derivadas de ratones jóvenes<sup>104</sup>. Posteriormente, se reportó que el aumento en la activación de Cdc42 era debido

a un cambio en la señalización de la vía WNT, en el cual la activación de la vía no canónica fue asociada al aumento en la activación de Cdc42 y la disminución en la polaridad celular<sup>105</sup>.

- **Disfunción en los procesos de autofagia y de la actividad mitocondrial**

El proceso de autofagia es asociado generalmente al reciclado de organelos, lo cual está asociado con longevidad y salud, por lo cual es crítico para proteger a las HSC de estrés metabólico. Ho y colaboradores reportaron que la pérdida de la autofagia en las HSC derivadas de ratones viejos, es la causante de la acumulación de mitocondrias y de un continuo estado metabólico activo, lo que en consecuencia acelera la diferenciación hacia linaje mielóide a través de desregulaciones epigenéticas y afecta la autorenovación y el potencial regenerativo de las HSC<sup>126</sup>. Además, reduciendo el estrés mitocondrial se pueden revertir los efectos del envejecimiento en las HSC. Mohrin y colaboradores estudiaron la respuesta a estrés de la mitocondria en HSC derivadas de ratones jóvenes y viejos, encontrando que la disminución de la expresión de la proteína SIRT7, la cual forma parte de la vía de señalización de respuesta de la mitocondria a proteínas no plegadas, reducía la quiescencia, incrementaba el estrés mitocondrial y disminuía la capacidad de regeneración de las HSC de ratones viejos. Al aumentar la expresión de esta proteína en las HSC derivadas de ratones viejos, la capacidad de regeneración de estas mejoraba considerablemente<sup>127</sup>.

- **Reprogramación epigenética**

Una de las características principales de las HSC es su capacidad de autorenovación. Este proceso implica que una HSC sea capaz de producir, a través de la división celular, una célula que mantenga las mismas características que la troncal. Para que esta división se lleve a cabo, además de duplicar su material genético y distribuirlo en las células producidas, también deben copiarse y distribuirse todas las marcas epigenéticas que cubren cada uno de los locus genómicos<sup>128</sup>. Estudios recientes han sugerido que perfiles epigenéticos alterados están asociados con el envejecimiento en las HSC y que se encargan de modular el potencial funcional de las HSC en las diferentes etapas durante la ontogenia<sup>129</sup>. Cambios en la metilación del DNA en células hematopoyéticas primitivas han sido reportados asociados al envejecimiento. Para evaluar la relación entre la disfunción de las HSC asociada a la edad y el epigenoma, Beerman y colaboradores realizaron una evaluación global de la metilación del DNA en HSCs derivadas de diferentes etapas del desarrollo murino, encontrando que aunque la metilación del DNA se mantiene estable durante el envejecimiento, existen alteraciones en la metilación del DNA en sitios

específicos de regiones genómicas asociadas con el potencial de diferenciación a los diferentes linajes, los cuales afectan directamente a genes expresados en células progenitoras y maduras<sup>130</sup>. En humanos, se reportó que la población Linaje<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> presentaban reprogramación epigenética asociada a la edad, principalmente cambios y redistribución en la metilación del ADN, dicha reprogramación tiene como blancos vías de señalización esenciales para el desarrollo, y de forma interesante, también para cáncer, ya que estas alteraciones son comparables a las que se presentan en leucemia mieloide aguda (AML), la cual tiene como consecuencia desregulación de motivos epigenéticos y de factores de transcripción hematopoyéticos esenciales, tales como KLF6, BCL6 y RUNX3<sup>107</sup>.

Aunado a los cambios en la metilación del ADN asociados al envejecimiento, también se han asociado cambios en la remodelación de la cromatina. Las histonas son las proteínas que se encargan de proporcionar un núcleo que es envuelto por ADN, y de esta forma pueda ser compactado en estructuras más grandes, que además impiden el acceso a secuencias del ADN. Análisis de expresión han demostrado que genes que codifican para proteínas encargadas en la remodelación de la cromatina son regulados por el envejecimiento en las HSC<sup>103,117,130,131</sup>.

### **Factores extrínsecos**

Debido a que las HSC no son células aisladas y por lo tanto, interactúan en un ambiente con diversos tipos celulares y factores solubles que pueden ser producidos localmente en médula ósea o provenir de otros tejidos, no puede descartarse el efecto de estos en la desregulación y pérdida de funcionalidad descrita en las HSC con el envejecimiento. La principal estrategia para evaluar la contribución del microambiente en el fenotipo envejecido de las HSC es trasplantar HSCs derivadas de organismos jóvenes y viejos en ratones jóvenes y viejos, teniendo como principal variable el microambiente.

- **Factores tróficos**

Un estudio realizado por Ergen y colaboradores encontró que cuando las HSCs derivadas de ratones viejos eran trasplantadas en un microambiente joven, las capacidades funcionales de dichas HSC eran comparables con las de las HSC derivadas de ratones jóvenes. De igual manera, las HSCs de ratones jóvenes al ser trasplantadas a un microambiente envejecido, desplegaban características propias de las HSCs de ratones viejos, demostrando el efecto tan importante que tiene el microambiente en regular la capacidad funcional de las HSC<sup>132</sup>. En dicho estudio, encontraron que la expresión de la proteína RANTES o CCL5 participaba activamente en promover la diferenciación a linaje

mieloide, una característica del fenotipo envejecido de las HSC, y que esta se encontraba incrementada en el microambiente del ratón viejo.

CXCL12 es conocida como una de las proteínas esenciales para la regulación y el mantenimiento en médula ósea de las HSC, en un estudio se reportó que esta se encontraba aumentada en médula ósea de adultos mayores y que esto correlacionaba con un aumento en la frecuencia de HSCs<sup>133</sup>. Otros factores producidos localmente en médula ósea que han sido asociados al envejecimiento en las HSC, son los factores WNT de la vía no canónica, principalmente WNT5A. Se demostró que WNT5A promovía la disminución en la polarización de las HSCs de ratones viejos, al activar a la proteína Cdc42, de forma interesante encontraron que WNT5A se encontraba sobreexpresado en células estromales derivadas de ratones viejos, sugiriendo que estas podrían ser la fuente de producción de WNT5A. Sin embargo, las HSC también pueden producir su propio WNT5A, por lo que la fuente de WNT5A podrían ser ambas poblaciones celulares.

## Antecedentes

### Cambios en el microambiente hematopoyético asociados al envejecimiento

El microambiente hematopoyético juega un papel fundamental en la regulación del fenotipo disfuncional de las HSC asociado al envejecimiento<sup>132,134</sup>. En el modelo de ratón, se ha demostrado que al trasplantar CMN provenientes de ratones jóvenes (2 meses) a un microambiente envejecido (ratones viejos, 17-18 meses, previamente irradiados), la reconstitución hematopoyética resultante corresponde a la observada de CMN derivadas de ratones viejos, siendo menos eficiente y con un mayor porcentaje de células mieloides<sup>132</sup>. Mientras que al trasplantarse CMN derivadas de ratones viejos en un microambiente joven (ratones jóvenes), la reconstitución es mayor, con un menor porcentaje de células mieloides y aumento en diferenciación hacia linaje linfoide<sup>132</sup>. Asimismo, un microambiente envejecido ejerce una presión de selección en clones de progenitores hematopoyéticos (HPCs, por sus siglas en inglés, Hematopoietic Progenitor Cells) que facilita la transición hacia la monoclonalidad, la cual puede ser una de las causas de la alta incidencia de leucemia asociada al envejecimiento<sup>134</sup>. Utilizando un modelo de mutagénesis por inserción de agentes retrovirales para generar HPCs con un potencial intrínseco para la expansión clonal, se determinó que aquellas HPCs modificadas que se trasplantaron a un microambiente joven presentaban oligoclonalidad, mientras que aquellas que fueron

trasplantadas en un microambiente viejo presentaban menor clonalidad, o diversidad de clones<sup>134</sup>.

En ratones, durante el envejecimiento se producen cambios en la arquitectura de la médula ósea, tales como remodelación vascular<sup>135,136</sup>, disminución en el área trabecular e incremento en el área de adipocitos<sup>137</sup>. Asimismo en humanos, el envejecimiento disminuye la formación y la masa del hueso, además de un aumento en la adipogénesis, debido a la disminución en osteoblastos y aumento en adipocitos<sup>138</sup>. A continuación se describen las evidencias asociadas al envejecimiento en las diferentes poblaciones celulares que conforman el microambiente hematopoyético.

#### ▪ MSC

Las MSC son una población estromal esencial para el mantenimiento y la regulación del proceso de hematopoyesis. Las MSC se encuentran en contacto con las HSC, tanto en ratones<sup>10,57,135</sup> como en humanos<sup>46,47</sup>, además de ser las principales productoras de factores esenciales para el mantenimiento y regulación de las HSC, tales como CXCL12 y SCF<sup>38,39,46,60,89</sup>. Además, las MSC son las precursoras de los osteoblastos y adipocitos residentes en médula ósea, por lo cual, los efectos del envejecimiento en esta población son cruciales para el microambiente de la médula ósea. Los estudios en MSC se han enfocado principalmente a demostrar si existen cambios en su frecuencia y en sus capacidades funcionales: tanto de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos, de capacidad clonogénica, de proliferación y de soporte hematopoyético.

En cuanto a la frecuencia de las MSC, las evidencias reportadas han sido contradictorias. Recientemente, en un estudio en el cual se evaluó la frecuencia de la población de MSC, tanto LepR+ como Nestin<sup>low</sup>, en ratones jóvenes (8-16 semanas) y ratones viejos (20 meses), se encontró que dichas poblaciones no presentaban cambios<sup>135</sup>. Previamente, Ambrosi y colaboradores, utilizando la población de MSC Sca1+CD24+CD45-CD31- y evaluando su frecuencia en ratones de 2 meses (jóvenes) y de 25 meses (ratones viejos), reportaron de igual manera que dicha población se mantenía estable en ambos grupos de edad<sup>139</sup>. Sin embargo, el grupo del Dr. Frenette, reportó un incremento en la población de MSC, con los marcadores CD51+PDGFR $\alpha$ +CD45-Ter119-CD31-, en ratones viejos (20-24 meses)<sup>136</sup>. Cabe destacar que la causa de los reportes contradictorios en ratones sea el uso diferencial de marcadores para la detección y evaluación de las MSC. Asimismo, en humanos se han utilizado diferentes marcadores para evaluar los efectos del envejecimiento en la frecuencia de MSC. La población de MSC Stro-1+ se ha reportado

que presenta una tendencia a disminuir, sin alcanzar significancia estadística, en la población de adultos mayores a 65 años<sup>140,141</sup>. De forma interesante, en un estudio en el cual utilizaron los marcadores NGFR y CD146 y evaluaron su frecuencia en muestras pediátricas hasta adultos mayores, encontraron que aunque la frecuencia de la población de MSC no presentaba cambios asociados a la edad, al evaluar las subpoblaciones derivadas de la combinación de ambos marcadores (NGFR+CD146+, NGFR+CD146-), encontraron que la población doble positiva era más frecuente en las muestras pediátricas, mientras que la población positiva para NGFR pero negativa para CD146 era más frecuente en adultos y adultos mayores, indicando una distribución asociada a la edad en esta subpoblaciones, siendo la pérdida de la expresión de CD146 asociada a la edad<sup>142</sup>. En ambos modelos de estudio, tanto murino como humano, el principal obstáculo para la evaluación de las MSC, es el consenso de cuales marcadores utilizar al momento de identificarlas y evaluarlas.

Al encontrar diferencias en las evidencias reportadas con respecto al efecto del envejecimiento en la frecuencia de las MSC en médula ósea, los estudios se han enfocado en evaluar la capacidad funcional de estas. Una de las principales capacidades funcionales de las MSC, es su capacidad de formar colonias de fibroblastos (CFU-F), la cual evalúa su capacidad clonogénica, y ésta ha sido uno de los principales instrumentos para determinar si hay cambios funcionales en las MSC asociados a la edad. En ratón, se ha demostrado que las MSC derivadas de ratones viejos tienen menor capacidad de formar colonias, en comparación con las derivadas de ratones jóvenes<sup>136</sup>. En humanos, también existe evidencia de que la capacidad de formar colonias de las MSC disminuye con el envejecimiento. Utilizando un cultivo de CMN, Brusnahan y colaboradores, reportaron que el número de CFU-F derivadas de CMN de adultos mayores a 65 años era menor con respecto a las derivadas de adultos menores a 65 años<sup>140</sup>. Además en un estudio en el cual se compararon las frecuencias de CFU de CMN derivadas de pacientes entre 10 y 40 años, se encontró que a partir de los 21 años, esta frecuencia disminuye<sup>143</sup>, lo cual significa que a partir de los 20 años podría comenzar a disminuir la funcionalidad de las MSC. En un estudio posterior, se reportó que la frecuencia de CFU-F de CMN disminuía a partir de los 45 años. Cabe señalar que las diferencias encontradas entre estos dos estudios, se deben principalmente al método de obtención de médula ósea, siendo el primero por aspirado y el segundo estudio, a partir de cirugías de cadera, lo cual puede influir en la obtención de las MSC.

Otra capacidad fundamental de las MSC es su capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Uno de los principales cambios en el microambiente de la médula ósea es el aumento en el número de adipocitos y la disminución en tejido óseo<sup>137-139</sup>. En ratones, los programas de diferenciación de las MSC hacia linaje osteogénico disminuyen con el envejecimiento, mientras que los de diferenciación hacia linaje adipogénico aumentan<sup>84,137,139,144</sup>. En un estudio en el cual aislaron MSC de ratones jóvenes y viejos que expresaban constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) y las trasplantaron en ratones jóvenes, las MSC derivadas de ratones jóvenes injertaban exitosamente y su progenie se localizaba delimitando toda la región de las trabéculas. Por el contrario, cuando se trasplantaban MSC en ratones viejos, independientemente de la edad de los ratones de las que provenían, la diferenciación hacia adipocitos se favorecía con respecto a los osteoblastos, indicando que factores en el microambiente del ratón viejo promovían la diferenciación hacia adipocitos<sup>137</sup>. Al realizar un análisis de los programas genéticos de MSC derivadas de ratones jóvenes (8 meses) y de ratones viejos (26 meses), Moerman y colaboradores reportaron que la expresión de factores de transcripción específicos de diferenciación osteogénica, tales como Runx2 y Dlx5, y marcadores de osteoblastos como colágena y osteocalcina se encontraban disminuidos en ratones viejos, mientras que los factores de transcripción específicos del programa adipogénico, tales como PPAR $\gamma$  se encontraba incrementado así como la proteína de unión a ácidos grasos aP2<sup>84</sup>. En humanos, los resultados no han sido tan contundentes como los reportados en ratón. Al analizar la capacidad de diferenciación *in vitro* de MSC derivadas de jóvenes y de adultos mayores, no se han encontrado diferencias, siendo las MSC capaces de diferenciarse *in vitro* a los tres linajes<sup>142,145</sup>. Al medir la producción de fosfatasa alcalina para medir diferenciación hacia osteoblastos, Stolzing y colaboradores reportaron que MSC derivadas de adultos mayores a 40 años producían menos fosfatasa alcalina comparados con MSC derivadas de donadores más jóvenes, mientras que la diferenciación hacia adipocitos y condrocitos no presentaba diferencias<sup>143</sup>.

En cuanto a su capacidad de proliferación, las MSC derivadas de adultos mayores a 70 años presentan menor capacidad de proliferación, esto medido por número de doblajes poblacionales, alcanzando apenas en promedio 10 doblajes poblacionales en 300 días, comparadas con 30 doblajes de MSC derivadas de adultos jóvenes (18-29 años)<sup>143,145</sup>.

En cuanto a la producción de factores por parte de las MSC que impactan directamente en la regulación y mantenimiento de las HSC, pocos han sido los estudios

que se han enfocado en determinar el efecto del envejecimiento en estos. La producción de IL-6 por parte de las MSC se ha reportado que aumenta asociado al envejecimiento. En 2010, un estudio determinó que la producción de IL-6 en cultivos de MSC derivadas de adultos mayores aumentaba con respecto a los cultivos de MSC derivadas de donadores más jóvenes<sup>140</sup>. Posteriormente, se reportó que el aumento de la producción de IL-6 por parte de las MSC, tenía como consecuencia un decremento en el número de HSPCs CD34+, esto medido en sistemas de cocultivos de MSC derivadas de jóvenes y adultos mayores<sup>146</sup>. Aunado a esto, las MSC derivadas de adultos mayores, presentaban mayor producción de ROS, de óxido nítrico y una disminución en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), marcadores importantes de inflamación, al igual que IL-6<sup>143</sup>. Las MSC en humano han sido principalmente estudiadas por sus capacidades de regeneración y los estudios enfocados a determinar los efectos el envejecimiento en estas, se enfocan en determinar qué tan funcionales serían para terapias regenerativas, por lo cual su estudio con respecto a su papel hematopoyético ha quedado relegado a segundo término.

- **Adipocitos**

Uno de los efectos contundentes del envejecimiento en médula ósea, es el aumento en el número de adipocitos. Los programas de diferenciación hacia linaje adipocítico en las MSC se ven favorecidos con el envejecimiento. Uno de los primeros estudios que reportó el aumento en los adipocitos asociado al envejecimiento en humanos fue el realizado por Moore y Dawson, en el cual describieron que con la edad, la médula ósea “roja” era reemplazada paulatinamente por la médula ósea “amarilla”<sup>85</sup>. Posteriormente, utilizando la tecnología de resonancia magnética, dos estudios aportaron evidencia concluyente acerca del incremento en el área de adipocitos asociado a la edad<sup>138,147</sup>. Al medir el área de los adipocitos en biopsias de médula ósea de personas desde 30 hasta 100 años, Justesen y colaboradores reportaron que el porcentaje de adipocitos incrementaba desde un promedio de 40% en jóvenes hasta un 68% en adultos mayores<sup>138</sup>. Aunado a esto, se reportó posteriormente, que en médula ósea de mujeres mayores a 65 años, el porcentaje de adipocitos aumentaba considerablemente, comparado con mujeres menores a 55 años<sup>147</sup>. Al estudiar, el tipo específico de adipocitos que se encontraban incrementado en médula ósea, Miggitsch y colaboradores reportaron que era el tejido adiposo de médula ósea (BMAT), justo el tejido que cumple con funciones de regulación de la hematopoyesis, reportando además el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ <sup>148</sup>.

De igual manera, en ratones, el número de adipocitos aumenta en ratones envejecidos (24 meses de edad)<sup>139</sup>, siendo mucho más bajas las frecuencias con respecto a humanos. Los adipocitos en médula ósea de ratón se encuentran poco representados, los estudios acerca del microambiente hematopoyético realizados en ratón no contemplan a los adipocitos como un componente de este, ya que su frecuencia es muy baja o nula en el tipo de hueso más utilizado para su estudio, el fémur<sup>149</sup>. Estudios que han reportado un papel importante de los adipocitos en la regulación de la hematopoyesis han utilizado diferentes zonas del hueso tales como la vertebral o la pelvis, zonas en las que el número de adipocitos es mayor con respecto al fémur<sup>89</sup>.

- **ECs y células hematopoyéticas maduras**

Uno de los principales componentes del microambiente hematopoyético son las ECs, las cuales forman parte de la vasculatura, tanto de sinusoides, arterias y capilares. Las HSC han sido identificadas en nichos perivascuales, principalmente cerca de sinusoides, tanto en humano<sup>47,150</sup> como en ratones<sup>10,151</sup>. Estudios en ratón, han reportado que el envejecimiento ocasiona remodelación vascular, la cual consiste en un aumento en la densidad vascular y un aparente deterioro de las estructuras arteriolares, evidenciado por el acortamiento de los segmentos positivos para Nestina, marcador de arteriolas, y una disminución en la densidad de células positivas a  $\alpha$ -actina de musculo liso<sup>136</sup>. Recientemente, un estudio agregó que además el envejecimiento disminuye la frecuencia de ECs CD45-CD31+ en el área endosteal, sin embargo, el volumen vascular total y la ocupación en área endotelial no se encuentran afectados, además la vasculatura localizada en la epífisis y metáfisis del hueso, en la cual principalmente se encuentran arterias y arteriolas, presentó una disminución en el diámetro y longitud de los vasos, además de una orientación desorganizada; de forma interesante, la vasculatura presente en la diáfisis, compuesta principalmente por sinusoides no presentó cambios en su diámetro ni longitud<sup>135</sup>.

Por otro lado, se ha estudiado si el envejecimiento tiene un efecto en la localización de las HSC en médula ósea con respecto a los vasos sanguíneos, demostrando que en ratones viejos las HSC mantienen su asociación hacia los sinusoides y aumentan su distancia hacia las arteriolas con respecto a las HSC de ratones jóvenes, las cuales se encuentran más cercanas a las arteriolas y de igual manera mantienen su asociación hacia los sinusoides<sup>135,136</sup>.

Con respecto, a las células hematopoyéticas maduras residentes de médula ósea, en ratón, se ha reportado que el número de megacariocitos y de progenitores de megacariocitos aumenta en ratones viejos<sup>110,135,136</sup>. En cuanto a monocitos y macrófagos, su frecuencia aumenta en médula ósea de ratón<sup>152</sup>, mientras que en humano su frecuencia se mantiene<sup>153</sup>.

## Justificación

El envejecimiento es un proceso fisiológico paulatino de pérdida de funcionalidad que afecta a todos los sistemas que constituyen al organismo. El estudio de los efectos del envejecimiento es relevante en los diferentes tejidos del organismo, ya que cada uno de ellos presenta enfermedades o condiciones tejido- específicas, incluyendo a la médula ósea. Las condiciones y enfermedades en médula ósea que incrementan su incidencia al envejecer, son: anemia, leucemias, síndrome mielodisplásico y enfermedades infecciosas, y en casos extremos, falla medular. El describir los cambios asociados al envejecimiento en la médula ósea de humanos, permitirá comparar estos hallazgos con los reportados en ratón, y así poder determinar si el ratón funciona como modelo de envejecimiento. Por otro lado, estudios previos del envejecimiento en médula ósea humana han utilizado muestras de médula ósea de pacientes oncológicos, muestras cadavéricas y médulas óseas con sospechas de enfermedad hematológica, las cuales podrían arrojar resultados influenciados por dichos estados fisiológicos. Además, estos estudios han realizado comparaciones en rangos de edad muy amplios, ya sea muestras pediátricas contra muestras de adultos mayores, o muestras de jóvenes menores a 30 años comparados con adultos mayores. Por lo cual, este estudio busca resolver las inconsistencias reportadas con respecto al envejecimiento en médula ósea humana, ya que se utilizarán muestras de médula ósea de pacientes no oncológicos y hematológicamente sanos de edades de 50 a 92 años, comprendiendo el rango de edad en el cual se ha reportado que los efectos del envejecimiento se acentúan. Asimismo, los resultados del presente estudio podrían derivar en estudios funcionales posteriores, que permitan evaluar las poblaciones del microambiente hematopoyético involucradas en los cambios asociados al envejecimiento.

## Planteamiento del problema

El envejecimiento en médula ósea se ha estudiado principalmente en el ratón, modelo de estudio fisiológico por excelencia debido a su fácil manejo, manipulación y el corto tiempo en el cual se pueden obtener resultados y generar conclusiones. Sin embargo, las conclusiones obtenidas del modelo de ratón han demostrado no ser consistentes al momento de aplicarlas en humanos. En cuanto a los factores intrínsecos que influyen en el fenotipo envejecido de las HSC, el modelo de ratón ha demostrado ser reproducible para las HSC humanas, sin embargo, respecto al microambiente hematopoyético ha demostrado no ser suficiente. Esto debido a diferencias estructurales importantes en el microambiente humano con respecto al de ratón, principalmente la alta frecuencia de adipocitos en médula ósea humana, la cual no es recapitulada en el modelo de ratón, ya que estos presentan poca o nula presencia de adipocitos en médula ósea, siendo los adipocitos una población celular que ha demostrado ser muy importante para la regulación de la hematopoyesis.

El principal reto que enfrenta el estudio del envejecimiento en médula ósea humana es el acceso a las muestras. La mayoría de los estudios realizados en humano utilizan muestras de médula ósea de donadores, los cuales presentan edades entre 18-50 años de edad y son muestras que comprenden básicamente aspirados de médula ósea sin acceso a biopsias. Las biopsias disponibles son aquellas que se toman por sospecha de alguna enfermedad hematológica y que debido a esto, se encuentran sesgadas para ser utilizadas en un estudio de muestras normales de médula ósea. Por lo cual, las muestras optimas provienen de cirugías de reemplazo de cadera, las cuales comprenden adultos mayores a 30 años, hematológica y oncológicamente sanos. Debido a esto, la mayoría de los estudios en envejecimiento se enfocan en comparar muestras de donadores jóvenes (18-40 años) y muestras de adultos mayores (>70 años) provenientes de cirugías de cadera. Sin embargo, dicha estrategia no considera los efectos del envejecimiento como tal, ya que se ha considerado que a partir de los 65 años, dichos efectos se agudizan, por lo cual estudiar los grupos de edad previos y posteriores a dicha edad, nos puede arrojar información específica de cambios en médula ósea que puedan ser atribuidos a la alta incidencia de enfermedades hematológicas en pacientes mayores a 65 años. Por lo cual este trabajo de investigación está enfocado a describir y estudiar los efectos del envejecimiento en las poblaciones residentes de médula ósea en pacientes de cirugía de reemplazo de cadera, hematológicamente sanos, de edades entre 50 y 92 años.

## Hipótesis

Existen cambios asociados al envejecimiento en la arquitectura de la médula ósea, principalmente en las poblaciones estromales tales como MSC y adipocitos, las cuales son esenciales para el mantenimiento y regulación de las HSC.

## Objetivo general

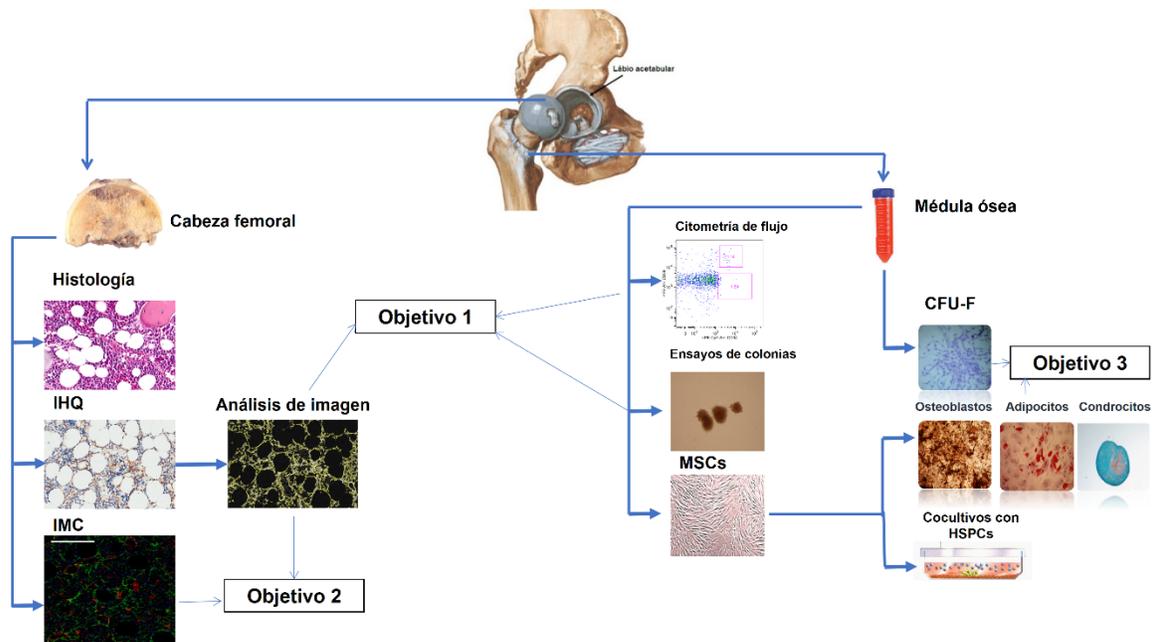
Determinar los cambios en frecuencia y funcionalidad de las poblaciones celulares que constituyen el microambiente hematopoyético en muestras de médula ósea humana de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.

## Objetivos específicos

1. Determinar cambios en la frecuencia de poblaciones hematopoyéticas y estromales residentes de médula ósea en muestras de médula ósea y biopsias de adultos y adultos mayores.
2. Determinar cambios en la asociación entre poblaciones hematopoyéticas y estromales residentes de médula ósea en muestras de médula ósea y biopsias de adultos y adultos mayores.
3. Evaluar *in vitro* la funcionalidad de las células mesenquimales estromales provenientes de muestras de médula ósea y biopsias de adultos y adultos mayores.

## Estrategia experimental

Se utilizaron muestras de médula ósea de pacientes en cirugía de reemplazo de cadera de edades entre 50 y 92 años de edad, las cuales correspondían a raspado de médula ósea y cabezas femorales, para determinar la frecuencia de las poblaciones celulares tanto por citometría de flujo, inmunohistoquímica (IHQ) y por imagenología por citometría de masas (IMC). Las densidades de las poblaciones celulares por IHQ fueron determinadas mediante software de análisis de imagen. Posteriormente las frecuencias y densidades fueron utilizadas para determinar asociaciones por densidad entre las poblaciones y se utilizó software de análisis de imagen para determinar asociaciones *in situ* entre las poblaciones. Por último, se determinaron cambios en la funcionalidad de las MSC, mediante ensayos *in vitro* de diferenciación, de capacidad clonogénica (CFU-F) y de proliferación (doblaje poblacional) de las MSC derivadas de las muestras de médula ósea de adultos y de adultos mayores (Fig. 2).



**Figura 2. Estrategia experimental del estudio.** Se detallan los métodos que serán utilizados para cumplir con los objetivos específicos planteados.

## Materiales y Métodos

### Muestras de Médula Ósea

Las muestras incluidas en este estudio fueron recolectadas de pacientes en cirugía de reemplazo de cadera del servicio médico de Reemplazo Articular de la UMAE Hospital de Traumatología y Ortopedia Lomas Verdes, en Naucalpan, Estado de México, México. La aprobación ética fue concedida por el Comité de Ética de la Comisión Nacional de Investigación Científica de la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (Anexo 1). El consentimiento para la participación en el protocolo fue verbal, de acuerdo a lo establecido por el Comité de Ética (Anexo 2). Las muestras obtenidas fueron de dos tipos: muestra de médula ósea y cabeza femoral. Las muestras fueron divididas en dos grupos de edad: adultos (50-64 años) y adultos mayores (65-92 años). A continuación se presentan los criterios de inclusión y exclusión. Las muestras de médula ósea obtenidas fueron las siguientes:

#### Criterios de Inclusión

- Pacientes hematológicamente sanos mayores a 30 años.
- Pacientes con expediente completo, incluyendo resultados de biometría hemática y química sanguínea.
- Pacientes que hayan otorgado consentimiento verbal.

#### Criterios de exclusión

- Pacientes con alteraciones hematológicas evidenciadas en resultados de biometría hemática.

### Procesamiento de Muestras de médula ósea

La muestra de médula ósea fue obtenida de raspado de la cabeza femoral, del canal medular y de acetábulo, zonas en donde se distribuyen las HSCs y las HPCs<sup>154</sup> (Fig. 3). Una vez obtenida la muestra de médula ósea se colocó en medio RPMI (Hyclone), suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone), penicilina-estreptomicina 1µl/ml (Gibco) y 5 ul/ml de heparina. Las muestras fueron procesadas utilizando dos métodos: eluido y triturado.

#### Eluido

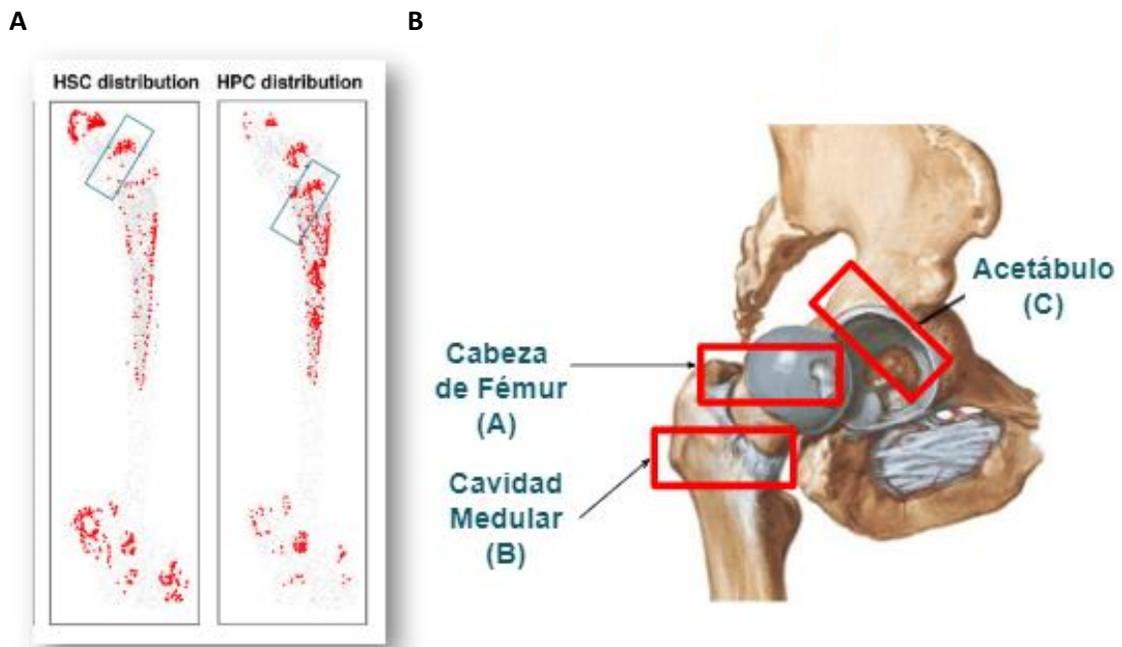
La muestra de médula ósea se resuspendió con el medio de cultivo que contiene la muestra y posteriormente, el sobrenadante fue filtrado y colocado en un nuevo tubo, utilizando un

filtro de 100 micras (Corning). Después, la muestra restante se lavó 3 veces con 10 ml de medio de cultivo (RPMI adicionado con 5% SFB y penicilina-estreptomicina 1µl/ml), filtrando cada vez el sobrenadante. La muestra filtrada se centrifugó a 1200 rpm durante 8 min, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo.

### Triturado

La muestra de médula ósea restante después de los lavados se trituró utilizando un mortero y agregando 2 ml de medio de cultivo. Después se agregaron 10 ml de medio para lavar el pistilo y las paredes del mortero. La muestra se filtró utilizando un filtro celular de 100 micras, se agregaron 5 ml de medio para lavar el filtro y se centrifuga la muestra a 1200 rpm durante 8 min, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo.

Las suspensiones celulares obtenidas de eluido y triturado se mezclaron y posteriormente, se realizó el conteo celular con solución de Turk (Goldel bell) y se obtuvo la viabilidad celular con azul de tripano (Gibco). La suspensión celular obtenida fue procesada para obtener células mononucleares.



Tomado de Guezguez et al. 2013

**Figura 3. Zonas anatómicas de obtención de muestra de médula ósea.** A. Zonas femorales donde se distribuyen las HSCs y los HPCs. B. Zonas de obtención de muestra de médula ósea señaladas en recuadros rojos.

## Obtención de Células Mononucleares (CMN)

Después del conteo celular, la suspensión se colocó en tubos con ficoll (GE Healthcare), a una relación de 4 ml de muestra (máximo  $300 \times 10^6$  de células) y 3 ml de ficoll. Se modificó el número de tubos utilizados dependiendo del total de células obtenidas por muestra, para evitar saturación celular para la obtención de CMN. Los tubos se centrifugaron a 400g durante 30 min, con desaceleración de 1. Al finalizar, se obtuvieron tres fases, de las cuales se obtiene la fase media, la cual contiene a las CMN. Dicha fase se lavó con 5 ml de PBS estéril (Hyclone) y se centrifugó a 1200 rpm durante 8 min. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado y su viabilidad celular fue obtenida. Las CMN obtenidas fueron utilizadas para realizar los siguientes ensayos:

1. Citometría de flujo para determinar frecuencia de poblaciones hematopoyéticas y mesenquimales.
2. Ensayos funcionales de colonias de progenitores hematopoyéticos (colony assay) y de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F).
3. Cultivo para obtención de MSC para ensayos funcionales de las mismas, tales como ensayos de diferenciación, proliferación y determinación de fenotipo de las MSC utilizadas.
4. Criopreservación para banco de CMN provenientes de médula ósea normal.

## Evaluación de frecuencia de Células hematopoyéticas y de MSC por citometría de flujo

Para la evaluación de la frecuencia de las poblaciones de HSC, HPC y MSC en muestras de médula ósea, las CMN fueron incubadas con el reactivo de viabilidad LIVE/DEAD Fixable Aqua (Invitrogen) a una concentración de 1  $\mu$ l por cada  $1 \times 10^6$  CMN en 1 ml de PBS, durante 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Una vez concluida la incubación, las CMN fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 1200 rpm durante 8 min. Posteriormente, las CMN fueron resuspendidas en buffer de citometría (PBS 1X, EDTA 1mM y 2% de SBF) e incubadas durante 20 min a 4°C en oscuridad, con un panel de anticuerpos para la determinación de poblaciones de HSC, HPC y de MSC (Tabla 3). El detalle de los anticuerpos utilizados se encuentra en la Tabla 4. Se realizó la tinción de  $1 \times 10^6$  CMN por tubo. Una vez concluida la incubación, las células fueron fijadas con 250  $\mu$ l de solución de lisis (Buffer de lisis (BD) al 10% en agua inyectable estéril) durante 10 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las CMN con 1 ml de PBS y se centrifugaron a 2500

rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 µl de buffer de citometría. Las CMN teñidas fueron leídas utilizando el citómetro BD Canto II.

Tabla 3. Panel de tinción de CMN derivadas de médula ósea para evaluación por citometría de flujo.

<b>Población celular</b>	<b>Marcadores de Superficie</b>	<b>Anticuerpos utilizados</b>
<b>HSC</b>	Linaje-CD34+CD38- CD90+CD49F+	Linaje-FITC, CD34 PECy7, CD38-PE, CD90-APC, CD49f-PERCPCy5.5
<b>HPC mieloides</b>	Linaje-CD34+CD38+CD90- CD45RA+CD135+	Linaje-FITC, CD34 PECy7, CD38-PE, CD90-APC, CD135-PERCPCy5.5, CD45RA Pacific blue
<b>HPC linfoides</b>	Linaje-CD34+CD38-CD90- /lowCD45RA+CD135+	Linaje-FITC, CD34 PECy7, CD38-PE, CD90-APC, CD135-PERCPCy5.5, CD45RA Pacific blue
<b>MSC</b>	CD45-NGFR+CD90+/- CD10+/-	CD45-PERCPCy5.5, NGFR-APC, CD90 FITC, CD10 PE

Tabla 4. Detalle de anticuerpos utilizados en la tinción por citometría de flujo.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución</b>
<b>Linaje-FITC</b>	BD	1:50
<b>CD34 PECy7</b>	Biolegend	1:100
<b>CD38 PE</b>	Biolegend	1:100
<b>CD90 APC</b>	BD	1:100
<b>CD49f PERCPCy5.5</b>	BD	1:100
<b>CD135-PERCPCy5.5</b>	Biolegend	1:50
<b>CD45RA Pacific blue</b>	Biolegend	1:50
<b>CD45-PERCPCy5.5</b>	Biolegend	1:100
<b>NGFR-Alexa Fluor 647</b>	BD	1:100
<b>CD90 FITC</b>	Biolegend	1:100
<b>CD10 PE</b>	Miltenyi	1:100

### Ensayo de colonias de Progenitores Hematopoyéticos

Para determinar la frecuencia de progenitores hematopoyéticos en las muestras de médula ósea, se sembraron 50,000 CMN en 1 ml de metilcelulosa (Stem Cell Technologies). El ensayo se realizó por duplicado y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 14 días. Posteriormente, se realizó el conteo de colonias, identificando los diferentes progenitores hematopoyéticos:

- a. CFU-G: Unidad formadora de colonias de granulocitos.

- b. CFU-M: Unidad formadora de colonias de monocitos.
- c. CFU-GM: Unidad formadora de colonias de granulocitos-monocitos.
- d. CFU-E: Unidad formadora de colonias de eritrocitos.
- e. BFU-E: Unidad formadora de colonias de eritrocitos grandes.
- f. Mixtas.

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

Para determinar la frecuencia de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F), se sembraron 250,000 y 500,000 CMN en medio DMEM bajo en glucosa (Hyclone) suplementado con 10% suero bovino fetal (Hyclone) y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina 10,000U/ml (Gibco). El cultivo se incubó a 37° C en una atmósfera húmeda con 0.5% de CO<sub>2</sub> durante 14 días, realizando cambio de medio al séptimo día. Después de 14 días, se retiró el medio y se lavaron las células dos veces con 1ml de PBS 1X no estéril. Se dejaron secar a temperatura ambiente durante toda la noche, para posteriormente teñirlas con 2.0 ml de solución Wright-Giemsa (Golden Bell) a temperatura ambiente durante 2 min, transcurrido el tiempo se adicionó 1.5ml de solución amortiguadora de fosfatos y se incubó durante 4 min. Posteriormente, se lavaron con agua corriente y se dejaron secar. Posteriormente, se cuantificaron bajo el microscopio, utilizando una cuadrícula, donde cada cuadro mide 1 mm por lado. Se consideró como colonia a un conjunto de células que agrupadas medían igual o más de 1mm<sup>2</sup> y crecían hacia una misma dirección con un centro definido y como grupo a un agregado de células de menos de 1 mm<sup>2</sup> y mayor a 10 células con un centro definido.

### Criopreservación

Para obtener un banco de CMN de médula ósea normal, se congelaron entre 20-50 x10<sup>6</sup> CMN dependiendo de la cantidad total obtenida por muestra. Las CMN fueron resuspendidas en 400 µl de medio RPMI suplementado (RPMI adicionado con 10% SFB y penicilina-estreptomicina 1µl/ml) y posteriormente fueron agregadas a un medio de congelación que contiene 100 µl de DMSO (Sigma) y 500 µl de SFB (Gibco), previamente incubado durante 5 min a -20°C. Las CMN fueron agregadas al medio de congelación, se mezcló y se colocaron en un contenedor de congelación a -80°C. Después de 2hrs, fueron almacenadas en nitrógeno líquido.

## Obtención de MSC

Para obtener un cultivo de MSC, se cultivaron de 20-50 x10<sup>6</sup> CMN en cajas P100 (Corning) en medio DMEM bajo en glucosa suplementado (DMEM adicionado con 10% SFB y penicilina-estreptomina 1µl/ml), dependiendo del número total de CMN obtenidas por muestra. Al tercer día de cultivo, se eliminó el sobrenadante y se realizó cambio de medio. Posteriormente, se realizó cambio de medio 1 vez por semana, hasta que las MSC alcanzaron confluencia, la cual correspondía a la resiembra 0 (R0).

## Determinación de fenotipo de MSC en cultivo

Uno de los principales criterios para determinar que el cultivo celular es de MSC, es la expresión de marcadores de superficie específicos<sup>67</sup>. Para determinar que las células derivadas de médula ósea eran MSC, las células se tripsinizaron en la resiembra 2 (R2) y se procedió a teñirlas para evaluar por citometría de flujo con los anticuerpos señalados en la tabla 5. Para la tinción por citometría, se realizaron los pasos descritos en la tinción de CMN, con los siguientes cambios:

1. La viabilidad no fue evaluada debido a que solo se verificó el fenotipo de las MSC.
2. La incubación de los anticuerpos fue a temperatura ambiente.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la evaluación del fenotipo de MSC en cultivo por citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo	Dilución
<b>CD45</b>	FITC/PERCPCy5.5	1:100
<b>CD105</b>	PERCPCy5.5	1:100
<b>CD90</b>	APC	1:100
<b>CD73</b>	PE	1:100
<b>CD31</b>	FITC	1:100
<b>CD140b</b>	PE	1:100

## Ensayos de diferenciación de MSC hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos

Las MSC derivadas de médula ósea de adulto y de adultos mayores fueron tripsinizadas cuando alcanzaron confluencia en R0, se les agregó 5 ml de tripsina (Hyclone) y se incubaron durante 7 min a 37°C 5%CO<sub>2</sub>, después se agregaron 500 µl de SFB para detener la actividad de la tripsina. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y contabilizadas. Los ensayos de diferenciación se realizaron de dos formas: cualitativa y cuantitativa.

## Evaluación cualitativa de la diferenciación hacia Adipocitos, Osteoblastos y Condrocitos.

Para realizar los ensayos de diferenciación cualitativa, se sembraron en placas de 48 pozos (Corning), las siguientes cantidades de MSC:

- Para adipocitos: 10,000 MSC por pozo.
- Para osteoblastos: 5,000 MSC por pozo.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Las MSC se cultivaron en medio DMEM bajo en glucosa suplementado, y se realizó cambio de medio al día siguiente. En todos los ensayos se agregó un control de MSC, las cuales se cultivaron con medio DMEM bajo en glucosa suplementado. Una vez que las MSC sembradas alcanzaron confluencia, se cambió el medio por medio de inducción a diferenciación hacia adipocitos u osteoblastos. Las MSC en medio de inducción se dejaron durante 14 días para osteoblastos y 21 días para adipocitos. Se realizó cambio de medio cada 7 días. Una vez concluido el tiempo, se realizó la tinción para evaluar la diferenciación hacia adipocitos utilizando rojo oleoso y hacia osteoblastos utilizando la tinción de Von Kossa. Para realizar la tinción con rojo oleoso, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 300 µl de formaldehído al 4% durante 3 min, después se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 ul de propilenglicol absoluto durante 10 min. Una vez concluido el tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 ul del reactivo rojo oleoso previamente filtrado y se incubó a 60°C durante 30 min. Posteriormente se retiró el exceso de colorante y se agregaron 300 ul de propilenglicol al 85% por 3 min. Por último, las células se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con 300 ul de hematoxilina de Harris (Golden Bell) durante 10 min, una vez transcurrido el tiempo se retiró el exceso de colorante, se realizó un nuevo lavado con agua destilada, y posteriormente las células se montaron usando *Super Mount* (Biogenex). La tinción se observó utilizando un microscopio invertido (Olympus) para identificar las células positivas, siendo aquellas con vacuolas lipídicas brillantes afines al colorante rojo oleoso. Para la tinción de Von Kossa, se retiró el sobrenadante y se lavaron las células con 300ul de agua destilada, posteriormente se incubaron con 300 ul de nitrato de plata durante 20 min bajo exposición de luz (lámpara). Una vez transcurrido el tiempo, se incubaron con hipoclorito de sodio al 0.01% durante 5 min, posteriormente se lavaron las células con agua corriente, se contratiñeron con hematoxilina de Harris y por último, se montaron utilizando *Super Mount*.

Para evaluar la capacidad de diferenciación de las MSC hacia condrocitos, se colocaron 250,000 MSC en un tubo cónico de 15 ml en un volumen de 500 µl de medio DMEM bajo en glucosa, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se retiró el medio DMEM y se sustituyó por medio de inducción hacia diferenciación de condrocitos. El medio fue cambiado cada tercer día durante 28 días. Una vez concluido este tiempo, las micromasas formadas fueron lavadas con PBS, posteriormente deshidratadas en un gradiente de alcoholes al 70%, 80%, 90% y 100% durante 2 horas cada uno. Después, se pasaron a xilol y fueron incluidas en parafina. Una vez incluidas, fueron cortadas y colocadas en laminillas para realizar la evaluación de diferenciación hacia condrocitos. Las micromasas fueron teñidas con H&E y la tinción de tricrómica de Masson (kit Hycel).

#### Evaluación cuantitativa de la diferenciación de las MSC hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos.

Para realizar los ensayos de diferenciación cuantitativa, se sembraron en placas de 24 pozos (Corning), las siguientes cantidades de MSC:

- Para adipocitos: 30,000 MSC por pozo.
- Para osteoblastos: 25,000 MSC por pozo.

El procedimiento de diferenciación se siguió de la misma forma que en la evaluación cualitativa, la diferencia fue en la evaluación de la diferenciación. Tanto para adipocitos como para osteoblastos, una vez que pasó el tiempo de inducción hacia la diferenciación, las MSC fueron lavadas con PBS, tripsinizadas y contabilizadas. Después, fueron colocadas en laminillas, en gotas de PBS que contenían 5,000 células. Se colocaron 3 gotas de 5,000 células por laminilla, correspondiendo una de ellas al control de diferenciación. En el caso de adipocitos, se secaron las laminillas y se fijaron con paraformaldehído para después realizar una tinción con Lipidtox (ThermoScientific), un colorante fluorescente que se adhiere a las vacuolas lipídicas. Después se agregó DAPI para teñir los núcleos. Las laminillas fueron escaneadas utilizando el escáner de fluorescencia Aperio FL (Leica Biosystems) a un aumento de 20X y la cuantificación se realizó con el software de análisis de imagen ImageScope, cuantificando el área positiva para la marca de lipidtox. Para los osteoblastos, las laminillas fueron fijadas con metanol frío y posteriormente fueron teñidas por IHQ para el marcador osteocalcina. Las laminillas fueron escaneadas utilizando el escáner de campo claro Aperio CS2 (Leica Biosystems) a un aumento de 20X y el análisis

de imagen se realizó utilizando el software ImageScope, en el cual se cuantificaron las células positivas para osteocalcina con respecto a las negativas.

Con respecto a la diferenciación hacia condrocitos se realizó el mismo procedimiento de la evaluación cualitativa. Una vez que se obtuvieron cortes de las micromasas, se procedió a teñirlas mediante IHQ utilizando el marcador Agrecan. Las laminillas fueron escaneadas utilizando el escáner de campo claro Aperio CS2 a un aumento de 40X y la cuantificación del área positiva se realizó utilizando el software de análisis de imagen ImageScope.

### Ensayos de proliferación de MSC

Para evaluar la capacidad de proliferación de las MSC derivadas de adultos y adultos mayores, se utilizó el método de evaluación de doblaje poblacional, descrito anteriormente<sup>143</sup>. Una vez que alcanzaron confluencia en R0, las MSC fueron tripsinizadas y se resembraron  $1 \times 10^5$  MSC en cajas P100, después de 10 días, las MSC fueron tripsinizadas y contadas con azul de tripano y posteriormente, se volvieron a resembrar a una densidad de  $1 \times 10^5$  MSC y se repitió el proceso a los 10 días. El número de doblajes poblacionales (NPD) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{NPD} = \text{Log } 10(\text{N}/\text{No}) \times 3.33$$

Donde:

No= Población inicial

N= Población final

El proceso se repitió hasta que el NPD fue 0 y este se mantuvo durante tres lecturas y las células presentaron la morfología característica de células senescentes.

### Ensayos de la capacidad de soporte hematopoyético mediante un sistema de cocultivos

Para realizar la evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético de las MSC derivadas de médula ósea de adultos y de adultos mayores, se realizaron cocultivos entre éstas y HSPCs CD133+CD34+.

### Preparación de capas de MSC

Las MSC obtenidas de la resiembra 2 fueron cultivadas en placas de 24 pozos, a una concentración de  $1 \times 10^4$  MSC por pozo con 1ml de medio DMEM suplementado a 37°C 5%

CO<sub>2</sub>. Una vez que alcanzaron confluencia aproximada del 80%, se agregaron 2 µg/ml de mitomicina (Bristol) para inhibir la proliferación de las MSC. La solución se incubó durante 24 horas, después se lavó tres veces con PBS y se agregó medio DMEM suplementado y fueron incubadas a 37°C 5% CO<sub>2</sub>.

#### Obtención de células HSPCs Linaje-CD133+CD34+

Las células HSPCs CD34+CD133+Linaje- fueron obtenidas de muestras de sangre periférica movilizada (SPM) (n=3), las cuales formaban parte del banco de células almacenadas en nitrógeno líquido. Para lo cual, se procedió a descongelar las muestras, siguiendo el siguiente protocolo. Se utilizó medio RPMI suplementado a una temperatura aproximada de 37°C en un tubo estéril de 15 ml, el cual se agregó lentamente al vial conteniendo las células de SPM. Posteriormente, la solución del medio con las células fue colocada en el tubo de 15 ml con medio suplementado e incubado durante 10 min a 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Trascurrido el tiempo se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y las células fueron lavadas con 10 ml de PBS. Después se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS pH 7.4 suplementado con 0.5% SFB y 2mM EDTA (Sigma).

Posteriormente, se procedió a la obtención de células linaje negativo utilizando el kit de depleción de linaje hematopoyético (MILTENYI), para lo cual CMN obtenidas fueron contadas y la suspensión celular se centrifugó a 300 g por 10 min y se descartó por completo el sobrenadante. Las CMN fueron resuspendidas en 40ul de buffer, se agregó 10ul del coctel de anticuerpos acoplados a biotina y se incubó durante 10 min a 4°C. Una vez transcurrida la incubación, las CMN fueron lavadas con 1ml de buffer y se centrifugaron a 300 g por 10 min y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 80 ul de buffer y se agregaron 20 ul de microperlas anti-biotina y fueron incubadas por 15 min a 4°C. Se lavaron nuevamente las células con 1 ml de buffer y fueron centrifugadas, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 ul de buffer hasta una cantidad de 10<sup>8</sup> células. Una vez resuspendidas se procedió a la separación magnética, para la cual se colocó una columna LD en el campo magnético de un separador MACS y se preparó la columna con 3 ml de buffer. Una vez lista la columna, se agregó la suspensión celular a la columna y se colectaron en un tubo de 15 ml, siendo esta la fracción enriquecida en células linaje negativas. Se lavó 3 veces la columna con 3ml de buffer cada vez.

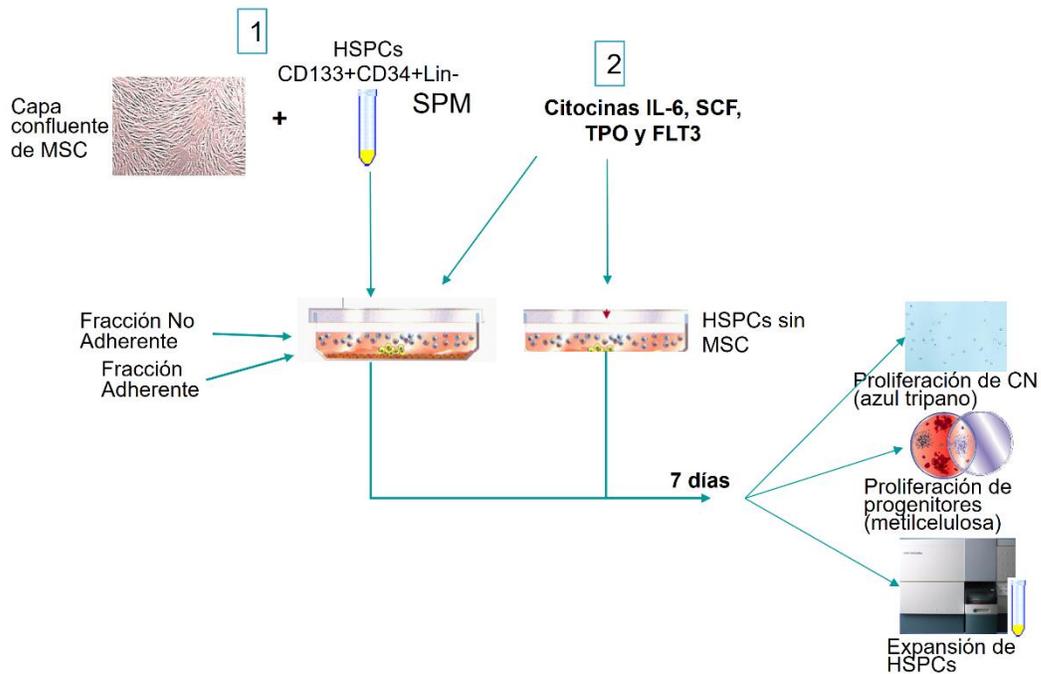
Una vez obtenidas las células linaje negativas, la suspensión celular se centrifugó a 300 g x 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 ul de buffer, se agregaron 50 ul de microperlas diamante CD133 (CD133 Diamond Microbeads) y se incubó por 30 min a 4°C. Se lavaron las células con 5 ml de buffer y se centrifugaron. Una vez descartado el sobrenadante, las células linaje negativas fueron resuspendidas en 500 ul de buffer y se procedió a realizar la separación magnética. Previamente, se colocó una columna MS en el campo magnético de un separador MACS y se preparó la columna con 500 ul de buffer. Una vez lista, se agregaron las células linaje negativas a la columna y se colectaron las células no marcadas en un tubo de 15 ml. Se lavó la columna 3 veces con 500 ul de buffer cada vez correspondiendo esta fracción a las células linaje negativas CD133-. Posteriormente, se colocó 1ml de buffer en la columna, y se presionó firmemente utilizando el embolo proporcionado con la columna, colectando el afluente en otro tubo de 15 ml, siendo esta la fracción Linaje negativo CD133+.

Una vez obtenidas las fracciones linaje negativo CD133+ y CD133-, se corroboró el fenotipo de estas dos poblaciones por citometría de flujo, agregando los marcadores CD34 y CD38 para conocer el porcentaje de células CD34+ obtenidas, además las proporciones de progenitores con CD38. Los anticuerpos utilizados fueron CD133-PE (Miltenyi, 1:100), CD34-PECy7 (Biolegend, 1:100) y CD38-FITC (BD).

### Ensayos de Cocultivos

Una vez obtenidas las capas de MSC y las HSPCs CD133+CD34+ Linaje-, se realizaron los ensayos de cocultivos (Fig. 4). Para lo cual, se les retiró el medio a las MSC derivadas de adultos y adultos mayores y se agregaron  $1 \times 10^4$  HSPCs CD133+CD34+Linaje-, resuspendidas en 1 ml de medio libre de suero Stem Span (Stem Cell Technologies). Los ensayos se hicieron por duplicado considerando las siguientes condiciones:

1. HSPCs.
2. HSPCs en medio de cultivo suplementado con 10 ng/ml de SCF, IL-6, TPO y Flt3.
3. HSPCs en capa de MSC de adulto.
4. HSPCs en capa de MSC de adulto mayor.
5. HSPCs en capa de MSC de adulto en medio de cultivo suplementado con 10 ng/ml de SCF, IL-6, TPO y Flt3.
6. HSPCs en capa de MSC de adulto mayor en medio de cultivo suplementado con 10 ng/ml de SCF, IL-6, TPO y Flt3.



**Figura 4. Estrategia experimental del ensayo de cocultivos de HSPCs CD133+CD34+ en capas de MSC derivadas de médula ósea de adultos y de adultos mayores.** Se muestran las dos condiciones evaluadas, HSPCs CD133+CD34+ en capas confluentes de MSC de adultos y adultos mayores (1) y HSPCs en capas de MSC de adultos y adultos mayores en presencia de la citocinas IL-6, SCF, TPO y Flt3. SPM: Sangre periférica movilizada.

A los 7 días de cultivo, se evaluó la proliferación de células nucleadas, el número de progenitores hematopoyéticos y la expansión de la población de HSPCs en dos fracciones del cocultivo: fracción no adherente, considerada el sobrenadante del cultivo y fracción adherente, aquellas células adheridas a las MSC. Para obtener la fracción no adherente, se tomó el sobrenadante y se lavaron los pozos con 1 ml de PBS, para obtener todas aquellas células no adheridas a las MSC y se centrifugó a 12000 rpm durante 8 min. La fracción adherente se obtuvo tripsinizando la capa de MSC durante 7 min a 37°C, proceso que fue detenido utilizando 100 ul de SFB (Gibco). Posteriormente se obtuvo la suspensión celular y se lavaron los pozos con 1ml de PBS para obtener todas las células, y se centrifugó la suspensión celular a 1200 rpm durante 8 min. Una vez obtenidas las células de ambas fracciones, se contaron con azul de tripano para obtener el número total de células. En cuanto a la fracción adherente, por tamaño se discriminaron las MSC y solo se contabilizaron las células hematopoyéticas. Para evaluar el número de progenitores hematopoyéticos, se tomaron 2,000 células por cada condición y se cultivaron en metilcelulosa. Después de 14 días, se realizó la evaluación del número de colonias. La expansión de la población de HSPCs, se evaluó por citometría de flujo siguiendo el

protocolo descrito para tinción de CMN, utilizando los anticuerpos CD133-PE (Miltenyi), CD34-PECy7 (Biolegend) y CD38-FITC (BD).

### Procesamiento de cabeza femoral

Durante la cirugía de reemplazo de cadera, las cabezas femorales fueron cortadas al nivel del canal femoral, removidas y reemplazadas por cabezas femorales artificiales. Una vez removida la cabeza femoral, ésta fue colocada en un recipiente con 500 ml de solución fijadora (formol al 10%).

### Fijación

Las cabezas femorales se mantuvieron en solución fijadora durante toda la noche. Posteriormente, las cabezas femorales fueron cortadas longitudinalmente utilizando una sierra cortadora de tejido, con ayuda de un técnico especializado del área de patología del Hospital de Oncología de Centro Médico Siglo XXI. Esto se realizó para optimizar la fijación del tejido y su posterior procesamiento. Una vez cortadas, se colocaron nuevamente en solución fijadora durante 24 horas.

### Descalcificación

Después de la fijación, los segmentos de cabeza femoral fueron cortados en piezas de 2-3 cm de largo y cada uno fue colocado en casetes histológicos. Los segmentos de médula ósea fueron sumergidos en solución de descalcificación (EDTA (Sigma) al 12% en PBS (Sigma) pH 8.0) y se mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación durante 10 días, con cambios de solución de descalcificación cada 2 días. Una vez concluido el tiempo, los segmentos de médula ósea fueron revisados para corroborar que tuvieran textura de esponja, indicativo de que se encontraban descalcificados.

### Deshidratación e inclusión en parafina

Los segmentos de médula ósea descalcificados fueron lavados con agua corriente durante 30 min y posteriormente, fueron colocados en alcohol al 70%. El proceso de deshidratación e inclusión en parafina (Paraplast) se realizó utilizando un procesador de tejidos multifuncional automatizado (KOS/Milestone).

### Evaluación histológica de las biopsias de médula ósea

Se obtuvieron cortes histológicos de un grosor de 3  $\mu$ m de las biopsias de médula ósea, los cuales fueron teñidos con hematoxilina & eosina (H&E), para la evaluación histopatológica. Para realizar la tinción de H&E, las biopsias fueron desparafinadas a 60°C durante toda la

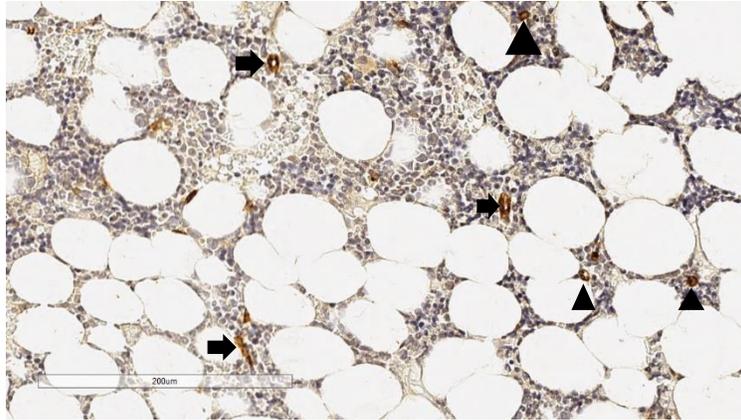
noche, hidratadas utilizando sustitutos de xilol (ottix plus) y de alcoholes (Ottix shaper) y enjuagadas con agua corriente. Fueron sumergidas en hematoxilina de Harris (Merck Millipore) durante 1 min, en alcohol ácido durante 10 segundos y por último, en carbonato de litio para virar la hematoxilina. Después, fueron lavadas con agua corriente, sumergidas en ottix shaper y teñidas con eosina durante 1 min, fueron enjuagadas y deshidratadas utilizando ottix shaper y ottix plus y se montaron utilizando medio de montaje Entellan (Millipore). Las tinciones de H&E de las biopsias de médula ósea fueron evaluadas por dos hematopatólogos independientes, para determinar la calidad y funcionalidad del tejido. Los criterios de evaluación fueron los siguientes:

1. Presencia de zonas con tejido hematopoyético intacto.
2. Porcentaje de celularidad de la muestra.
3. Relación mieloide: eritroide en la muestra.
4. Número de megacariocitos por mm<sup>2</sup>.
5. Presencia o ausencia de osteoblastos, además si se encontraban activos o inactivos.
6. La existencia de alteraciones en la diferenciación de los diferentes linajes hematopoyéticos.
7. Determinar si la muestra es funcional como muestra normal.

### Inmunohistoquímica (IHQ)

Las muestras descritas como como funcionales fueron teñidas mediante inmunohistoquímica (IHQ), utilizando el marcador CD34 para validar su funcionalidad para IHQ. Las laminillas fueron desparafinadas a 60°C durante toda la noche, rehidratadas utilizando ottix plus (2 veces por 8 min), ottix shaper (2 veces por 5 min) y agua corriente por 5 min. La recuperación de antígeno se realizó en el procesador multifuncional de tejidos (KOS) a 110°C por 5 min, con buffer de citratos pH 6. El bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena se realizó cubriendo el tejido con Bloxall (Vector Laboratories) durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con PBS Tween al 0.05%. El bloqueo de antígenos se realizó con suero normal de caballo al 2.5%, reactivo que forma parte del kit de IHQ Impress anti-rabbit (Vector Laboratories), durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario (CD34 1:5000) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-rabbit (kit Impress, Vector laboratorios) durante 30 min a temperatura ambiente. El revelado de la tinción se realizó con diaminobenzidina (DAB) (Vector laboratories) y la contratinción

con hematoxilina. Las laminillas fueron deshidratadas y montadas con medio entellan. Una vez listas, se revisaron al microscopio para identificar la presencia de marca positiva y su especificidad, como se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Tinción de CD34 para determinar funcionalidad de la muestra.** Imagen representativa de muestra de médula ósea positiva para marcaje con CD34 por IHQ. Vasos sanguíneos marcados con flecha y células hematopoyéticas CD34+ marcadas con cabezas de flecha.

Después de corroborar su funcionalidad, tanto por la evaluación histológica como por la tinción de CD34, las muestras fueron teñidas por IHQ con anticuerpos específicos para detectar las distintas poblaciones celulares residentes de médula ósea, los cuales se detallan en la tabla 6. La información acerca de los anticuerpos se encuentra en el Anexo 3.

### Análisis de imagen

#### Cuantificación de poblaciones celulares

Las tinciones de las distintas poblaciones celulares fueron escaneadas utilizando el escáner Aperio CS2 (Leica Biosystems), a un aumento de 20X. Utilizando el software de análisis de imagen Image Scope (Leica Biosystems), se realizaron capturas de imágenes a un aumento de 20X, utilizando la función de screenshot de tres zonas hematopoyéticas al azar. Dichas imágenes fueron utilizadas para la cuantificación de las poblaciones celulares. Para la cuantificación de los marcadores MPO, NGFR, CD163, CD68 y E-caderina se cuantificó el área positiva con respecto al área hematopoyética, utilizando un pipeline diseñado mediante el software Cell Profiler, con excepción de NGFR en el cual se utilizó un pipeline previamente diseñado<sup>155</sup>.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la detección de las poblaciones celulares residentes en médula ósea.

Población celular	Anticuerpo	Dilución
<b>HSPCs</b>	CD34	1:5000
<b>Progenitores linfoides B</b>	Pax5	1:500
<b>Linfocitos T</b>	CD3	1:150
<b>Linfocitos B</b>	CD20	1:150
<b>Células mieloides en maduración</b>	Mieloperoxidasa (MPO)	1:250
<b>Progenitores eritroides</b>	E-caderina	1:200
<b>Megacariocitos</b>	CD31	1:600
<b>Monocitos/macrófagos</b>	CD68	1:2500
<b>Macrófagos</b>	CD163	1:500
<b>MSC</b>	NGFR	1:50
<b>Adipocitos</b>	Perilipina	1:1000
<b>Osteoblastos</b>	Osteocalcina	1:10000
<b>Arterias y capilares</b>	$\alpha$ -SMA	1:2500

Para la cuantificación de los marcadores CD31 y  $\alpha$ -SMA, se cuantificó el número de objetos positivos totales con respecto al área de hematoxilina; mientras que la cuantificación de las células positivas para CD34 fue mediante la cuantificación de las células positivas con respecto al número total de núcleos presentes en la imagen, utilizando Cell Profiler. La cuantificación de la población de adipocitos fue realizada utilizando un pipeline previamente publicado<sup>156</sup>, en el cual se determina el área cubierta por los adipocitos. Los pipelines creados y utilizados pueden descargarse en <https://github.com/Alicia-AguilarN/Cell-Profiler-pipelines>.

La cuantificación de las poblaciones linfoides (Pax5, CD3 y CD20) fue realizada utilizando el software de análisis de imagen QuPath, debido a que la tinción nuclear tan específica genera fondo utilizando Cell Profiler. En el software QuPath se utilizaron las funciones *Analyze -> Cell Analysis -> Positive cell detection*, los cuales arrojan el número total de células positivas con respecto al número total celular. Con respecto a osteocalcina, las trabéculas fueron contabilizadas manualmente utilizando un aumento de 10X.

#### Evaluación de asociaciones *in situ*

Para determinar si las poblaciones de HSPCs CD34+ y los adipocitos se asociaban *in situ*, se utilizó un pipeline diseñado en CellProfiler en el cual se identifica si células de una población celular en específico se encuentran en contacto con células de otra población. La

evaluación de la distancia entre la población de HSPC CD34+ a vasos sanguíneos se realizó con el software Image J en el cual se identificaron ambas poblaciones y se cuantificó su distancia. Por otro lado, para la cuantificación de la densidad de células MPO+ en el área alrededor de los adipocitos y en parénquima, se utilizó el software ImageScope, aplicando el algoritmo Positive Pixel Count, el cual arroja análisis de píxeles positivos en colores desde amarillo hasta rojo y los píxeles negativos en azul.

### Imagenología por citometría de masas (IMC)

Se utilizó la tecnología de imagenología por citometría de masas (IMC) para evaluar la relación *in situ* entre las poblaciones celulares presentes en médula ósea. La tecnología de IMC permite visualizar hasta 40 anticuerpos en un solo corte de tejido. Se utilizaron cortes de médula ósea de adulto (n=2) y de adulto mayor (n=3) y se tiñeron para la detección de 12 marcadores, los cuales se detallan en la tabla 7. El protocolo de tinción de IMC que se utilizó fue previamente reportado por Chang y colaboradores<sup>157</sup>, el cual consiste en un protocolo similar a la IHQ, con excepción de que no se realiza bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena ya que no se realiza incubación con anticuerpo secundario ni revelado con algún cromógeno. Esto es debido a que se utilizan anticuerpos acoplados a un metal no esencial, los cuales son detectados por un equipo de citometría de masas acoplado a un sistema de imagen llamado Hyperion Imaging System. Hyperion utiliza plasma como conductor, pulveriza la muestra y va detectando estos metales y les asigna coordenadas y reconstituye por coordenadas la posición del metal en la muestra y por consiguiente, las coordenadas del anticuerpo al que se encuentra acoplado (Fig. 6).

### Estadística

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism versión 5 para Windows (GraphPad software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). La comparación entre dos grupos (adultos y adultos mayores) se realizó aplicando la prueba t no pareada (paramétrica) y Mann-whitney (no paramétricas). Comparación entre más de dos grupos fue analizada utilizando Anova de dos vías y la post prueba de Bonferroni. Las asociaciones entre las densidades de las poblaciones celulares fueron analizadas utilizando la prueba de correlación de Pearson. Los datos son mostrados como media  $\pm$  SEM.

Tabla 7. Anticuerpos acoplados a metales no esenciales utilizados para la tinción por IMC de cortes de médula ósea de adultos y adultos mayores.

Metal	Anticuerpo	Dilución	Población detectada
141Pr	$\alpha$ -SMA	1:5000	Arterias y capilares
142Nd	Perilipina A	1:100	Adipocitos
145Nd	CD31	1:250	Megacariocitos y ECs
146Nd	MPO	1:2,000	Células MPO+
158Gd	CD34	1:100	HSPCs y ECs
159Tb	CD68	1:5,000	Monocitos-macrófagos
160Gd	NGFR	1:50	MSC
161Dy	CD20	1:150	Linfocitos B
163Dy	CD163	1:10	Macrófagos
170Er	CD3	1:150	Linfocitos T
174Yb	E-caderina	1:200	Progenitores eritroides
191/193Ir	Intercalador		Marcador de núcleo

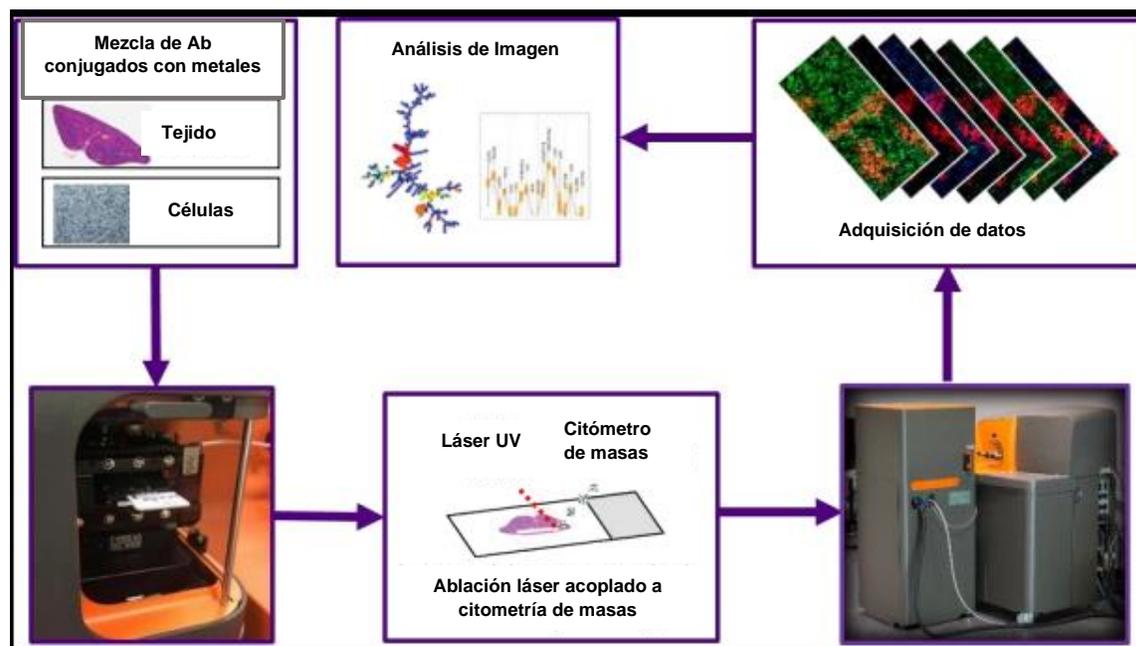


Figura 6. Imagenología por citometría de masas. Diagrama representando los pasos implicados en el proceso de imagenología por citometría de masas, desde la tinción, ablación hasta la adquisición de los datos.

## Resultados

### Muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores

Se recolectaron 58 muestras de médula ósea de pacientes en cirugía de reemplazo de cadera. Las muestras pertenecen a pacientes hematológicamente sanos de edades entre 50 y 92 años, cuyos parámetros hematológicos se encuentran dentro de los rangos normales. Las muestras se dividieron en dos grupos de edad: adultos (50-64 años) y adultos mayores (65-92 años). En la tabla 8, se describen los valores absolutos promedio de las poblaciones hematopoyéticas presentes en sangre periférica, de ambos grupos de edad. A pesar de que ambos grupos presentaron valores en el rango normal, observamos que los adultos mayores en promedio presentan un mayor número total de células mieloides en sangre periférica, comparado con el grupo de adultos, de las cuales las poblaciones que se incrementan corresponden a neutrófilos y a monocitos. Por otro lado, el grupo de adultos mayores presenta una disminución en el número absoluto de linfocitos en sangre periférica, comparado con el grupo de adultos. Mientras que el número absoluto de eritrocitos, el porcentaje de hematocrito y las plaquetas no presentaron cambios en los grupos de edad.

Tabla 8. Parámetros de sangre periférica de pacientes hematológicamente sanos entre 50 y 92 años de edad.

Grupo de edad	Leucocitos $10^3/\mu\text{l}$	Células mieloides $10^3/\mu\text{l}$	Neutrófilos $10^3/\mu\text{l}$	Monocitos $10^3/\mu\text{l}$	Linfocitos $10^3/\mu\text{l}$	Eritrocitos $10^3/\mu\text{l}$	Hematocrito (%)	Plaquetas $10^3/\mu\text{l}$
50-64 años n=28	7.15±.59	4.92±.39	4.21±0.38	0.52±0.04	2.26±0.14	4.62±0.08	40.67±0.74	254.1±11.09
65-92 años n=30	8.36±.73	6.54±.55	5.70±0.53	0.64±0.04	1.78±0.13	4.55±0.09	41.16±0.80	274.6±15.37
Valores de P	P=0.21	<b>P=0.02</b>	<b>P=0.02</b>	<b>P=0.04</b>	<b>P=0.01</b>	P=0.58	P=0.66	P=0.28

### Frecuencia de poblaciones troncales y progenitoras hematopoyéticas y MSC en médula ósea de adultos y adultos mayores por citometría de flujo

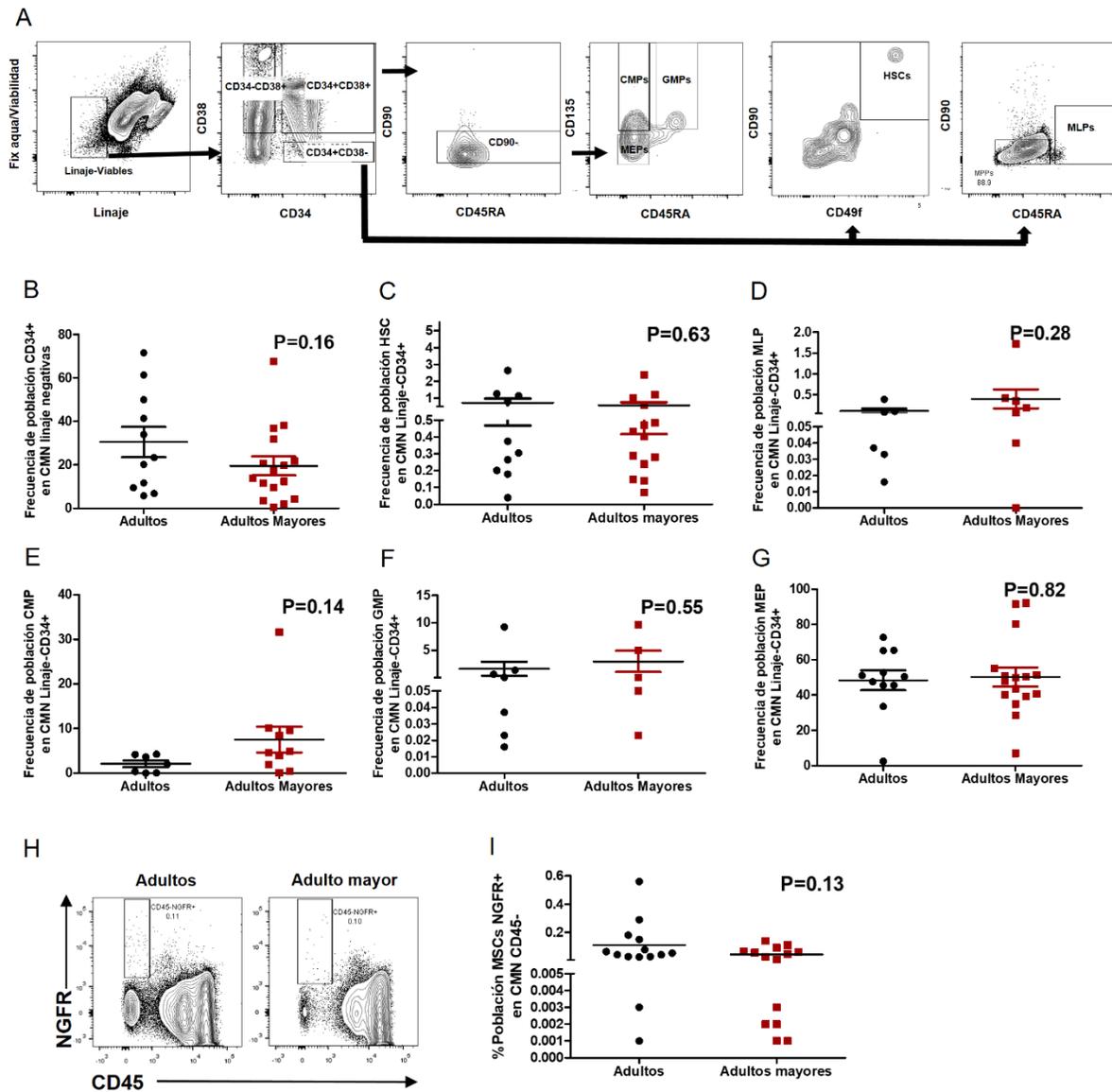
Se obtuvieron células mononucleares (CMN) a partir de las muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores, las cuales fueron teñidas con un panel de anticuerpos (Tabla 3), para evaluar por citometría de flujo las frecuencias de las siguientes poblaciones hematopoyéticas: HSPCs CD34+, HSC, progenitores mieloides-linfoideos (MLP), progenitores mieloides comunes (CMP), progenitores de granulocitos-monocitos (GMP) y progenitores de megacariocitos-eritroides (MEP). La estrategia de delimitación de

poblaciones se describe en la figura 7A. La frecuencia de la población total de HSPCs CD34+ (Linaje-CD34+) en CMN, no presentó diferencias entre el grupo de adultos y adultos mayores ( $30.51 \pm 6.92$  (n=11) vs  $19.48 \pm 4.34$  (n=16),  $P=0.16$ ) (Fig. 7B). Posteriormente, se evaluó la frecuencia de las poblaciones de troncales y progenitores hematopoyéticos a partir de la población CD34+, encontrándose que la frecuencia de la población de HSC (Linaje-CD34+CD38-CD90+CD49f+) no presentó diferencias en ambos grupos ( $0.72 \pm 0.25$  (n=10) vs  $0.58 \pm 0.16$  (n=14),  $P=0.63$ ) (Fig. 7C). En cuanto a la población de MLP (Linaje-CD34+CD38-CD90-CD45RA+), no se encontraron diferencias entre los grupos ( $0.08 \pm 0.05$  (n=6) vs  $0.20 \pm 0.12$  (n=7),  $P=0.28$ ) (Fig. 7D). Con respecto a los progenitores mieloides, tanto CMP (Linaje-CD34+CD38+CD90-CD135+CD45RA-) ( $2.08 \pm 0.74$  (n=7) vs  $7.56 \pm 2.90$  (n=10),  $P=0.14$ ) como GMP (Linaje-CD34+CD38+CD90-CD135+CD45RA+) ( $1.64 \pm 1.29$  (n=7) vs  $2.98 \pm 1.93$  (n=5),  $P=0.55$ ) no se encontraron diferencias entre los dos grupos (Fig. 7E-F). Por otro lado, la frecuencia de los progenitores MEP (Linaje-CD34+CD38+CD90-CD135-CD45RA-), tampoco presentaron diferencias en los grupos evaluados ( $48.39 \pm 5.67$  (n=11) vs  $50.22 \pm 5.53$  (n=16),  $P=0.82$ ) (Fig. 7G).

Debido a que las MSC han sido descritas como cruciales para la regulación de la hematopoyesis<sup>158</sup>, decidimos evaluar si había cambios en su frecuencia en ambos grupos de estudio, utilizando la población CD45-NGFR+. En la figura 7H, se muestran diagramas de puntos representativos de la población MSC CD45-NGFR+ delimitada a partir de CMN de adultos y adultos mayores. Se encontró que la población de MSC CD45-NGFR+ no presentó cambios en los dos grupos evaluados ( $0.11 \pm 0.04$  (n=14) vs  $0.04407 \pm 0.01225$  (n=14),  $P=0.13$ ) (Fig. 7I).

### Frecuencia y funcionalidad de progenitores hematopoyéticos y MSC en médula ósea de adultos y adultos mayores mediante ensayos de formación de colonia *in vitro*

Una vez que se observó que la frecuencia de HSPCs y de MSC por citometría de flujo no presentó diferencias en los dos grupos de estudio, decidimos evaluar la frecuencia de progenitores hematopoyéticos y de MSC mediante ensayos de colonia, los cuales además de arrojar la frecuencia, proporcionan información acerca de la funcionalidad de las poblaciones celulares evaluadas. La frecuencia de progenitores hematopoyéticos se evaluó mediante el ensayo de colonias de progenitores en metilcelulosa y las MSC mediante el ensayo de CFU-F. En la figura 8, se muestran imágenes representativas de las colonias

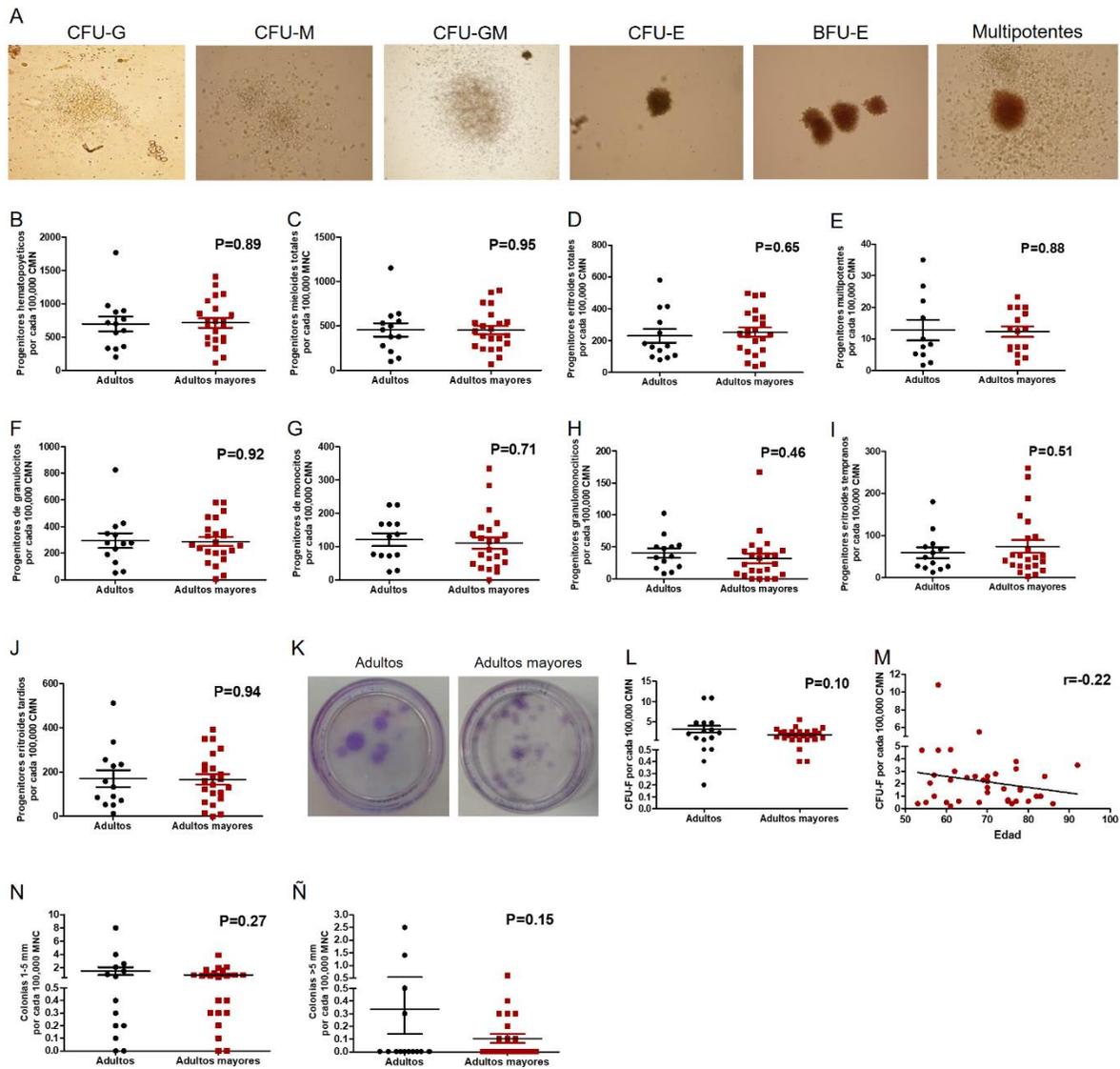


**Figura 7. Frecuencia de poblaciones hematopoyéticas y MSC en médula ósea de adultos y adultos mayores por citometría de flujo.** **A.** Estrategia de delimitación de poblaciones hematopoyéticas. HSCs se delimitaron con los marcadores Linaje-CD34+CD38-CD90+CD49f+; progenitores mieloides, GMP (Linaje-CD34+CD38+CD90-CD135+CD45RA-) y CMPs (Linaje-CD34+CD38+CD90-CD135+CD45RA-); MLP (Linaje-CD34+CD38-CD90-CD45RA+); y MEP (Linaje-CD34+CD38+CD90-CD135-CD45RA-). **B.** Gráfica mostrando la frecuencia de la población total de CD34+ a partir de CMN linaje negativas de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.16$ . **C.** Gráfica mostrando la frecuencia de la población de HSC a partir de la población linaje negativa CD34+. Prueba t no pareada,  $P=0.63$ . **D.** Gráfica mostrando la frecuencia de la población de MLP a partir de la población linaje negativa CD34+. Prueba t no pareada,  $P=0.28$ . **E.** Gráfica mostrando la frecuencia de la población de CMP a partir de la población linaje negativa CD34+. Prueba t no pareada,  $P=0.14$ . **F.** Gráfica mostrando la frecuencia de la población de GMP a partir de la población linaje negativa CD34+. Prueba t no pareada,  $P=0.55$ . **G.** Gráfica mostrando la frecuencia de la población de MEP a partir de la población linaje negativa CD34+. Prueba t no pareada,  $P=0.82$ . **H.** Plots representativos de la población de MSC CD45-NGFR+ en ambos grupos, tanto en adultos como adultos mayores. **I.** Gráfica mostrando la frecuencia de la población de MSC CD45-NGFR+ a partir de CMN de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.13$ .

de progenitores hematopoyéticos evaluados: unidad formadora de colonias de granulocitos (CFU-G), unidad formadora de colonias de monocitos (CFU-M), unidad formadora de colonias de granulocitos-monocitos (CFU-GM), unidad formadora de colonias eritroides tempranas (CFU-E), unidad formadora de colonias eritroides tardías (BFU-E) y unidad formadora de colonias multipotentes. En cuanto al número total de colonias de progenitores hematopoyéticos por cada 100,000 CMN, no se encontraron diferencias en los grupos de adultos y adultos mayores ( $696.4 \pm 112.2$  (n=13) vs  $712.9 \pm 73.42$  (n=22),  $P=0.89$ ) (Fig. 8B). Al evaluar la frecuencia de colonias de progenitores en mieloides totales ( $455.4 \pm 75.59$  (n=13) vs  $451.0 \pm 48.50$  (n=22),  $P=0.95$ ) eritroides totales ( $230.2 \pm 43.13$  (n=13) vs  $230.2 \pm 43.13$  (n=13),  $P=0.65$ ) y multipotentes ( $12.79 \pm 3.287$  (n=11) vs  $12.30 \pm 1.666$  (n=16),  $P=0.88$ ) no se encontraron diferencias en adultos y adultos mayores, respectivamente (Fig. 8C-E). Al evaluar las colonias de progenitores específicos de linaje mieloides, se encontró que presentaron frecuencias similares en ambos grupos, tanto de progenitores de granulocitos ( $294.6 \pm 54.86$  (n=13) vs  $289.1 \pm 33.37$  (n=23),  $P=0.92$ ); progenitores de monocitos ( $120.6 \pm 18.82$  (n=13) vs  $110.8 \pm 17.18$  (n=23),  $P=0.71$ ); y progenitores de granulocitos-monocitos ( $40.20 \pm 7.303$  (n=13) vs  $31.74 \pm 7.529$  (n=23),  $P=0.46$ ) (Fig. 8F-H). Con respecto a los progenitores específicos de linaje eritroide, tampoco se observaron diferencias en su frecuencia en ambos grupos de estudio, progenitores eritroides tempranos ( $59.22 \pm 12.99$  (n=13) vs  $74.03 \pm 15.09$  (n=23),  $P=0.51$ ) y progenitores eritroides tardíos ( $171.0 \pm 39.00$  (n=13) vs  $168.0 \pm 23.56$  (n=23),  $P=0.94$ ) (Fig. 8I-J).

El ensayo de CFU-F nos permite evaluar la frecuencia de MSC con capacidad de formar colonias, con lo cual se evalúa su frecuencia en la muestra y su funcionalidad. En la figura 8K, se observan imágenes representativas del ensayo de CFU-F, mostrando colonias de fibroblastos teñidas con Wright-Giemsa tanto de adultos como de adultos mayores. Al evaluar su frecuencia por cada 100,000 CMN, se observó una tendencia a ser menor en el grupo de adultos mayores, la cual no alcanzó diferencia estadísticamente significativa ( $3.131 \pm 0.8470$  (n=16) vs  $1.884 \pm 0.2551$  (n=25),  $P=0.10$ ,  $f$  test  $P < 0.0001$ ) (Fig. 8L). Con respecto a la observación de la tendencia a disminuir en el grupo de adultos mayores, se evaluó si existía una correlación entre la edad y el número de colonias, encontrando una correlación negativa débil de  $r=-0.22$  (n=41) (Fig. 8M). Por lo que concluimos que la frecuencia de CFU-F no presenta cambios asociados al envejecimiento. Posteriormente decidimos evaluar si existían diferencias en el tamaño de las colonias derivadas de adultos y adultos mayores, clasificándolas en colonias de tamaño de 1 a 5 mm y mayor a 5 mm. Se observó que el tamaño de las colonias no presenta diferencias entre los dos grupos, en

colonias de 1-5 mm ( $1.51 \pm 0.59$  (n=14) vs  $0.92 \pm 0.19$  (n=22),  $P=0.27$ ) y colonias mayores a 5 mm ( $0.34 \pm 0.20$  (n=14) vs  $0.10 \pm 0.035$  (n=23),  $P=0.15$ ) (Fig. 8N-Ñ).



**Figura 8. Frecuencia de progenitores hematopoyéticos y MSC *in vitro* a partir de CMN de médula ósea de adultos y adultos mayores.** **A.** Imágenes representativas de colonias de progenitores hematopoyéticos en metilcelulosa, de izquierda a derecha: CFU-G, CFU-M, CFU-GM, CFU-E, BFU-E y colonias multipotentes de CMN derivadas de médula ósea de adulto. **B.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores hematopoyéticos totales por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.89$ . **C.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores hematopoyéticos mieloides totales por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.95$ . **D.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores hematopoyéticos eritroides totales por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.65$ . **E.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores hematopoyéticos multipotentes por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.88$ . **F.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores de granulocitos por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.92$ . **G.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores de monocitos por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.71$ . **H.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores de granulomonocitos por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos

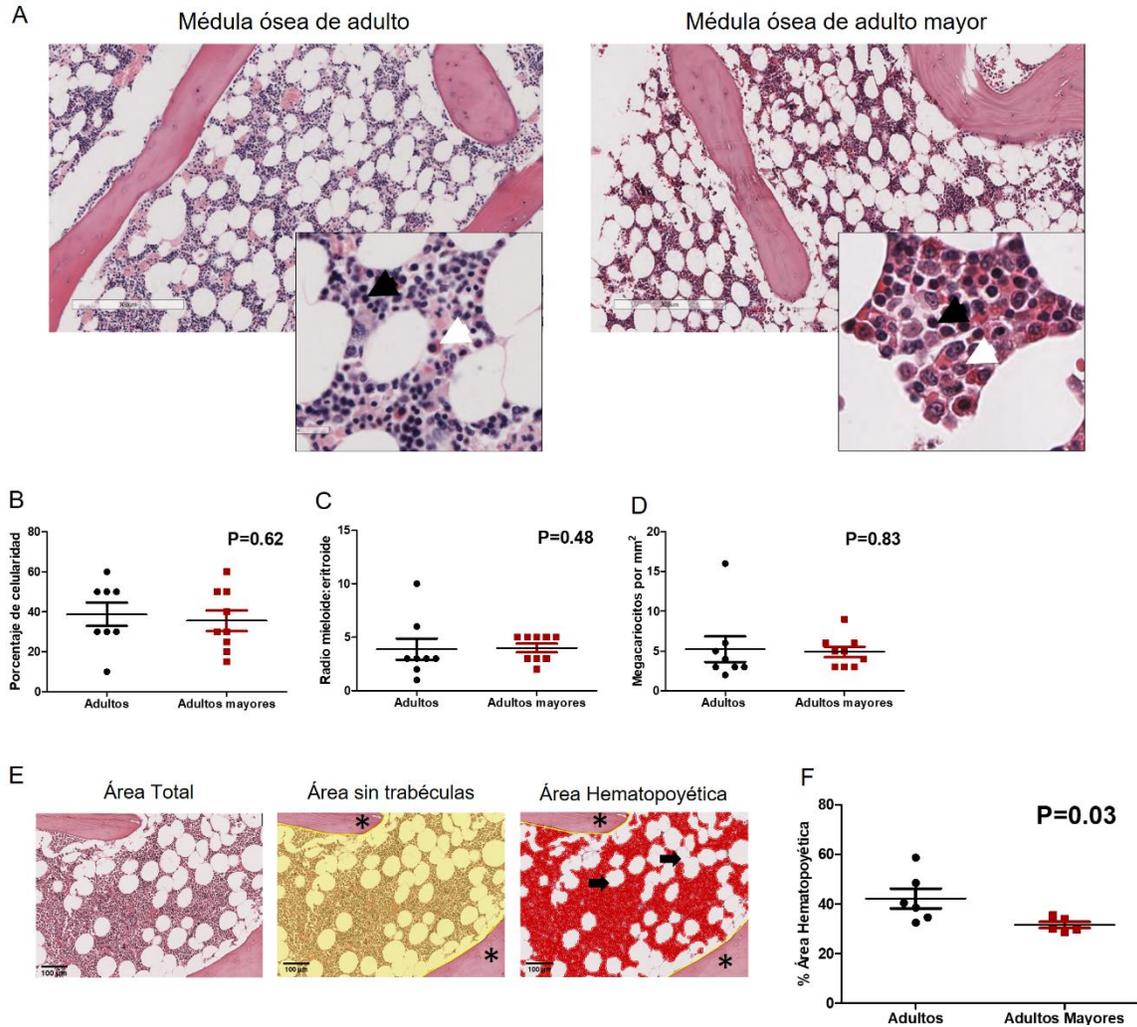
mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.46$ . **I.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores de eritroides tempranos por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.51$ . **J.** Gráfica mostrando la frecuencia de colonias de progenitores de eritroides tardíos por cada 100,000 CMN, en muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.94$ . **K.** Imágenes representativas del ensayo de CFU-F, mostrando colonias de fibroblastos teñidas con Wright-Giemsa. Se muestran colonias derivadas de CMN de adultos y adultos mayores. **L.** Gráfica mostrando la frecuencia de CFU-F por cada 100,000 CMN obtenidas a partir de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.10$ . **M.** Gráfica de correlación entre la frecuencia de CFU-F por cada 100,000 CMN y la edad de las muestras. Correlación de Pearson,  $r=-0.22$ . **N.** Gráfica mostrando la frecuencia de CFU-F de tamaño 1-5 mm por cada 100,000 CMN obtenidas a partir de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.27$ . **Ñ.** Gráfica mostrando la frecuencia de CFU-F de tamaño 1-5 mm por cada 100,000 CMN obtenidas a partir de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.15$ .

## Biopsias de médula ósea obtenidas de adultos y adultos mayores

Las biopsias de médula ósea se obtuvieron a partir de cabezas femorales recolectadas durante la cirugía de reemplazo de cadera. En total se recolectaron 58 cabezas femorales de pacientes no oncológicos y hematológicamente sanos.

## Evaluación histopatológica y selección de muestras funcionales

Las biopsias de médula ósea fueron teñidas con hematoxilina-eosina y evaluadas por dos histopatólogos independientes. Los criterios para clasificar una muestra como funcional fueron los siguientes: presencia de tejido hematopoyético, con un mínimo de tres celdillas conservadas y la ausencia de células displásicas correspondientes a alguno de los linajes hematopoyéticos. Después de la evaluación, el 75% de las biopsias fueron descartadas debido a ausencia de material hematopoyético y presencia de displasia de alguno de los linajes hematopoyéticos, solo 14 muestras (7 por grupo) fueron funcionales para el estudio. Posteriormente a las muestras funcionales se les realizó una evaluación cualitativa del porcentaje de celularidad, radio mielóide:eritroide y número de megacariocitos por  $\text{mm}^2$ . En la figura 9A, se muestran microfotografías representativas de tinciones H&E de médula ósea de adulto y de adulto mayor, en el acercamiento se señalan células del linaje mielóide y eritroide. Al evaluar el porcentaje de celularidad, no se encontraron diferencias entre el grupo de adultos y adultos mayores ( $P=0.62$ ) (Fig. 9B). Asimismo, al comparar el radio mielóide:eritroide ( $P=0.90$ ) y el número de megacariocitos por  $\text{mm}^2$  (0.83) no se observaron diferencias entre los dos grupos (Fig. 9C-D).



**Figura 9. Comparación histológica entre biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.** **A.** Microfotografías representativas de biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores. En las imágenes de acercamiento, se señalan células del linaje eritroide (cabeza de flecha negra) y linaje mieloide (cabeza de flecha blanca). **B.** Gráfica mostrando el porcentaje de celularidad obtenido mediante evaluación cualitativa de biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba Mann-Whitney no paramétrica,  $P=0.62$ . **C.** Gráfica mostrando el radio mieloide:eritroide obtenido mediante evaluación cualitativa de biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba Mann-Whitney no paramétrica,  $P=0.48$ . **D.** Gráfica mostrando el número de megacariocitos por  $\text{mm}^2$  obtenido mediante evaluación cualitativa de biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores. Prueba Mann-Whitney no paramétrica,  $P=0.48$ . **E.** Imágenes representativas de una tinción de H&E de médula ósea de adultos (Área total) y la cuantificación de las áreas sin trabéculas y hematopoyética. El área sin trabéculas (área amarilla) excluye las trabéculas (\*). El área hematopoyética (área roja) excluye trabéculas (\*) y adipocitos (flecha). **F.** Gráfica mostrando el porcentaje de área hematopoyética de médula ósea de ambos grupos de estudio. Prueba t no pareada,  $P=0.03$ .

Posteriormente, se realizó una evaluación cuantitativa del porcentaje de celularidad de las biopsias de médula ósea utilizando un software de análisis de imagen. Para esto, se definieron dos regiones en la médula ósea: área sin trabéculas, la cual excluye artefactos y trabéculas (Fig. 9E, panel central); y área hematopoyética, en la cual se excluyen el área de las trabéculas y los adipocitos, y es identificada con la tinción de hematoxilina (Fig. 9E,

panel izquierdo). Se encontró que en el grupo de adultos mayores la celularidad disminuye con respecto al grupo de adultos ( $45.31 \pm 4.58$  (n=7) vs  $31.56 \pm 1.29$  (n=5),  $P=0.03$ ), en contraste con lo obtenido mediante la evaluación cualitativa (Fig. 9F).

### Evaluación *in situ* de la densidad de poblaciones hematopoyéticas en médula ósea de adultos y adultos mayores

La evaluación de la frecuencia de progenitores hematopoyéticos mediante citometría de flujo y ensayos de colonias *in vitro* arrojó que no existen diferencias entre el grupo de adultos y adultos mayores. Sin embargo, existen diferentes variables que pueden influir en el resultado tales como la viabilidad celular, los anticuerpos fluorescentes utilizados o incluso la forma de obtención de la muestra. Por esta razón, decidimos evaluar *in situ* la densidad de las poblaciones hematopoyéticas residentes de médula ósea. Para lo cual, se tiñeron las biopsias de médula ósea, mediante inmunohistoquímica, para detectar las siguientes poblaciones: HSPCs (CD34+), progenitores eritroides tempranos (progenitores E-caderina+), progenitores linfoides B (Pax5+), células mieloides en maduración (células MPO+), linfocitos T (CD3), linfocitos B (CD20) y megacariocitos (CD31+). En la figura 10A, se muestran imágenes representativas de las tinciones tanto en adultos como adultos mayores. Asimismo, se muestra la imagen digitalizada utilizada para cuantificar el área positiva para cada marcador. Para evaluar la densidad de la población de HSPCs CD34+ se obtuvo el porcentaje de células positivas con respecto al total de núcleos en el área hematopoyética. Al comparar la densidad de HSPCs CD34+ no se observaron diferencias entre los dos grupos ( $1.13 \pm 0.14$  (n=6) vs  $1.94 \pm 0.58$  (n=4),  $P=0.13$ ) (Fig. 10B). Sin embargo, se observó en el grupo de adultos mayores una tendencia a una mayor densidad de HSPCs CD34+, por lo cual, se evaluó si existía correlación entre la edad y la densidad de HSPCs CD34+. De forma interesante, se observó una correlación positiva fuerte ( $r=0.71$ ,  $n=10$ ), indicando que la densidad de HSPCs CD34+ aumenta con la edad (Fig. 10C). Al evaluar la densidad de las poblaciones de progenitores tanto eritroides ( $5.61 \pm 1.75$  (n=5) vs  $5.86 \pm 1.06$  (n=6),  $P=0.90$ ) como linfoides B ( $5.47 \pm 2.21$  (n=6) vs  $6.32 \pm 1.48$  (n=5),  $P=0.76$ ) no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 10D-E).

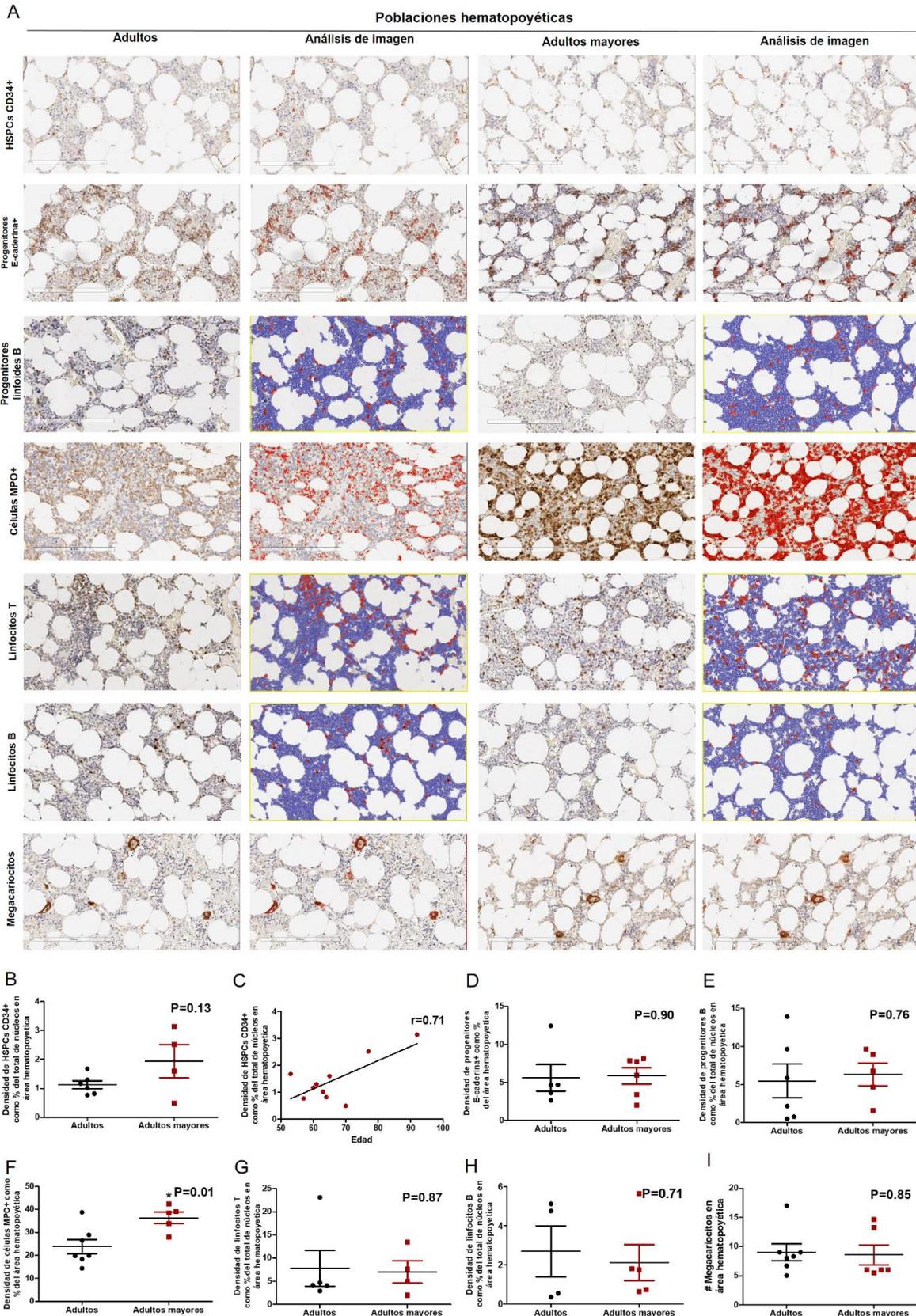


Figura 10. Cuantificación de la densidad de poblaciones hematopoyéticas *in situ* en biopsias de médula

**ósea de adultos y adultos mayores. A.** Imágenes representativas de IHQ de HSPCs CD34+, progenitores eritroides, progenitores linfoides B, células MPO+, linfocitos T, linfocitos B y megacariocitos en biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos. Cada imagen está acompañada de la imagen digitalizada creada por el software de análisis de imagen. La cuantificación de progenitores linfoides B, linfocitos T y B se utilizó el software Qupath, las demás poblaciones fueron analizadas usando CellProfiler. Escala=200  $\mu$ m. **B.** Gráfica mostrando la densidad de HSPCs CD34+ calculada como porcentaje del total de núcleos en el área hematopoyética, en ambos grupos de estudio. Prueba t no pareada, P=0.13. **C.** Gráfica de correlación positiva entre la densidad de HSPCs CD34+ y la edad. Correlación de Pearson, r=0.71. **D.** Gráfica mostrando la densidad de progenitores E-caderina+ como porcentaje del área hematopoyética. Prueba t no pareada, P=0.90. **E.** Gráfica mostrando la densidad de progenitores B calculada como porcentaje del total de núcleos en el área hematopoyética, en ambos grupos de estudio. Prueba t no pareada, P=0.76. **F.** Gráfica mostrando la densidad de células MPO+ como porcentaje del área hematopoyética. Prueba t no pareada, \*P=0.01. **G.** Gráfica mostrando la densidad de linfocitos T calculada como porcentaje del total de núcleos en el área hematopoyética, en ambos grupos de estudio. Prueba t no pareada, P=0.87. **H.** Gráfica mostrando la densidad de linfocitos B calculada como porcentaje del total de núcleos en el área hematopoyética, en ambos grupos de estudio. Prueba t no pareada, P=0.87. **I.** Gráfica mostrando el número de megacariocitos por área hematopoyética. Prueba t no pareada, P=0.85. Tinción DAB; contratinción hematoxilina. Aumento 20X.

Al realizar la evaluación de las densidades de poblaciones hematopoyéticas maduras, se observó que la población de células MPO+ aumenta significativamente en el grupo de adultos mayores ( $23.80 \pm 3.10$  (n=7) vs  $36.31 \pm 2.53$  (n=5), P=0.01) (Fig. 10F). En cuanto a las poblaciones de linfocitos T ( $7.79 \pm 3.84$  (n=5) vs  $7.01 \pm 2.42$  (n=4), P=0.87), linfocitos B ( $2.69 \pm 1.3$  (n=4) vs  $2.11 \pm 0.92$  (n=5), P=0.71) y megacariocitos ( $9 \pm 1.44$  (n=7) vs  $8.57 \pm 1.71$  (n=6), P=0.85) no se observaron diferencias en los dos grupos de estudio (Fig. 10G-I).

### Evaluación *in situ* de la densidad de poblaciones estromales en médula ósea de adultos y adultos mayores

Puesto que se ha reportado el papel fundamental que tienen las poblaciones estromales residentes de médula ósea en la regulación de la hematopoyesis, se cuantificaron las densidades de éstas en médula ósea de adultos y adultos mayores. Las poblaciones estromales evaluadas fueron las siguientes: MSC (NGFR), adipocitos (Perilipina), macrófagos (CD163), monocitos-macrófagos (CD68), arterias y capilares ( $\alpha$ -SMA) y osteoblastos (osteocalcina). En la figura 11A, se muestran imágenes representativas de las tinciones, en médula ósea de adultos y adultos mayores, cada imagen está acompañada de la imagen digitalizada utilizada para realizar la cuantificación. La determinación del área positiva para adipocitos se calculó con respecto al área sin trabéculas, las poblaciones de MSC, macrófagos, monocitos-macrófagos y arterias y capilares fueron calculadas con respecto al área hematopoyética. Con respecto a los osteoblastos, debido a que la mayoría de las trabéculas se dañaron o perdieron debido al procesamiento de la muestra, se procedió a cuantificar el número de trabéculas por área total en campo de aumento 5X. De acuerdo con los resultados obtenidos por citometría de flujo y ensayos de colonias *in vitro*, la densidad de MSC no presentó cambios en los dos grupos ( $23.64 \pm 1.62$  (n=7) vs  $19.47 \pm$

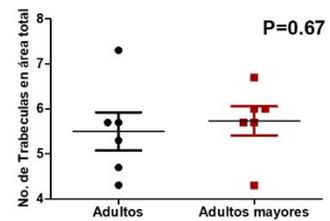
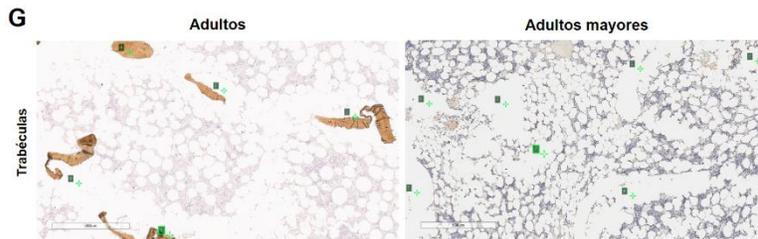
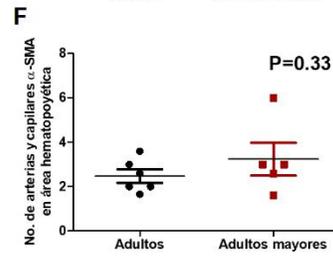
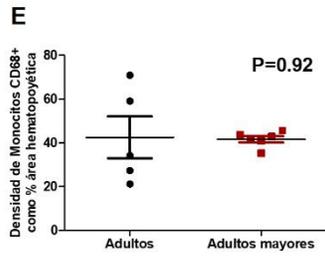
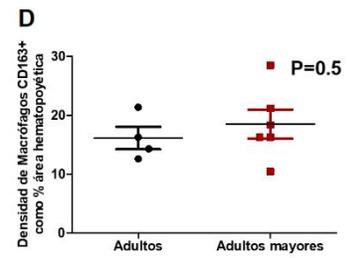
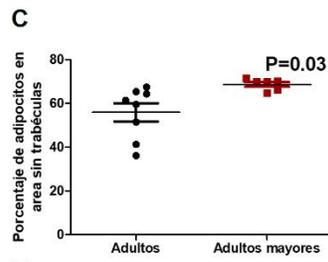
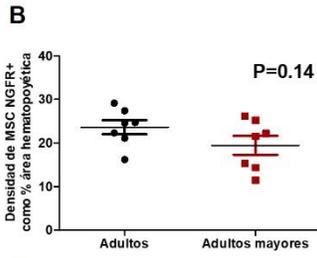
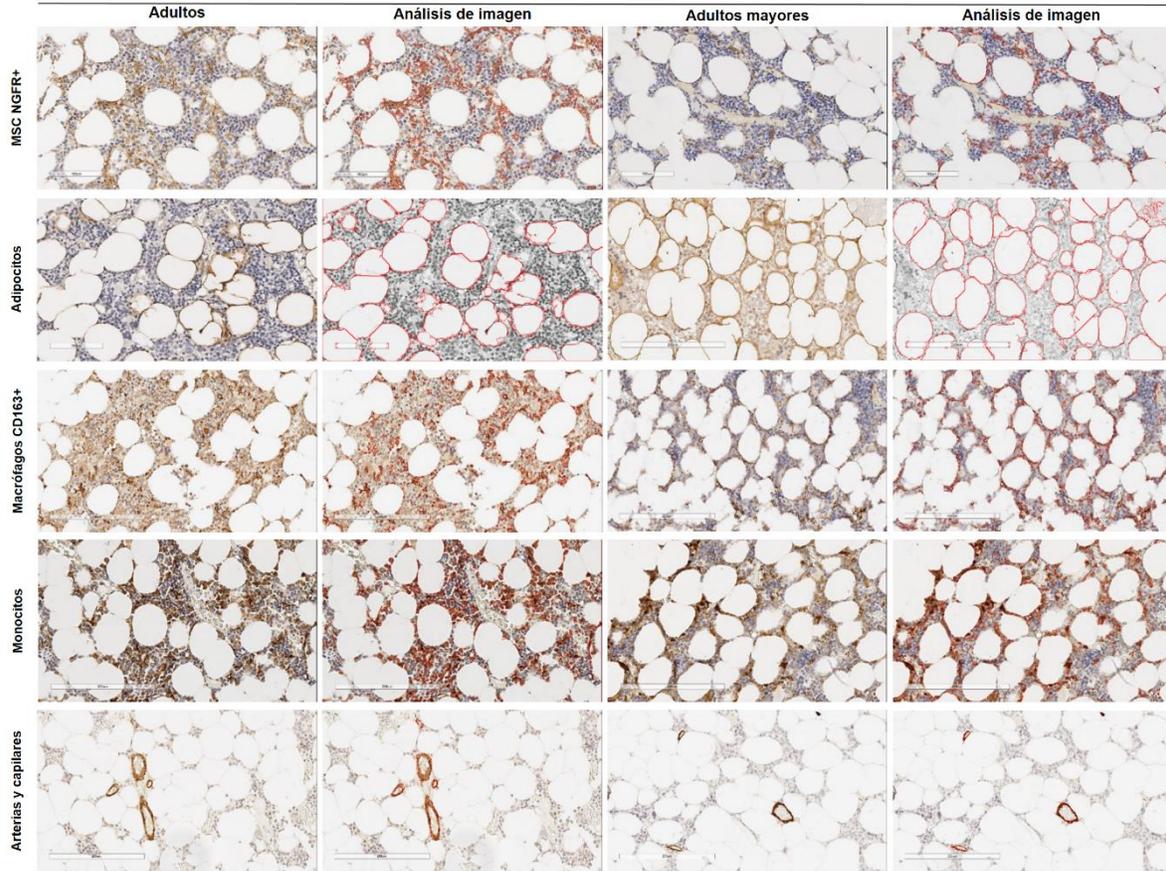
2.17 (n=7), P=0.14) (Fig. 11B). Acorde con los resultados obtenidos con respecto a la disminución en la celularidad en el grupo de adultos mayores, la densidad de adipocitos en el área sin trabéculas aumentó significativamente comparado con el grupo de adultos ( $55.90 \pm 4.14$  (n=8) vs  $68.66 \pm 1.09$  (n=6), P=0.03) (Fig. 11C). En lo que se refiere a la densidad de macrófagos ( $16.15 \pm 1.91$  (n=4) vs  $18.52 \pm 2.46$  (n=6), P=0.5), monocitos-macrófagos ( $42.56 \pm 9.57$  (n=5) vs  $41.66 \pm 1.45$  (n=6), P=0.92) y arterias y capilares ( $2.48 \pm 0.30$  (n=6) vs  $3.24 \pm 0.74$  (n=5), P=0.33), no se observaron diferencias entre los dos grupos (Fig. 11D-E). Con respecto al número de trabéculas, en la figura 11G se muestran imágenes representativas del conteo de trabéculas por campo de aumento 5X en biopsias de médula ósea de adulto y adulto mayor. Asimismo, no se observaron diferencias entre los grupos de adultos y adultos mayores ( $5.50 \pm 0.43$  (n=6) vs  $5.73 \pm 0.32$  (n=6), P=0.67) (Fig. 11G).

### Evaluación de la asociación entre densidades de poblaciones hematopoyéticas y estromales en médula ósea

Después de observar que las densidades de las poblaciones de adipocitos, HSPCs CD34+ y células MPO+ aumentan con el envejecimiento, y corresponden a una población estromal y dos poblaciones hematopoyéticas, decidimos evaluar si la densidad de adipocitos tenía efecto sobre la densidad de HSPCs CD34+ y células MPO+. Encontramos una correlación positiva entre la densidad de adipocitos y HSPCs CD34+ ( $r=0.56$ , n=10) (Fig. 12A). Al evaluar la asociación entre la densidad de adipocitos y la densidad de células MPO+, encontramos una correlación positiva débil ( $r=0.31$ , n=12) (Fig. 12B). Por otro lado, evaluamos si la densidad de adipocitos se asociaba con la densidad de progenitores E-caderina+, esto debido a reportes previos que indican que la población de adipocitos representa el nicho de las células mieloides y eritroides<sup>90</sup>. Al igual que con la población de linaje mieloides, encontramos una correlación positiva débil entre la densidad de adipocitos y la de progenitores E-caderina+ ( $r=0.31$ , n=10) (Fig. 12C).

A

Poblaciones estromales



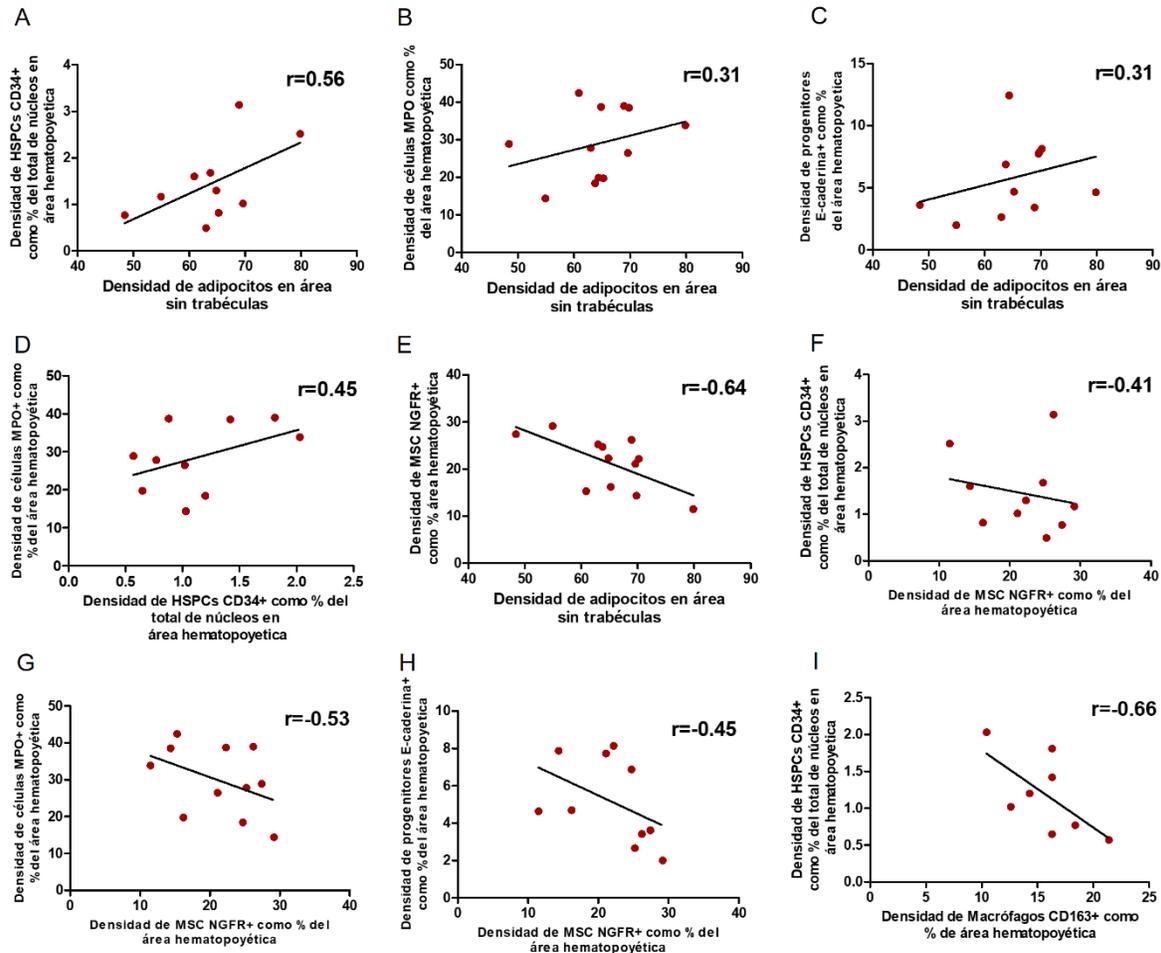
**Figura 11. Cuantificación de la densidad *in situ* de poblaciones estromales residentes en médula ósea en biopsias de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.** **A.** Imágenes representativas de IHQ de MSC NGFR+, adipocitos, macrófagos CD163+, monocitos-macrófagos CD68+ y arterias y capilares  $\alpha$ SMA+ en biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores. Cada imagen está acompañada de la imagen digitalizada creada por el software de análisis de imagen CellProfiler. Escala=200  $\mu$ m. **B.** Gráfica mostrando la densidad de MSC NGFR+ como porcentaje del área hematopoyética. Prueba t no pareada, P=0.14. **C.** Gráfica mostrando la densidad de adipocitos como porcentaje del área total sin trabéculas. Prueba t no pareada, \*P=0.03. **D.** Gráfica mostrando la densidad de macrófagos CD163+ como porcentaje del área hematopoyética. Prueba t no pareada, P=0.5. **E.** Gráfica mostrando la densidad de monocitos-macrófagos CD68+ como porcentaje del área hematopoyética. Prueba t no pareada, P=0.92. **F.** Gráfica mostrando el número de arterias y capilares  $\alpha$ SMA+ en el área hematopoyética. Prueba t no pareada, P=0.33. **G.** Imágenes representativas de cuantificación de trabéculas en áreas de aumento 5X, realizada con ImageScope en ambos grupos de estudio. Gráfica mostrando el número de trabéculas de ambos grupos de estudio. Prueba t no pareada, P=0.67. Tinción DAB; contratinción hematoxilina. Aumento 20X.

Después, evaluamos si el aumento en la densidad de HSPCs CD34+ se asociaba directamente con el aumento en la densidad del linaje mieloide, observando una correlación positiva entre ambas poblaciones ( $r=0.45$ ), lo cual podría indicar un aumento en la diferenciación mieloide por parte de las HSPCs CD34+ (Fig. 12D).

Debido a que se ha reportado que las MSC son la población celular precursora de los adipocitos, evaluamos si el incremento asociado al envejecimiento en la densidad de adipocitos, tenía efecto sobre la densidad de MSC. Se encontró que las densidades de ambas poblaciones presentan una correlación negativa fuerte ( $r=-0.64$ ,  $n=12$ ), indicando que a medida que aumenta la población de adipocitos disminuye la población de MSC, comprobando la asociación directa que existe entre estas poblaciones (Fig. 12E). En consecuencia, evaluamos si hay asociación entre las MSC y las poblaciones hematopoyéticas HSPCs CD34+, células MPO+ y progenitores E-caderina+. De forma interesante, encontramos un patrón similar con respecto a su asociación con adipocitos, asociándose negativamente con las tres poblaciones: HSPCs CD34+ ( $r=-0.41$ ,  $n=10$ ), células MPO+ ( $r=-0.53$ ,  $n=11$ ) y progenitores E-caderina+ ( $r=-0.45$ ,  $n=10$ ) (Fig. 12F-H).

La regulación de la hematopoyesis ha sido descrita como un proceso complejo y que involucra a diversas poblaciones estromales residentes de médula ósea, por lo cual, evaluamos si además de la población de adipocitos, otras poblaciones estromales pudiesen estar asociadas al aumento en la densidad de las poblaciones de HSPCs CD34+ y células MPO+. Al analizar la población de macrófagos CD163+, encontramos que su densidad

presenta una correlación negativa fuerte ( $r=-0.66$ ,  $n=10$ ) con la densidad de la población HSPCs CD34+ (Fig. 12I).

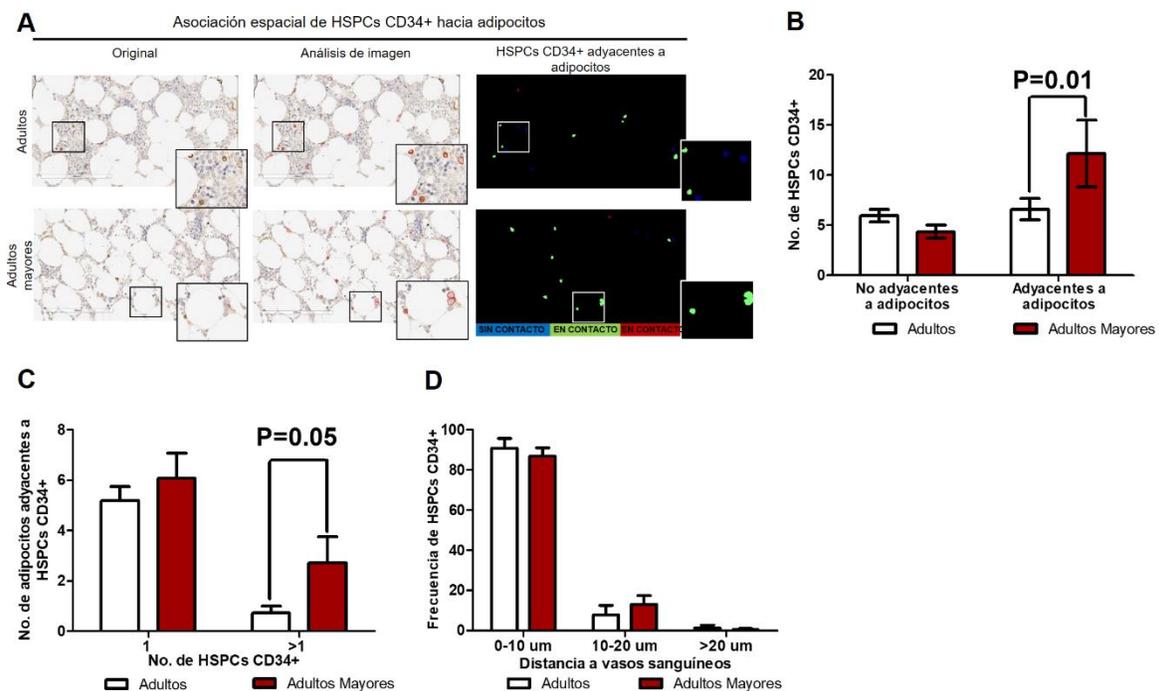


**Figura 12. Asociación por densidad *in situ* entre las poblaciones hematopoyéticas y estromales de médula ósea de adultos y adultos mayores.** **A.** Correlación positiva entre las densidades de HSPCs CD34+ y adipocitos. Correlación de Pearson,  $r=0.56$ . **B.** Correlación positiva baja entre las densidades de células MPO+ y adipocitos. Correlación de Pearson,  $r=0.31$ . **C.** Correlación positiva baja entre las densidades de progenitores E-caderina+ y adipocitos. Correlación de Pearson,  $r=0.31$ . **D.** Correlación positiva entre las densidades de células MPO+ y HSPCs CD34+. Correlación de Pearson,  $r=0.45$ . **E.** Correlación negativa entre las densidades de MSC NGFR+ y adipocitos. Correlación de Pearson,  $r=-0.64$ . **F.** Correlación negativa entre las densidades de MSC NGFR+ y HSPCs CD34+. Correlación de Pearson,  $r=-0.41$ . **G.** Correlación negativa entre las densidades de MSC NGFR+ y células MPO+. Correlación de Pearson,  $r=-0.53$ . **H.** Correlación negativa entre las densidades de MSC NGFR+ y progenitores E-caderina+. Correlación de Pearson,  $r=-0.45$ . **I.** Correlación negativa entre las densidades de macrófagos CD163+ y HSPCs CD34+. Correlación de Pearson,  $r=-0.66$ .

### Evaluación de la asociación *in situ* entre la población de adipocitos y las poblaciones hematopoyéticas de HSPCs CD34+ y células MPO+

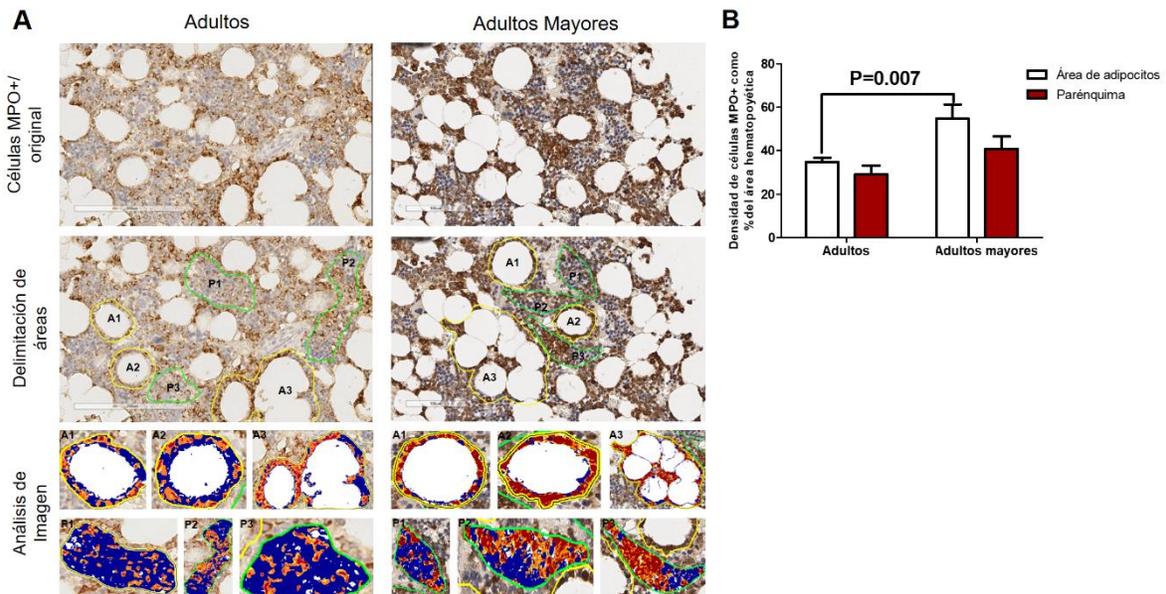
Una vez observada la asociación positiva entre las densidades de adipocitos y HSPCs CD34+, evaluamos si ambas poblaciones se asocian *in situ*. Utilizando el análisis de células

adyacentes en CellProfiler (Neighbor, por su traducción en inglés), se determinó el número de HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos, utilizando imágenes de muestras de médula ósea teñidas para CD34 de ambos grupos de estudio. En la figura 13A, se muestran imágenes representativas del análisis de Neighbor. De forma interesante, se encontró que el número de HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos, es significativamente mayor en el grupo de adultos mayores ( $P=0.01$ ) (Fig. 13B). Asimismo, evaluamos si el número de HSPCs CD34+ adyacentes a un solo adipocito aumentaba en el grupo de adultos mayores, observando que éste aumenta también ( $P=0.05$ ) (Fig. 13C). Debido a que se ha reportado que las HSPCs CD34+ se localizan cerca de los sinusoides, evaluamos si el aumento en la adyacencia de las HSPCs CD34+ a los adipocitos modificaba su localización perivascular. Encontrando que aunque aumentan su asociación con los adipocitos, las HSPCs CD34+ mantienen su localización perivascular, localizándose más del 80% de éstas a una distancia entre 0-10  $\mu\text{m}$  de distancia de los sinusoides (Fig. 13D).



**Figura 13. Asociación *in situ* entre HSPCs CD34+ y adipocitos en médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.** **A.** Imágenes representativas de HSPCs CD34+ asociadas espacialmente con adipocitos en médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos. De izquierda a derecha, imagen de IHQ de HSPCs CD34+ (original), imagen de detección de objetos CD34+ (análisis de imagen) e imagen digitalizada mostrando células inmediatamente adyacentes (verde y rojo) y no adyacentes (azul). **B.** Gráfica de barras mostrando el número de HSPCs CD34+ inmediatamente adyacentes y no adyacentes a adipocitos. Anova de dos vías  $P=0.01$ . Prueba t no pareada en inmediatamente adyacentes,  $P=0.01$ . **C.** Gráfica de barras mostrando el número de adipocitos inmediatamente adyacentes a 1 o >1 HSPCs CD34+. Anova de dos vías,  $P=0.052$ , prueba t no pareada, en ambos grupos de >1,  $P=0.05$ . **D.** Gráfica de barras mostrando la distancia entre HSPCs CD34+ hacia vasos sanguíneos. La grafica presenta el porcentaje de HSPCs CD34+ a una distancia de 0-10 $\mu\text{m}$ , 10-20 $\mu\text{m}$  and >20 $\mu\text{m}$  hacia los vasos. Anova de dos vías,  $P=0.27$ .

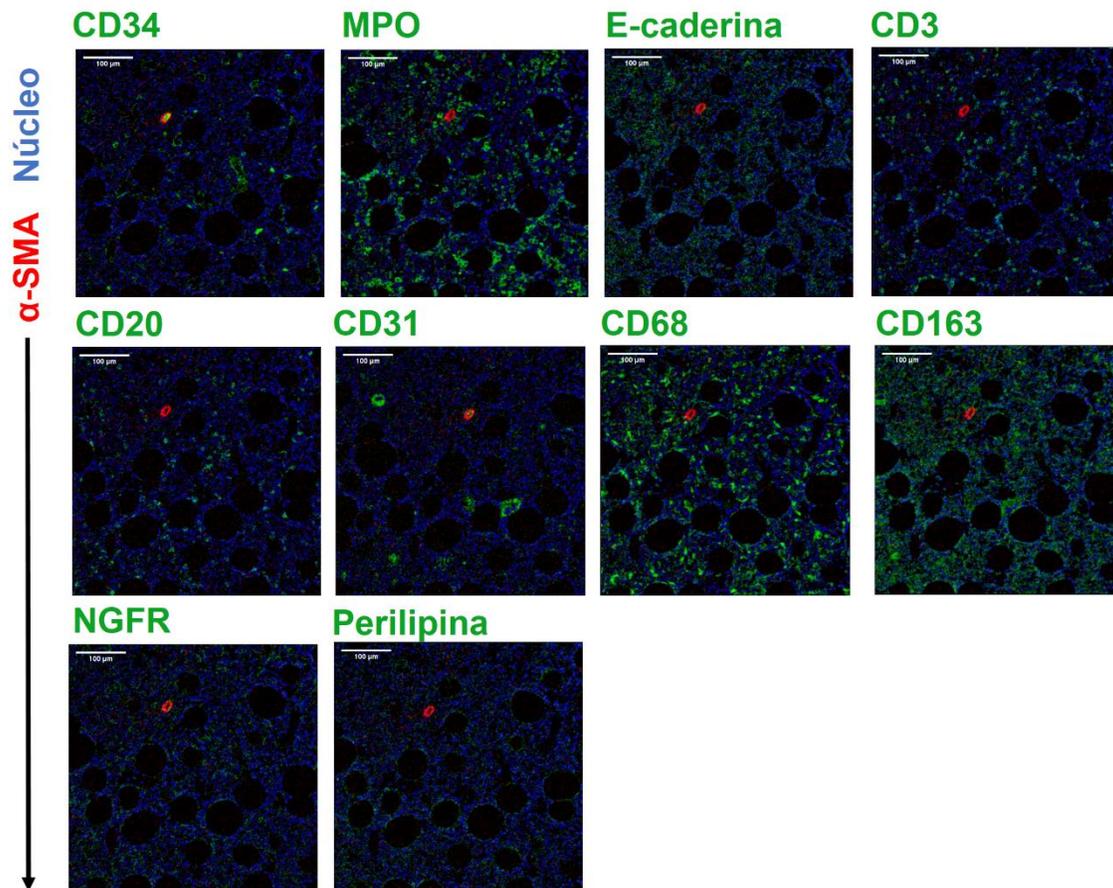
Después de determinar que las HSPCs CD34+ aumentan su asociación *in situ* con los adipocitos, evaluamos si la población de células mieloides se localizaba preferentemente cerca de los adipocitos. Se analizó la densidad de células MPO+ en dos áreas hematopoyéticas de la médula ósea: áreas hematopoyéticas rodeando a los adipocitos (una célula de distancia de la membrana de los adipocitos) y en el parénquima (por lo menos dos células de distancia de la membrana de los adipocitos) (Fig. 14A, panel central). Utilizando el software de análisis de imagen ImageScope, se cuantificó la densidad de células MPO+ en las zonas mencionadas anteriormente (Fig. 14A, panel de abajo). Las células MPO+ se distribuyen de forma similar en ambas áreas hematopoyéticas en los dos grupos de estudio (Fig. 14B). Sin embargo, se encontró un aumento en la densidad de células MPO+ en las áreas rodeando a los adipocitos en el grupo de adultos mayores, en comparación con el grupo de adultos ( $P=0.007$ ) (Fig. 14B). Esa diferencia no fue observada cuando se comparó la densidad de las células MPO+ en el área del parénquima de ambos grupos, lo cual sugiere que el incremento asociado al envejecimiento, en la densidad de células mieloides, ocurre en las áreas hematopoyéticas cercanas a los adipocitos.



**Figura 14. Asociación *in situ* entre las células MPO+ y los adipocitos en médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.** **A.** Imágenes representativas de células MPO+ (original) en médula ósea de adultos y adultos mayores (panel superior). La delimitación del área de adipocitos (A) y el parénquima (P) para la cuantificación por análisis de imagen (panel central). Análisis de imagen de A y P, mostrando áreas positivas (amarillo a rojo) y áreas negativas (azul) (panel inferior). Barra de escala= 200  $\mu$ m. **B.** Gráfica de barras mostrando la densidad de células MPO+ en el área de adipocitos y el parénquima en adultos y adultos mayores. Anova de dos vías,  $P=0.002$ . Prueba t no pareada, área de adipocitos,  $P=0.007$ .

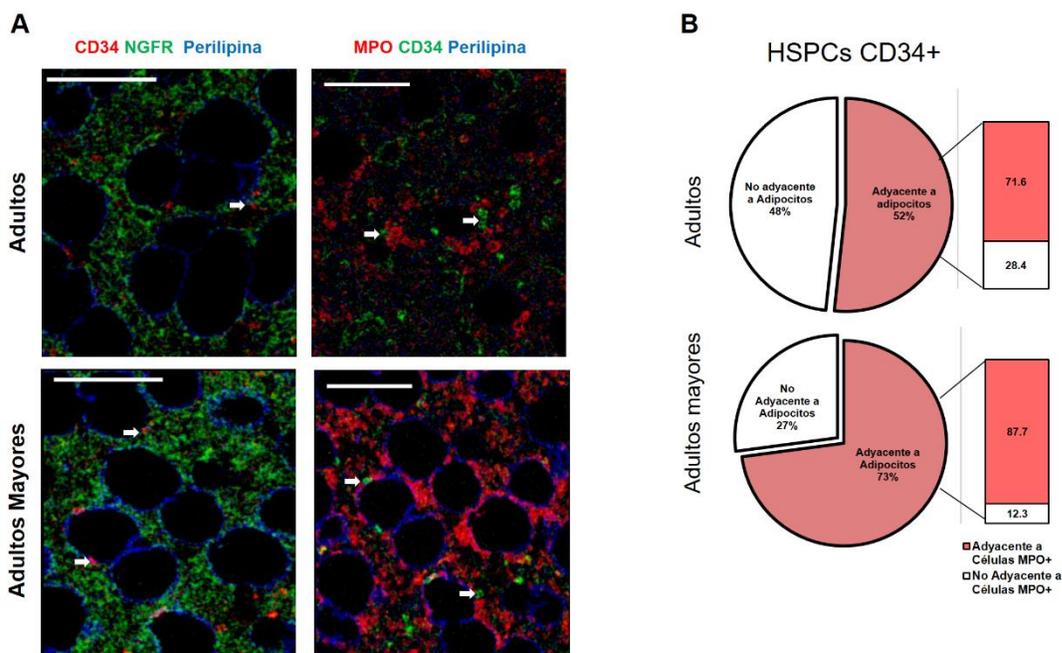
## Detección de poblaciones celulares residentes de médula ósea mediante imagenología por citometría de masas (IMC)

Las evaluaciones *in situ* de poblaciones celulares realizadas mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia tienen como principal desventaja que como máximo pueden evaluarse 3 marcadores en un mismo corte de tejido. En consecuencia se utilizan cortes seriados para la evaluación de múltiples marcadores, teniendo como desventaja que los marcadores evaluados pueden localizarse en planos diferentes. Por lo cual, para evaluar la asociación *in situ* entre las diferentes poblaciones estromales y hematopoyéticas, utilizamos la técnica de imagenología por citometría de masas (IMC, por sus siglas en inglés), la cual permite detectar múltiples marcadores en un solo corte de tejido<sup>159</sup>. En la figura 15A, se muestran imágenes representativas de los diferentes marcadores utilizados. La tinción por IMC se realizó en 5 muestras, correspondientes a 2 de adultos y 3 de adultos mayores. Enseguida, se evaluó si las poblaciones que observamos asociadas por densidad, se asociaban *in situ*. Debido a que se ha reportado que >80% de las HSPCs CD34+ hacen contacto con las MSC NGFR+<sup>75</sup>, decidimos evaluar si el aumento en la asociación *in situ* de HSPCs CD34+ y adipocitos, tenía un efecto en esta asociación. De forma interesante, observamos que a pesar de aumentar su adyacencia con adipocitos, las HSPCs CD34+ mantienen su contacto con las MSC NGFR+ (Fig. 16A), en todas las muestras. Con base en el efecto del envejecimiento en el incremento de HSPCs CD34+ y células MPO+ alrededor de los adipocitos, evaluamos si las HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos, también se encontraban cerca de células MPO+. De esta forma, identificamos HSPCs CD34+ que se encontraban adyacentes tanto a adipocitos como a células MPO+ en muestras de ambos grupos de edad (Fig. 16A). Por lo cual, integramos la información de la asociación *in situ* obtenida mediante IHC y calculamos el porcentaje de HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos que a su vez estaban adyacentes a células MPO+, utilizando las imágenes generadas por IMC (adultos, n=2; adultos mayores, n=3). En todas las muestras analizadas, >70% de las HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos, estaban también adyacentes a células MPO+ (Figura 16B).



**Figura 15. Análisis de marcadores de poblaciones hematopoyéticas y estromales mediante imagenología por citometría de masas en biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores.** Imágenes representativas de IMC mostrando imágenes sobrepuestas de  $\alpha$ SMA (rojo), tinción nuclear (azul) y de células positivas a CD34, MPO, E-caderina, CD3, CD20, CD31, CD68, CD163, NGFR y Perilipina en verde. Imágenes obtenidas utilizando el software Wolfram Mathematica® V10.3. Barra de escala= 100 $\mu$ m. Anticuerpos utilizados: CD68-159Tb, CD163-163Dy, CD34-158Gd, MPO-146Nd, NGFR-160Gd, Perilipina A-142Nd, Ecaderina-174Yb, CD31-145Nd, CD20-161Dy y CD3-170Er.

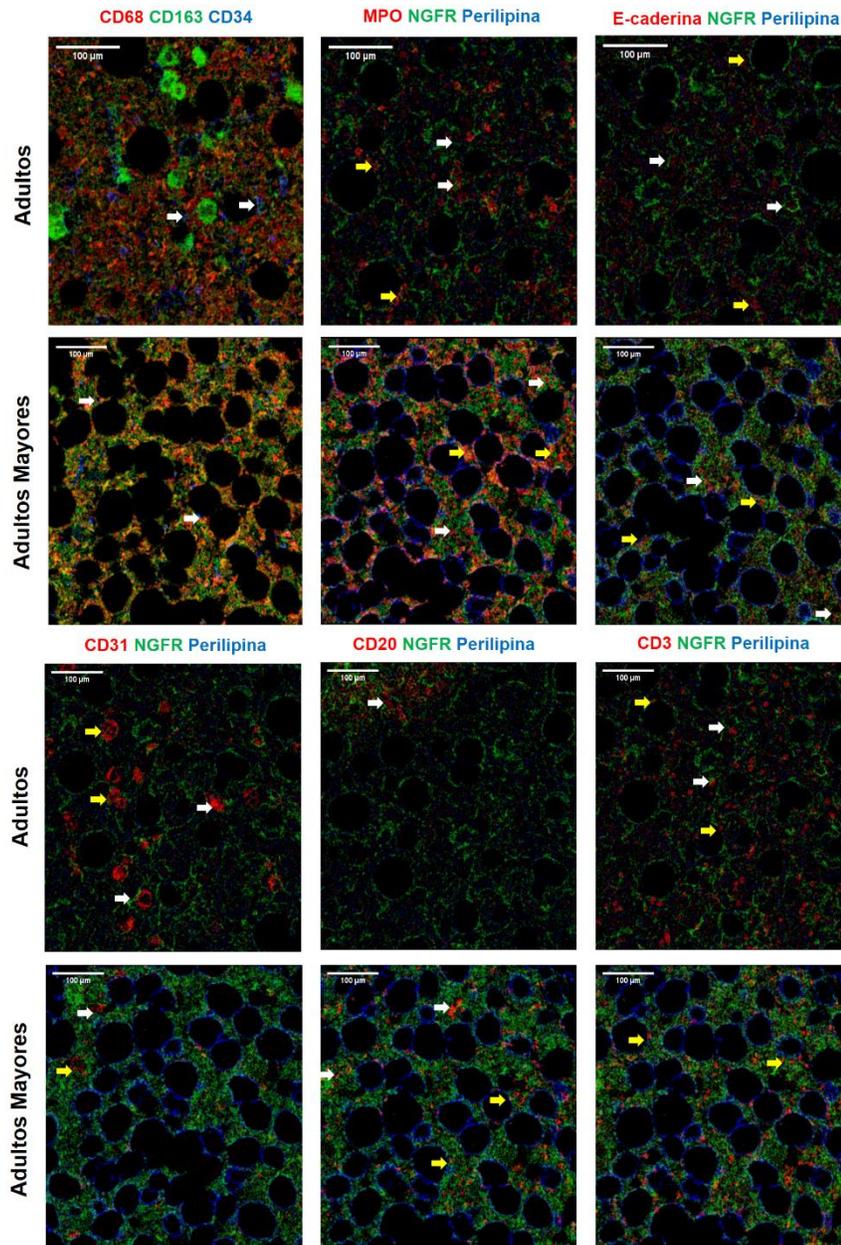
Por otra parte, evaluamos la distribución de las poblaciones de HSPCs CD34+ y macrófagos CD163+. Debido a que el marcaje con CD163+ presentó fondo e incluso marcaje inespecífico de los megacariocitos, agregamos el marcador CD68+ a la imagen para determinar que los dobles positivos (color amarillo) tanto a CD163 como a CD68 pertenecen a la población de macrófagos. Al contrario de lo observado cuando se estudió la asociación por densidades de ambas poblaciones, en la cual se obtuvo una asociación negativa entre ambas poblaciones, *in situ* observamos que las HSPCs CD34+ se encuentran adyacentes o cercanas a, por lo menos, un macrófago (Fig. 17).



**Figura 16. Asociación *in situ* entre HSPCs CD34+ y células MPO+ con MSC NGFR+ y adipocitos en médula ósea de adultos y adultos mayores. A.** Imágenes representativas de IMC mostrando imágenes sobrepuestas de HSPCs CD34+ (rojo), MSC NGFR+ (verde) y adipocitos (azul) (izquierda). A la derecha se muestran imágenes representativas de células MPO+ (rojo), HSPCs CD34+ (verde) y adipocitos (azul). Barra de escala=100  $\mu$ m. La adyacencia entre las poblaciones se señala con flechas blancas. **B.** Diagrama mostrando el porcentaje de HSPCs CD34+ adyacentes a células MPO+ a partir del porcentaje de HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos en ambos grupos de estudio. El porcentaje de HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos fue calculado de los análisis de IHQ, mientras que el porcentaje de HSPCs CD34+ adyacentes a adipocitos y a su vez a células MPO+ fue calculado a partir de los análisis de IMC. Anticuerpos utilizados: CD34-158Gd, MPO-146Nd, NGFR-160Gd y Perilipina A-142Nd.

Con respecto al incremento en la densidad de células MPO+ en las áreas hematopoyéticas alrededor de los adipocitos aumenta, y a la importancia que se ha descrito por parte de las MSC en la regulación de la diferenciación de las HSPCs, evaluamos como se distribuían las células MPO+ con respecto a los adipocitos y las MSC. De forma interesante, encontramos que la mayoría de las células MPO+ se encontraban adyacentes o cercanas a una MSC, incluyendo aquellas que se encontraban adyacentes a los adipocitos, tanto en adultos como en adultos mayores (Fig. 17). Esto sugiere que ambas poblaciones estromales participan en el mantenimiento y diferenciación de las células de linaje mielóide. Por último, evaluamos la distribución de los progenitores E-caderina+ con respecto a las poblaciones de MSC y adipocitos. Como anteriormente se demostró que las células MPO+ se distribuyen adyacentes a los adipocitos y MSC, evaluamos como se distribuían los progenitores E-caderina+ con respecto a estas poblaciones estromales. Se observó que una proporción de progenitores E-caderina+ se distribuyen adyacentes a los

adipocitos, y cuando esto sucede, también están adyacentes a una MSC. Mientras que al igual que las células MPO+, al encontrarse distribuidas en el parénquima, están cercanas o adyacentes a una MSC (Fig. 17). Estas observaciones confirman la importancia de las poblaciones de adipocitos y MSC en el mantenimiento y regulación de la hematopoyesis.



**Figura 17. Asociación *in situ* entre poblaciones hematopoyéticas y estromales en biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.** Imágenes representativas de IMC de biopsias de médula ósea de adultos y adultos mayores mostrando asociaciones *in situ* entre poblaciones hematopoyéticas y estromales. Adyacencia entre HSPCs (CD34, azul) y poblaciones de macrófagos (CD68+ CD163+, amarillo); adyacencia entre células MPO+ (rojo), MSC (NGFR, verde) y adipocitos (Perilipina, azul); adyacencia entre progenitores E-caderina+ (rojo), MSC NGFR+ (verde) y adipocitos (Perilipina, azul); adyacencia entre megacariocitos (CD31, rojo), MSC NGFR+ (verde) y adipocitos (Perilipina, azul); adyacencia entre linfocitos B (CD20, rojo), MSC NGFR+ (verde) y adipocitos (Perilipina, azul); y adyacencia entre linfocitos T (CD3, rojo), MSC NGFR+ (verde) y adipocitos (Perilipina, azul). Las interacciones entre las tres poblaciones

son marcadas con flechas amarillas, y la asociación entre poblaciones hematopoyéticas y MSC con flechas blancas. Barra de escala=100µm. Anticuerpos utilizados: CD68-159Tb, CD163-163Dy, CD34-158Gd, MPO-146Nd, NGFR-160Gd, Perilipina A-142Nd, Ecaderina-174Yb, CD31-145Nd, CD20-161Dy y CD3-170Er.

Con relación a los linajes linfoides y de megacariocitos, evaluamos su distribución con respecto a las poblaciones de adipocitos y MSC en médula ósea de adultos y de adultos mayores. En lo que respecta a megacariocitos, en todas las muestras analizadas, observamos que estos se distribuyen adyacentes o cercanos a las MSC (flechas blancas), mientras que pueden o no estar adyacentes a adipocitos (flechas amarillas) (Fig. 17). Esta observación fue similar para las poblaciones de linfocitos B y T, distribuyéndose a lo largo de una MSC, y una proporción de ellos adyacentes a adipocitos (Fig. 17), tanto en muestras de adultos como de adultos mayores.

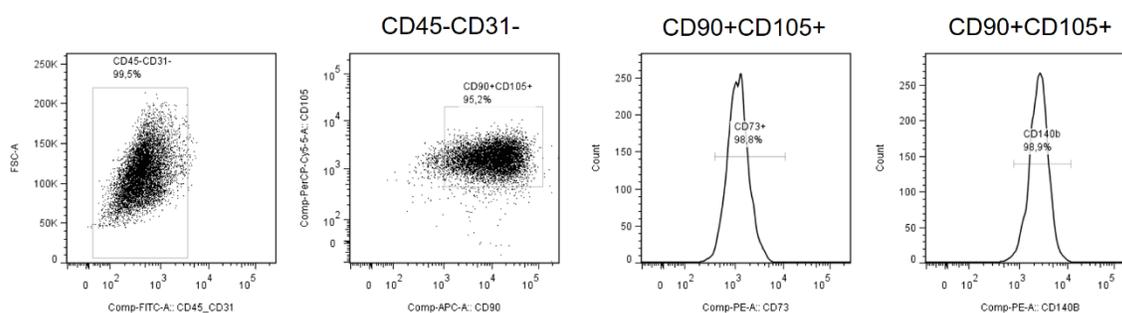
### Evaluación de la funcionalidad de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores

Como parte de las funciones que llevan a cabo las MSC en el mantenimiento de la homeostasis en el microambiente hematopoyético, las MSC son la población celular precursora de tres poblaciones celulares fundamentales para el funcionamiento de la médula ósea, las cuales son: adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Los resultados obtenidos acerca de la población de MSC arrojan que el envejecimiento no tiene efecto en su frecuencia, en la capacidad de formar colonias de fibroblastos, en su densidad *in situ*, e incluso en sus asociaciones con células hematopoyéticas en médula ósea. Sin embargo, siendo éstas las precursoras de la población de adipocitos, la cual aumenta su densidad con el envejecimiento, evaluamos si el envejecimiento tiene efecto en su funcionalidad, favoreciendo su diferenciación hacia adipocitos. Para lo cual, evaluamos tres aspectos funcionales de las MSC: su capacidad de diferenciación hacia los tres linajes, su capacidad de proliferación y su capacidad de soporte hematopoyético.

### Determinación de fenotipo MSC de células adherentes derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores

Capas de células adherentes fueron obtenidas a partir de muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores. En la resiembra 2, se procedió a teñirlas para evaluar su fenotipo mesenquimal por citometría de flujo. Se evaluó el porcentaje de células positivas a los marcadores CD90, CD105, CD73 y CD140b, además de negativas a los marcadores hematopoyéticos CD45, y CD31, de acuerdo a los criterios de expresión de marcadores para considerar como mesenquimal, una población celular<sup>67</sup> (Figura 18). En la tabla 9, se

muestran los resultados, cumpliendo más del >96% de las células evaluadas, los criterios para ser consideradas una población de células mesenquimales.



**Figura 18. Fenotipo de células adherentes en cultivo derivadas de muestras de médula ósea.** Gráficos representativos de la estrategia de análisis para determinar fenotipo mesenquimal de células adherentes derivadas de médula ósea por citometría de flujo.

Tabla 9. Fenotipo de células en cultivo derivadas de muestras de médula ósea de adultos y adultos mayores.

Muestras por grupo	Fenotipo
	CD45-CD31-CD90+CD105+CD73+CD140b+
<b>Adultos (n=5)</b>	96.6±1.89
<b>Adultos mayores (n=5)</b>	96.2±2

### Evaluación de la capacidad de diferenciación *in vitro* de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores, hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos

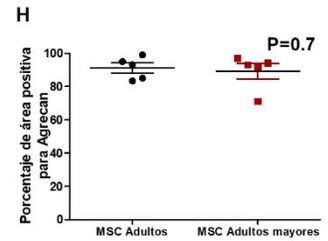
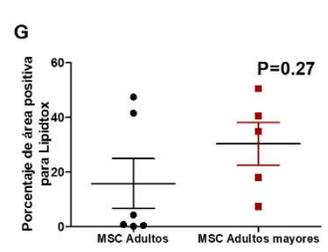
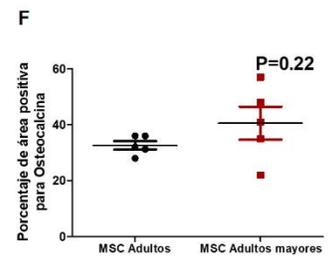
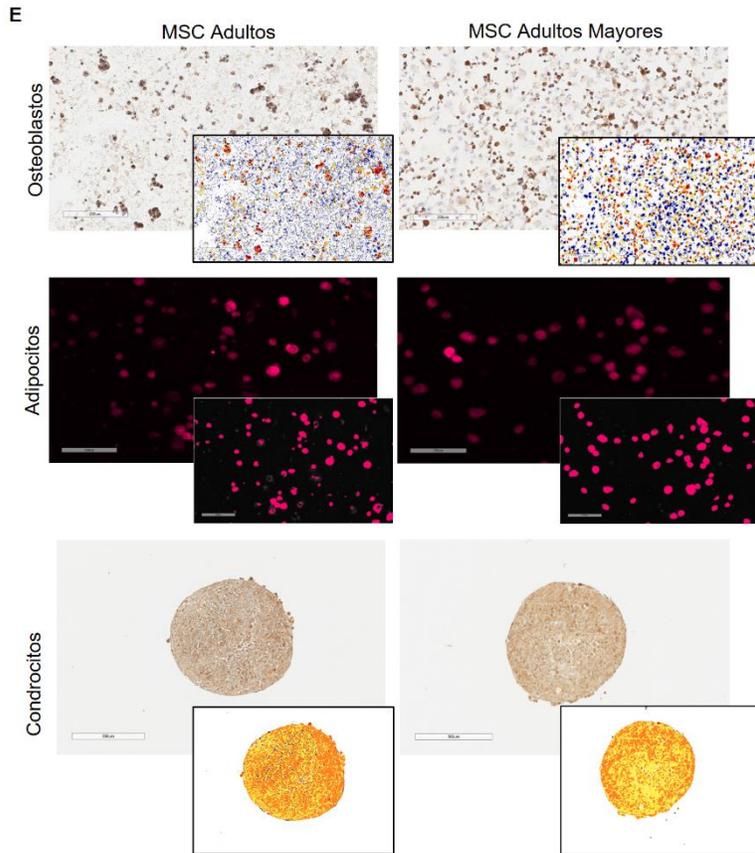
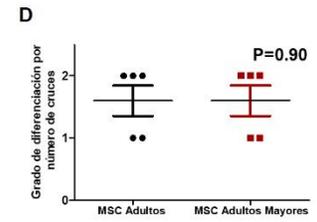
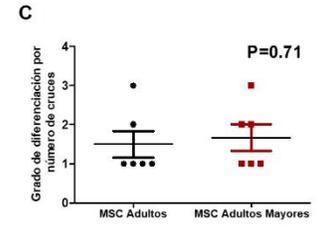
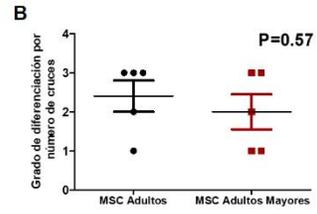
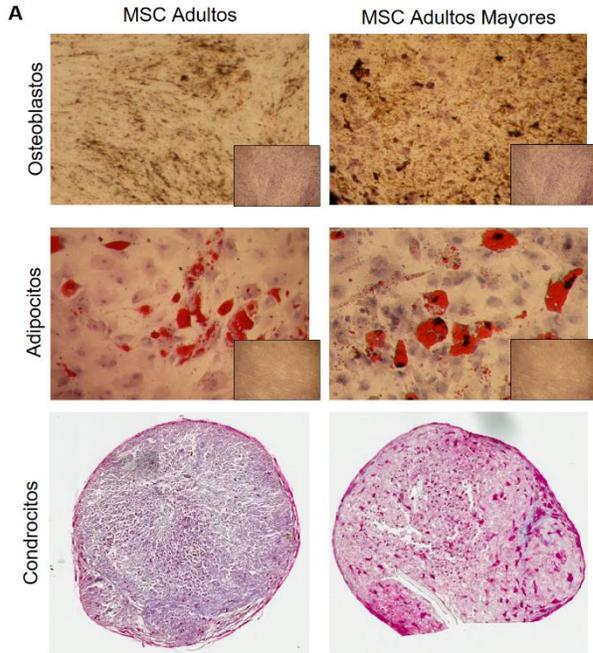
Una vez determinado que las células adherentes derivadas de médula ósea correspondían a MSC, se procedió a realizar la evaluación de la diferenciación hacia los tres linajes mesenquimales, la cual se realizó de forma cualitativa y cuantitativa. Primero, se evaluó de forma cualitativa la diferenciación a los tres linajes. El método de evaluación consistió en una escala del 1 al 3 donde 1 se asignó a muestras con aproximadamente <20% de MSC diferenciadas, 2 a aproximadamente 50% y 3 a >50% de MSC diferenciadas. En la figura 19A, se muestran imágenes representativas de MSC diferenciadas hacia osteoblastos (panel superior), adipocitos (panel central) y condrocitos (panel inferior) derivadas de médula ósea de adultos y de adultos mayores. Respecto a la diferenciación hacia osteoblastos, las MSC derivadas de ambos grupos no presentaron diferencias en su capacidad de diferenciación ( $P=0.57$ ) (Fig. 19B). Asimismo, las MSC derivadas de ambos grupos no presentaron diferencias en cuanto a su capacidad para diferenciarse hacia adipocitos ( $P=0.71$ ) (Fig. 19C). Por último, se evaluó la capacidad de diferenciación hacia condrocitos utilizando la tinción tricrómica de Masson, en la cual se evalúa la producción de

colágeno tipo I, observando que las áreas de colágeno tipo I eran pequeñas en todas las muestras evaluadas, por lo que las muestras que tuvieron áreas más pequeñas se les asignó el número 1 y a las demás el 2. No observamos diferencias entre las micromasas derivadas de MSC de adultos y de adultos mayores ( $P=0.90$ ) (Fig. 19D).

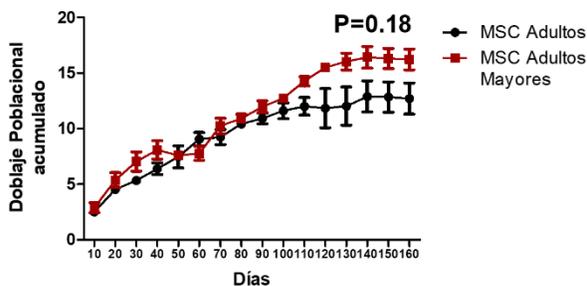
Para complementar las observaciones realizadas en las evaluaciones cualitativas, se realizó la evaluación cuantitativa de la diferenciación hacia los tres linajes. Utilizando el software de análisis de imagen ImageScope, tanto en su canal de campo claro como de fluorescencia, se cuantificó el área positiva para los marcadores: osteocalcina (osteoblastos), lipidtox (adipocitos) y agrecan (condrocitos). En la figura 19E, se muestran imágenes representativas de las tinciones y la imagen digitalizada generada por el software. Tanto para osteocalcina como para agrecan, se cuantificó el área positiva marcada en amarillo y naranja, mientras que para lipidtox se cuantificó toda el área positiva obtenida en el canal rojo. Las MSC derivadas de adultos y adultos mayores, no presentaron diferencias significativas con respecto a su porcentaje de área positiva a osteocalcina ( $32.65 \pm 1.52$  ( $n=5$ ) vs  $40.60 \pm 5.92$  ( $n=5$ ),  $P=0.22$ ) (Fig. 19F). Con respecto a la diferenciación hacia adipocitos, las MSC derivadas de adultos presentaron una tendencia a tener menor capacidad de diferenciación, presentando 4 de sus muestras un porcentaje bajo de área positiva a lipidtox, sin embargo, ésta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $15.80 \pm 9.12$  ( $n=6$ ) vs  $30.29 \pm 7.77$  ( $n=5$ ),  $P=0.27$ ) (Fig. 19G). En cuanto a la diferenciación hacia condrocitos, las MSC derivadas de ambos grupos presentaron  $>80\%$  de área positiva a agrecan ( $91.10 \pm 2.98$  ( $n=5$ ) vs  $89.30 \pm 4.66$  ( $n=5$ ),  $P=0.75$ ) (Fig. 19H).

### Evaluación de la capacidad de proliferación *in vitro* de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores

Se ha demostrado previamente, que las MSC pueden proliferar y mantenerse hasta 300 días en cultivo<sup>145</sup>, por lo cual, evaluamos si había diferencias entre la capacidad de proliferación de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores. Utilizando el modelo de doblaje poblacional, observamos que las MSC derivadas de ambos grupos evaluados no presentan diferencias con respecto a su capacidad de proliferación, alcanzando ambos grupos los 160 días en cultivo, con promedio de 15 doblajes poblacionales ( $P=0.18$ ) (Fig. 20). A partir del día 140, las células presentaron morfología más grande con acumulación de debris en citoplasma y en núcleo, característica de células senescentes.



**Figura 19. Evaluación de la capacidad de diferenciación de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores hematológicamente sanos.** **A.** Imágenes representativas de la evaluación cualitativa de la diferenciación de MSC hacia osteoblastos (panel superior), adipocitos (panel central) y condrocitos (panel inferior). Tinción de von Kossa (osteoblastos); tinción rojo oleoso (adipocitos) y tinción tricrómica de Masson (condrocitos). En el recuadro se muestran imágenes de MSC control cultivadas sin medio de diferenciación. **B.** Gráfica mostrando el grado de diferenciación por número de cruces de MSC derivadas de adultos y adultos mayores hacia osteoblastos. Prueba Mann-Whitney,  $P=0.57$ . **C.** Gráfica mostrando el grado de diferenciación por número de cruces de MSC derivadas de adultos y adultos mayores hacia adipocitos. Prueba Mann-Whitney,  $P=0.71$ . **D.** Gráfica mostrando el grado de diferenciación por número de cruces de MSC derivadas de adultos y adultos mayores hacia condrocitos. Prueba Mann-Whitney,  $P=0.90$ . **E.** Imágenes representativas de la evaluación cuantitativa de diferenciación hacia osteoblastos (panel superior), adipocitos (panel central) y condrocitos (panel inferior). Imágenes de MSC teñidas por IHQ con osteocalcina (osteoblastos); imágenes de IF de MSC teñidas para lipidtox (adipocitos); e imágenes de micromasas teñidas por IHQ con agregan (condrocitos). Las imágenes en el recuadro pequeño muestran las imágenes digitalizadas obtenidas por análisis de imagen para la cuantificación de las áreas positivas (amarillo y naranja) y negativas (azul), para osteoblastos y condrocitos; cuantificación del área del canal rojo para adipocitos. Las imágenes digitalizadas se obtuvieron con ImageScope. **F.** Gráfica mostrando el porcentaje de área positiva para osteocalcina en MSC derivadas de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.22$ . **G.** Gráfica mostrando el porcentaje de área positiva para lipidtox en MSC derivadas de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.27$ . **H.** Gráfica mostrando el porcentaje de área positiva para agregan en micromasas obtenidas de MSC derivadas de adultos y adultos mayores. Prueba t no pareada,  $P=0.7$ .



**Figura 20. Evaluación de la capacidad de proliferación de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores.** Gráfica mostrando los doblajes poblacionales acumulados de MSC derivadas de adultos y adultos mayores por días en cultivo. Anova de dos vías,  $P=0.18$ .

### Evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético *in vitro* de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores

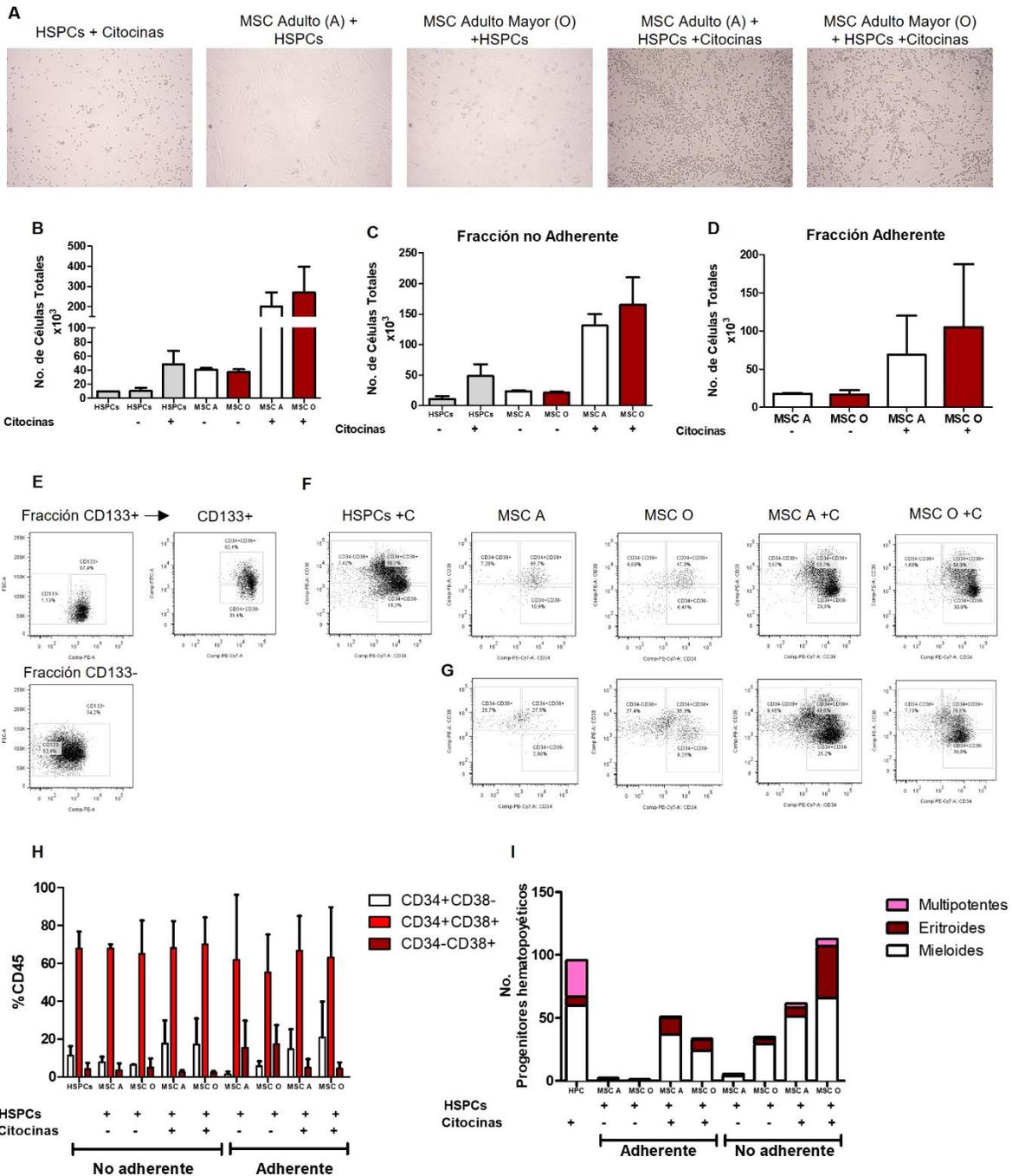
Dentro de las funciones que desempeñan las MSC se encuentra regular la proliferación y el mantenimiento de la población de HSPCs. Por lo cual, evaluamos si existían diferencias entre las MSC derivadas de médula ósea de ambos grupos, en su capacidad de soporte hematopoyético. Para lo cual, se utilizó sangre periférica movilizada como fuente de HSPC CD34+, los cuales fueron obtenidos mediante columnas por enriquecimiento positivo para el marcador CD133+, obteniendo >98% de HSPCs CD34+ después del procedimiento. Las HSPCs obtenidas se co-cultivaron con MSC derivadas de médula ósea de adultos y de adultos mayores durante 7 días, en presencia o ausencia de citocinas fundamentales para el mantenimiento de la población HSPCs CD34+, tales como SCF, TPO, IL-6, FLT3. Las condiciones evaluadas fueron: HSPCs CD34+ en cultivo, HSPCs CD34+ más citocinas en el medio de cultivo, MSC en presencia de HSPCs CD34+y MSC en presencia de HSPCs

CD34+ y citocinas. Después de 7 días de cultivo, no se observaron células en la condición de HSPCs cultivada en ausencia de citocinas. En la figura 21A, se muestran imágenes representativas de las diferentes condiciones de cultivo evaluadas, observándose de acuerdo a lo esperado un mayor número de células hematopoyéticas en las condiciones suplementadas con citocinas. En la figura 21B se muestra la gráfica representando el número total de células hematopoyéticas obtenidas en cada una de las condiciones, siendo la primera barra, empezando de izquierda a derecha, la correspondiente al día 0 de cultivo. Se observó que las condiciones HSPCs + Citocinas, MSC de adulto y adulto mayor en ausencia de citocinas, presentaron números similares doblando aproximadamente 4 veces el número inicial, mientras que las condiciones en las que se combinaba la presencia de MSC más citocinas, presentaron 20 veces más células con respecto al número inicial. Sin embargo, no se observaron cambios con respecto a los grupos de adultos (MSC A) y adultos mayores (MSC O). Con respecto a las condiciones con MSC, se evaluaron dos fracciones, tanto la fracción adherente como la no adherente. De acuerdo con lo observado anteriormente, las condiciones en las cuales se adicionaron citocinas presentaron un mayor número de células, siendo la condición con MSC más citocinas, la que presentó mayor número de células, en ambos grupos evaluados (Fig. 21C). Con respecto a la fracción adherente, aunque se observó un mayor número celular en las condiciones con citocinas agregadas, no hubo cambios entre los grupos de estudio (Fig. 21D).

Posteriormente, se evaluó por citometría de flujo el fenotipo de las células hematopoyéticas provenientes de las condiciones anteriormente señaladas, incluyendo las fracciones adherente y no adherente. En la figura 21E, se muestran gráficos representativos del enriquecimiento de las HSPCs, mediante la selección positiva de células CD133+, siendo más del 95% de las células CD133+ en la fracción enriquecida. Además, se demuestra que el 100% de las células enriquecidas en CD133, son células CD34+. Se incluyó el marcador CD38, para determinar la jerarquía de progenitores hematopoyéticos presentes en la muestra, siendo la fracción más primitiva la CD34+CD38-, donde se localizan las HSC y la fracción CD34+CD38+ correspondiente a los HPC (Fig. 21E). En la figura 21F se muestran gráficos representativos de las poblaciones de HSPC y HPC en las distintas condiciones de cultivo evaluadas en la fracción no adherente, mientras que en la figura 21G se muestran en la fracción adherente. Observamos que después de 7 días de cultivo, la población CD34+CD38- disminuye en las condiciones de cultivo HSPCs más citocinas y en cultivo solo con MSC, tanto de adulto como de adulto mayor (Fig. 21H). Por el contrario, en las condiciones de cultivo con MSC más citocinas, está población se

expande tanto en la fracción adherente como en la no adherente, observando un efecto aditivo de las citocinas más factores producidos por las MSC. Por su parte, la población de HPC CD34+CD38+ se expande en todas las condiciones de cultivo. Después de 7 días de cultivo, observamos la aparición de la población CD34-CD38+, la cual corresponde a los HPC comprometidos, lo cual nos indica la diferenciación de las HSPC sembradas en día 0. Encontramos que la población de HPC comprometidos presenta mayor frecuencia en las condiciones de cocultivo solo con MSC, en ambas fracciones estudiadas, comparado con las condiciones de cocultivo de MSC más citocinas, esto es debido a que las citocinas agregadas favorecen el mantenimiento de progenitores más inmaduros. Cabe destacar que no encontramos diferencias en la frecuencia de los HPC evaluados, entre cocultivo con MSC derivadas de adultos y adultos mayores.

Después, se evaluó el número de progenitores hematopoyéticos en las condiciones evaluadas anteriormente. Tal como era esperado, las condiciones suplementadas con citocinas presentaron un mayor número de progenitores hematopoyéticos (Fig. 21I), además de mantenerse una proporción de progenitores multipotentes en estas condiciones. De forma interesante, en su fracción no adherente, las MSC de adultos mayores suplementadas con citocinas, presentaron un número similar de colonias de progenitores con respecto a las HSPCs suplementadas con citocinas. Asimismo, presentaron una tendencia a tener un mayor número de colonias totales y eritroides, con respecto al grupo de MSC de adultos. Sin embargo, es importante destacar que el tamaño de la muestra es 2 por grupo, por lo cual, no podemos concluir si existen diferencias entre los dos grupos evaluados.



**Figura 21. Evaluación de la capacidad de soporte hematopoyético de MSC derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores.** **A.** Imágenes representativas de cocultivos de HSPCs y MSC derivadas de adultos y adultos mayores, después de 7 días de cultivo. Izquierda a derecha se muestran imágenes de las condiciones evaluadas: HSPCs cultivadas en presencia de citocinas (SCF, IL-6, TPO y Flt3); HSPCs cultivadas en presencia de MSC derivadas de adulto (MSC A); HSPCs cultivadas en presencia de MSC derivadas de adulto mayor (MSC O); HSPCs cultivadas en presencia de MSC derivadas de adulto (MSC A) y citocinas (SCF, IL-6, TPO y Flt3); y HSPCs cultivadas en presencia de MSC derivadas de adulto mayor (MSC O) y citocinas (SCF, IL-6, TPO y Flt3). **B.** Gráfica mostrando el número de células hematopoyéticas totales obtenidas de cada una de las condiciones mencionadas anteriormente, en ausencia y presencia de citocinas. **C.** Gráfica mostrando el número de células hematopoyéticas totales obtenidas de la fracción

adherente del cocultivo de las condiciones evaluadas. **E.** Gráficos representativos de la estrategia de enriquecimiento de HSPCs, a partir de la selección de células CD133+. Se muestran tanto la fracción CD133+ y la fracción CD133-. Se muestra la proporción de HSPC CD34+CD38- y HPC CD34+CD38+, a partir de la población CD133+. **F.** Gráficos representativos de las poblaciones de HSPCs CD34+CD38-, HPC CD34+CD38+ y HPC comprometidos CD34-CD38+ en la fracción no adherente de las distintas condiciones de cultivo evaluadas. **G.** Gráficos representativos de las poblaciones de HSPCs CD34+CD38-, HPC CD34+CD38+ y HPC comprometidos CD34-CD38+ en la fracción adherente de las condiciones de cultivo con MSC. **H.** Gráfico de barras mostrando las frecuencias de las poblaciones de HSPCs CD34+CD38-, HPC CD34+CD38+ y HPC comprometidos CD34-CD38+, en las diferentes condiciones de cultivo evaluadas. **I.** Gráfica mostrando el número de progenitores por cada 1,000 células hematopoyéticas obtenidas de las condiciones de cocultivo evaluadas. Se muestra el número de colonias de progenitores multipotentes, eritroides y mieloides.

## Discusión

En el presente estudio se analizó el efecto del envejecimiento en la composición del microambiente hematopoyético utilizando muestras de médula ósea de pacientes hematológicamente sanos. Este estudio clarifica la localización de las HSPCs CD34+ en la médula ósea adulta y envejecida, mostrando que las HSPCs mantienen su localización perivascular en médula ósea, en contacto con MSC NGFR+, pero incrementando su asociación a adipocitos en el envejecimiento. De acuerdo a nuestra investigación, las HSPCs CD34+ se localizan inmediatamente adyacentes a los adipocitos y enfatiza que el envejecimiento correlaciona con cambios en la localización de las HSPCs CD34+ en humanos. Además, observamos que el incremento, asociado al envejecimiento, en la localización peri-adipocítica de las HSPCs correlaciona con un aumento en la densidad de células mieloides en estas zonas. Proponemos que los cambios asociados al envejecimiento en las interacciones entre las HSPCs y su microambiente pueden influir en el sesgo de diferenciación hacia linaje mieloides y el riesgo latente del desarrollo de leucemias de tipo mieloides.

Se ha descrito, que asociado al envejecimiento, las HSC presentan un “sesgo” de diferenciación hacia linaje mieloides, aumentando éste y disminuyendo el linaje linfocítico<sup>160</sup>. En este estudio reportamos que la densidad de células mieloides en maduración aumenta en el grupo de adultos mayores e incluso los valores absolutos de células mieloides totales en sangre periférica, de acuerdo a lo reportado previamente para ratón<sup>110,160</sup>. Además este estudio agrega el análisis de las células mieloides *in situ* en la médula ósea humana, aportando evidencia de su aumento asociado al envejecimiento. En humano, los estudios realizados acerca del efecto del envejecimiento en las poblaciones de HSC, HPCs y de los diferentes linajes hematopoyéticos, había consistido hasta el momento en análisis de frecuencias por citometría de flujo y ensayos de xenotransplante en ratón. De los cuales, los ensayos en xenotransplante arrojaron la información del “sesgo” mieloides en las HSC provenientes de adultos mayores (>70 años)<sup>109</sup>. Mientras que los análisis por citometría de flujo mostraban datos contradictorios acerca del efecto del envejecimiento en el linaje mieloides, unos reportaban que disminuían los progenitores mieloides (GMP)<sup>110</sup>, mientras que otros reportaban que no cambiaban sus frecuencias<sup>106</sup>. Ambas técnicas presentan ventajas y desventajas comparado con la medición *in situ*. Dentro de las ventajas del modelo de xenotransplante está la evaluación en un sistema vivo, en el cual se pueden evaluar todas las variables involucradas, lo cual no puede realizarse en humanos. Con

respecto a la citometría de flujo, permite la evaluación de poblaciones muy específicas mediante el uso de combinaciones de marcadores. Sin embargo, la principal desventaja del sistema de xenotransplante es principalmente la barrera de especies, lo que involucra cambios en las poblaciones del microambiente hematopoyético, por ejemplo, la ausencia o poca presencia de adipocitos. Con respecto a la citometría de flujo, su principal desventaja es la obtención de las poblaciones celulares, principalmente en médula ósea, ya que dependiendo de dónde se obtenga la muestra, ya sea aspirado o raspado de médula ósea, algunas poblaciones podrían permanecer en el tejido y no ser muestreadas. Por lo cual, las evaluaciones *in situ* presentan soluciones a estas desventajas, siendo evaluadas en el organismo de estudio y directamente en el tejido de interés, en este caso la médula ósea.

Con respecto a los linajes hematopoyéticos restantes, se ha reportado disminución en el linaje linfoide y aumento en los linajes de megacariocitos y eritroides<sup>106,109,110</sup>. De acuerdo a lo reportado, observamos una disminución del linaje linfoide en el grupo de adultos mayores, sólo en los valores absolutos de linfocitos en sangre periférica, mientras que en la médula ósea observamos que no había diferencias en el porcentaje de linfocitos B, T y progenitores B Pax5+. Esto puede deberse a que además de la médula ósea, existen otros órganos donde se lleva a cabo la maduración de linfocitos, el bazo y el timo, en el cual se ha reportado que disminuye su producción de linfocitos T asociado a la edad<sup>161</sup>. Con respecto a los linfocitos B, se ha reportado que disminuyen con la edad<sup>106,162</sup>. Sin embargo, estos estudios se han enfocado en compartimentos más inmaduros como progenitores CLP, mientras que nuestro estudio evaluó células maduras B CD20+, sugiriendo que los efectos del envejecimiento pudiesen tener como blanco las poblaciones más inmaduras. En relación a las poblaciones de megacariocitos y eritroides, no encontramos diferencias asociadas al envejecimiento en médula ósea y en sangre periférica, contrario al aumento reportado previamente<sup>110</sup>. Sin embargo, el aumento reportado en la población de linaje de megacariocitos y eritroide se enfocó en la población progenitora de ambos linajes (MEP), mientras que las poblaciones de los linajes por separado no fueron evaluadas. Por otro lado, su estudio se enfocó en evaluar las diferencias entre grupos de estudio de jóvenes (<30 años) y adultos mayores (>70 años), mientras que nuestro estudio se enfocó en un rango de edad más cercano, siendo mayores de 50 y mayores de 65 años.

Con relación a la población de HSPCs CD34+, observamos que ésta aumenta asociado a la edad, de acuerdo a lo reportado previamente con respecto a la población de HSC<sup>106,109,110</sup>. Aunque estos estudios reportan que al evaluar la población total de CD34+

no observan diferencias, al enfocarse en poblaciones más inmaduras dentro del compartimento de CD34+, observan que éstas aumentan, tales como la población CD34+CD38- y HSCs. Las diferencias observadas con respecto a la población total CD34+ pueden deberse al método de análisis, ya que cuando realizamos la evaluación por citometría de flujo de la población de CD34 tampoco encontramos diferencias asociadas al envejecimiento. Por lo cual, podría deberse que no se están obteniendo estas poblaciones al momento de procesar la muestra para evaluación por citometría de flujo, mientras que por inmunohistoquímica se evalúan las células directamente en el tejido.

Debido al aumento observado en la población de HSPCs CD34+, esperábamos encontrar un aumento en la población de MSC, ya que ésta ha sido directamente reportada en su regulación<sup>39,55,70,140,158,163,164</sup> y además en contacto directo con las HSPCs CD34+<sup>46</sup>. Sin embargo, encontramos que la población MSC NGFR+ no presenta cambios en su frecuencia asociado al envejecimiento, evaluado por citometría de flujo, CFU-F e *in situ*. Lo cual coincide con estudios realizados en ratón, en donde reportan que la población de MSC no presenta cambios en su frecuencia ni en su distribución en médula ósea de ratones viejos<sup>135,136</sup>. A pesar de no observar cambios asociados al envejecimiento, encontramos que la población de MSC NGFR+ mantiene su contacto con las HSPCs CD34+. Además, las MSC NGFR+ mantienen contacto con las demás poblaciones hematopoyéticas, tales como megacariocitos, linfocitos B y T, así como progenitores eritroides, enfatizando su importancia en la regulación de la hematopoyesis. Al evaluar otras poblaciones estromales reportadas como importantes para la regulación de la hematopoyesis, tales como macrófagos, osteoblastos y arterias y capilares, no observamos diferencias que pudiesen asociarse al envejecimiento, tal como se ha observado en reportes previos en humano y ratón<sup>135,136,153</sup>.

En lo que se refiere a los adipocitos, los cuales representan la población estromal con mayor presencia en la médula ósea de adultos, observamos que incrementan su densidad con la edad, lo cual ha sido reportado desde que Moore y Dawson reportaron que con la edad la médula “roja” era reemplazada por la médula “amarilla”<sup>85</sup>. Posteriormente, utilizando la tecnología de resonancia magnética, dos estudios han aportado evidencia contundente acerca del incremento en el área de adipocitos asociado al envejecimiento<sup>165,147</sup>. Específicamente, Miggitsch y colaboradores reportaron que el tejido adiposo en la médula ósea del fémur incrementaba<sup>148</sup>. Sin embargo, se desconocía el papel que jugaba este incremento, en la regulación de células hematopoyéticas. Aunque algunos

estudios previos han sugerido un rol negativo para los adipocitos como reguladores del microambiente hematopoyético<sup>92</sup>, actualmente se ha acumulado evidencia indicando a los adipocitos como reguladores positivos. Los adipocitos promueven la regeneración de la médula ósea por parte de HSCs después de irradiación o daño a la médula<sup>89</sup>, además de participar activamente en la movilización de las HSPCs<sup>166</sup>. Aunado a esto, nuestras observaciones describen una asociación positiva entre los adipocitos y las HSPCs CD34+ en médula ósea, tanto por densidad como por incremento en la adyacencia entre ambas poblaciones. Esto concuerda con reportes de que los adipocitos son capaces de soporte hematopoyético de la población CD34+ *in vitro*, produciendo factores de sobrevivencia y proliferación de la misma manera que las MSC, tales como CXCL12, IL-8, CSF3 and LIF<sup>94,95</sup>. Sin embargo, comparado con las MSC, los adipocitos producen más IL-3, angiopoyetina 2 e IGF1<sup>95</sup>. De forma interesante, IL-3 ha sido reportada como inductor de la diferenciación hacia linaje mieloide<sup>167</sup>.

En el contexto de la diferenciación mieloide, nuestro estudio describe una asociación positiva baja entre las densidades de las poblaciones de células mieloides y los adipocitos. Sin embargo, al analizar la localización de las células mieloides en la médula ósea, observamos que su densidad aumenta en las áreas cercanas a los adipocitos con el envejecimiento, lo cual sugiere un papel importante de los adipocitos en la regulación de la mielopoyesis, lo cual concuerda con lo demostrado por Bhatia y colaboradores en 2017, en donde describen a los adipocitos como el nicho de las células mieloides y eritroides. Sin embargo, nosotros observamos una asociación positiva baja entre la densidad de adipocitos y la de progenitores eritroides tempranos. Con respecto a la mielopoyesis, también se ha descrito que factores secretados por los adipocitos, tales como SCF, adiponectina y leptina, favorecen la mielopoyesis<sup>168,169</sup>. Estos resultados destacan la importancia de estudios en médula ósea de humanos, debido a que los adipocitos están poco representados en modelos de ratón<sup>149</sup> los cuales tienden a utilizar fémur de ratón, el cual presenta poca o nula presencia de adipocitos.

Además de su papel en favorecer la diferenciación hacia linaje mieloide, ha sido reportado que los adipocitos producen factores que promueven y favorecen la inflamación. La secreción de IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  por los adipocitos ha sido reportado que aumenta asociado el envejecimiento<sup>148</sup>. Asimismo, la inflamación crónica ha sido descrita como una característica del envejecimiento y la transformación oncogénica<sup>170,171</sup>. Se ha descrito la activación y sobreexpresión de las principales vías de inflamación, como NF $\kappa$ B, en HSCs y

HPCs envejecidas<sup>172</sup>. De igual manera, las vías mTOR y ERK/MAPK se encuentran incrementadas en HSCs y HPCs envejecidas, las cuales regulan el metabolismo, crecimiento, proliferación y la sobrevivencia de éstas<sup>109,172</sup>. Es importante mencionar, que tanto TNF $\alpha$  e IGF1, los cuales se han reportado sobreexpresados por los adipocitos, activan las vías NF $\kappa$ B, mTOR and ERK-MAPK, respectivamente<sup>173-175</sup>. Por lo tanto, los adipocitos proveen señales para incrementar la inflamación, proliferación y sobrevivencia de las HSPCs, los cuales son factores importantes para mantener a la población de HSPCs, pero a su vez, son factores conocidos por promover la aparición de eventos oncogénicos.

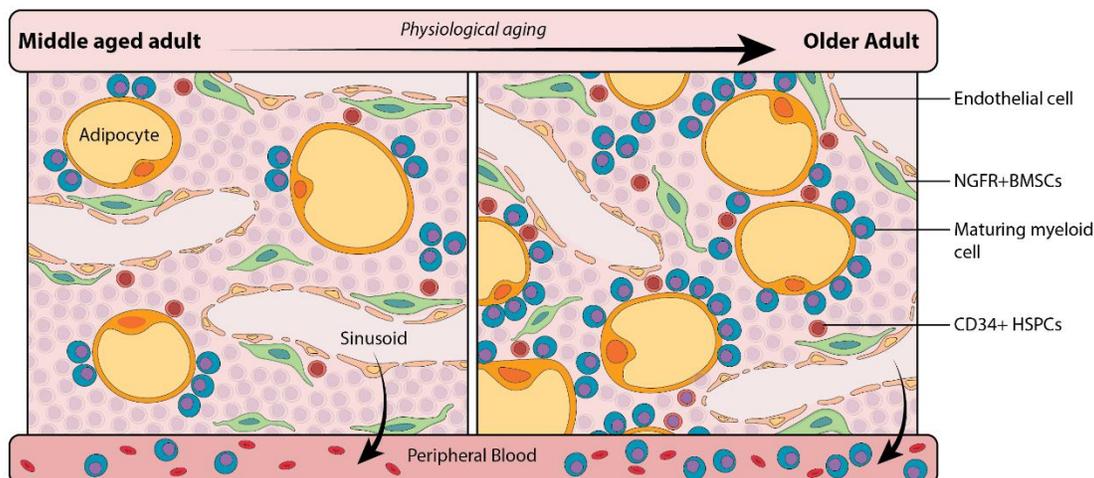
Considerando que los adipocitos se diferencian a partir de la población de MSC, evaluamos si la capacidad funcional de éstas presentaba cambios asociados al envejecimiento, principalmente en su capacidad de diferenciarse hacia adipocitos. En el presente estudio, encontramos que no hay diferencias entre la capacidad de diferenciación hacia los tres linajes en MSC derivadas de médula ósea de adulto y adulto mayor. Esto de acuerdo con lo publicado previamente en cuanto a su capacidad de diferenciación hacia adipocitos. Con respecto a la diferenciación hacia osteoblastos y condrocitos se han reportado resultados contradictorios, mientras unos reportan disminución en la capacidad de diferenciación hacia osteoblastos y condrocitos<sup>141,143</sup>, otros grupos reportan aumento en la osteogénesis<sup>176</sup> y otros que no hay diferencias<sup>177,178</sup>. Es importante señalar que los estudios previos se han basado en mediciones cualitativas de la diferenciación, mientras que nuestro estudio también se realizó la evaluación cuantitativa y de acuerdo a ésta, concluimos que no había diferencia entre los grupos. Cabe destacar que se han reportado cambios asociados al envejecimiento en la capacidad de diferenciación hacia adipocitos de MSC de ratón, basados principalmente en el aumento en la expresión de factores de diferenciación adipogénico<sup>95,139</sup>. Estas diferencias pueden ser debidas principalmente a los métodos de evaluación, mientras los primeros son *in vitro*, los segundos implican evaluación de patrones de expresión de MSC obtenidas directamente de médula ósea sin pasar por cultivo. Esto también puede explicar por qué no observamos diferencias en cuanto a la capacidad de proliferación de MSC y en su capacidad de soporte hematopoyético, ya que el sistema *in vitro*, al ser un ambiente artificial, puede no estar replicando lo que sucede *in vivo*. Por lo cual, consideramos realizar RNAseq y ATACSeq de MSC de muestras de médula ósea de ambos grupos, sin cultivar, y de acuerdo a los patrones de expresión, determinar si hay cambios funcionales en las MSC asociado al envejecimiento.

## Conclusiones

El envejecimiento se asocia con cambios en la organización espacial entre las células troncales/progenitoras hematopoyéticas (HSPCs CD34+) y los adipocitos en médula ósea, incrementando su adyacencia. Este cambio no afecta su localización perivascolar ni su asociación con MSC NGFR+, la cual se mantiene desde adultos hasta adultos mayores. Esta asociación correlaciona con la densidad de células mieloides en maduración en las zonas hematopoyéticas alrededor de los adipocitos, lo cual es responsable del aumento en la densidad de células mieloides en médula ósea y en sangre periférica (Fig. 22).

El envejecimiento no tiene efecto sobre las densidades de las poblaciones hematopoyéticas de linfocitos T, B, megacariocitos y progenitores eritroides tempranos, así como en las de poblaciones estromales como MSC NGFR+, macrófagos CD163+, monocitos-macrófagos CD68+, arterias y capilares  $\alpha$ SMA+ y trabéculas. Asimismo, las asociaciones entre las poblaciones hematopoyéticas y las poblaciones estromales de MSC y adipocitos, se mantienen en ambos grupos.

No existen diferencias en la frecuencia, capacidad de proliferación, diferenciación y soporte hematopoyético *in vitro* de las MSC entre adultos y adultos mayores.



**Figura 22. Modelo de cambios asociados al envejecimiento fisiológico en la organización del microambiente hematopoyético.** El incremento en el porcentaje de adipocitos correlaciona con un incremento en los HSPC CD34+ y en las células mieloides en maduración y su adyacencia con los adipocitos, mientras el contacto con las MSC y su localización perivascolar no presenta cambios en los grupos estudiados.

## Perspectivas

1. Analizar por RNAseq y ATACseq, los perfiles de expresión de MSC obtenidas por sort, enfocando el análisis en genes de diferenciación adipogénica y favorecimiento de diferenciación mieloide y mantenimiento de HSPCs.
2. Debido al aumento en la diferenciación mieloide asociado al envejecimiento, realizar el análisis del microambiente hematopoyético en biopsias de pacientes con displasias y leucemia mieloide aguda y compararlo con los resultados en muestras de pacientes hematológicamente sanos.
3. Realizar cocultivos donde la población adherente consista en adipocitos derivados de adultos y adultos mayores, y cocultivarlos con HSPCs derivadas tanto de adultos y adultos mayores y evaluar su efecto en el soporte hematopoyético.
4. Realizar xenotransplantes de HSCs derivadas de médula ósea de adultos y adultos mayores en ratones en los cuales la médula ósea tenga un porcentaje elevado de adipocitos y así poder evaluar su contribución en la diferenciación mieloide *in vivo*.

## Referencias

1. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):635-645. doi:10.1016/j.stem.2007.10.001
2. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. 2010;11(7):585-593. doi:10.1038/ni.1889
3. Notta F, Zandi S, Takayama N, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016;351(6269):aab2116-aab2116. doi:10.1126/science.aab2116
4. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell*. 1997;91(5):661-672. doi:10.1016/S0092-8674(00)80453-5
5. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-197. doi:10.1038/35004599
6. Muller-Sieburg CE, Whitlock CA, Weissman IL. Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: A committed Pre-Pre-B cell and a clonogenic Thy-1lo hematopoietic stem cell. *Cell*. 1986;44(4):653-662. doi:10.1016/0092-8674(86)90274-6

7. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241(4861):58-62. doi:10.1126/science.2898810
8. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994;1(8):661-673. doi:10.1016/1074-7613(94)90037-x
9. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-1121. doi:10.1016/j.cell.2005.05.026
10. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature*. 2015;526(7571):126-130. doi:10.1038/nature15250
11. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*. 1986;67(3):842-845.
12. Strauss LC, Rowley SD, La Russa VF, Sharkis SJ, Stuart RK, Civin CI. Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 1986;14(9):878-886.
13. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *PNAS*. 1992;89(7):2804-2808. doi:10.1073/pnas.89.7.2804
14. Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *PNAS*. 1997;94(10):5320-5325. doi:10.1073/pnas.94.10.5320
15. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of Single Human Hematopoietic Stem Cells Capable of Long-Term Multilineage Engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218-221. doi:10.1126/science.1201219
16. Rankin EB, Narla A, Park JK, Lin S, Sakamoto KM. Biology of the bone marrow microenvironment and myelodysplastic syndromes. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2015;116(1-2):24-28. doi:10.1016/j.ymsgme.2015.07.004
17. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
18. Nocka K, Tan JC, Chiu E, et al. Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO J*. 1990;9(6):1805-1813.
19. Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, et al. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med*. 1991;174(1):63-71. doi:10.1084/jem.174.1.63
20. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-988. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016

21. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology*. 2002;3(7):687-694. doi:10.1038/ni813
22. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149–161.
23. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Interaction with the Osteoblastic Niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-697. doi:10.1016/j.stem.2007.10.020
24. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, et al. Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):671-684. doi:10.1016/j.stem.2007.10.008
25. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6938):409-414. doi:10.1038/nature01593
26. Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, et al. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive  $\beta$ -catenin activation. *Nature Immunology*. 2006;7(10):1037-1047. doi:10.1038/ni1387
27. Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(39):15436-15441. doi:10.1073/pnas.0704747104
28. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, et al. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood*. 1998;91(11):4084-4091.
29. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-846. doi:10.1038/nature02040
30. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025
31. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, et al. Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):251-264. doi:10.1016/j.stem.2010.02.001
32. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med*. 2006;354(21):2250-2261. doi:10.1056/NEJMra053077
33. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(4):290-301. doi:10.1038/nri2279
34. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006;235(1):176-190. doi:10.1002/dvdy.20603
35. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-841. doi:10.1038/nature02041

36. Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2005;106(4):1232-1239. doi:10.1182/blood-2004-11-4422
37. Stier S, Ko Y, Forkert R, et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*. 2005;201(11):1781-1791. doi:10.1084/jem.20041992
38. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457-462. doi:10.1038/nature10783
39. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231-235. doi:10.1038/nature11885
40. Zhu J, Garrett R, Jung Y, et al. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood*. 2007;109(9):3706-3712. doi:10.1182/blood-2006-08-041384
41. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*. 2016;532(7599):323-328. doi:10.1038/nature17624
42. Rafii S, Butler JM, Ding B-S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*. 2016;529(7586):316-325. doi:10.1038/nature17040
43. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323-328. doi:10.1038/nature13145
44. Cardier JE, Barberá-Guillem E. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 1997;26(1):165-175. doi:10.1002/hep.510260122
45. Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yoder MC. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp Hematol*. 2004;32(12):1226-1237. doi:10.1016/j.exphem.2004.09.001
46. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab Invest*. 2012;92(9):1330-1341. doi:10.1038/labinvest.2012.93
47. Abe-Suzuki S, Kurata M, Abe S, et al. CXCL12  $\beta$  stromal cells as bone marrow niche for CD34  $\beta$  hematopoietic cells and their association with disease progression in myelodysplastic syndromes. *Laboratory Investigation*. 2014;94:12.
48. Nakamura-Ishizu A, Takubo K, Fujioka M, Suda T. Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;454(2):353-357. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.095
49. Bruns I, Lucas D, Pinho S, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nature Medicine*. 2014;20(11):1315-1320. doi:10.1038/nm.3707

50. Chow A, Huggins M, Ahmed J, et al. CD169 + macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nature Medicine*. 2013;19(4):429-436. doi:10.1038/nm.3057
51. Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*. 2010;116(23):4815-4828. doi:10.1182/blood-2009-11-253534
52. Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol*. 1982;10.
53. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980;56(2):289-301. doi:10.1182/blood.V56.2.289.289
54. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
55. Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1977;91(3):335-344. doi:10.1002/jcp.1040910303
56. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 $\alpha$ . *Journal of cellular physiology*. 1996;166(3):585–592.
57. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834. doi:10.1038/nature09262
58. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387-399. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.017
59. Torlakovic E, Tenstad E, Funderud S, Rian E. CD10+ stromal cells form B-lymphocyte maturation niches in the human bone marrow. *The Journal of Pathology*. 2005;205(3):311-317. doi:10.1002/path.1705
60. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. Leptin-Receptor-Expressing Mesenchymal Stromal Cells Represent the Main Source of Bone Formed by Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):154-168. doi:10.1016/j.stem.2014.06.008
61. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, et al. Gremlin 1 Identifies a Skeletal Stem Cell with Bone, Cartilage, and Reticular Stromal Potential. *Cell*. 2015;160(1-2):269-284. doi:10.1016/j.cell.2014.11.042
62. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, et al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell*. 2019;177(7):1915-1932.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.04.040
63. Tikhonova AN, Dolgalev I, Hu H, et al. The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature*. 2019;569(7755):222-228. doi:10.1038/s41586-019-1104-8

64. Mareddy S, Dhaliwal N, Crawford R, Xiao Y. Stem cell–related gene expression in clonal populations of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Tissue Engineering Part A*. 2009;16(2):749–758.
65. Kaltz N, Ringe J, Holzwarth C, et al. Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Experimental Cell Research*. 2010;316(16):2609-2617. doi:10.1016/j.yexcr.2010.06.002
66. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*. 2008;36(5):642-654. doi:10.1016/j.exphem.2007.12.015
67. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
68. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991;78(1):55–62.
69. Cattoretti G, Schiró R, Orazi A, Soligo D, Colombo MP. Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo and in vitro. *Blood*. 1993;81(7):1726-1738.
70. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Experimental hematology*. 2002;30(7):783–791.
71. Busser H, Najjar M, Raicevic G, et al. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cells and Development*. 2015;24(18):2142-2157. doi:10.1089/scd.2015.0172
72. Roson-Burgo B, Sanchez-Guijo F, Del Cañizo C, De Las Rivas J. Transcriptomic portrait of human Mesenchymal Stromal/Stem cells isolated from bone marrow and placenta. *BMC genomics*. 2014;15(1):910.
73. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental Hematology*. 2008;36(8):1035-1046. doi:10.1016/j.exphem.2008.03.004
74. Tormin A, Li O, Brune JC, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*. 2011;117(19):5067-5077. doi:10.1182/blood-2010-08-304287
75. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab Invest*. 2012;92(9):1330-1341. doi:10.1038/labinvest.2012.93
76. de Paula FJA, Rosen CJ. Structure and Function of Bone Marrow Adipocytes. *Compr Physiol*. 2017;8(1):315-349. doi:10.1002/cphy.c170010

77. Horowitz MC, Berry R, Holtrup B, et al. Bone marrow adipocytes. *Adipocyte*. 2017;6(3):193-204. doi:10.1080/21623945.2017.1367881
78. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-2556. doi:10.1210/jc.2004-0395
79. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(2):E444-452. doi:10.1152/ajpendo.00691.2006
80. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
81. Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012;150(2):366-376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016
82. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*. 1998;102(2):412-420. doi:10.1172/JCI3155
83. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:85. doi:10.3389/fendo.2016.00085
84. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*. 2004;3(6):379-389. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00127.x
85. Moore SG, Dawson KL. Red and yellow marrow in the femur: age-related changes in appearance at MR imaging. *Radiology*. 1990;175(1):219-223. doi:10.1148/radiology.175.1.2315484
86. Tavassoli M. Marrow adipose cells. Histochemical identification of labile and stable components. *Arch Pathol Lab Med*. 1976;100(1):16-18.
87. Scheller EL, Doucette CR, Learman BS, et al. Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. *Nature Communications*. 2015;6:7808. doi:10.1038/ncomms8808
88. Emery JL, Follett GF. REGRESSION OF BONE-MARROW HAEMOPOIESIS FROM THE TERMINAL DIGITS IN THE FOETUS AND INFANT. *Br J Haematol*. 1964;10:485-489. doi:10.1111/j.1365-2141.1964.tb00725.x
89. Zhou BO, Yu H, Yue R, et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nature Cell Biology*. 2017;19(8):891-903. doi:10.1038/ncb3570
90. Boyd AL, Reid JC, Salci KR, et al. Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myeloid erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nature Cell Biology*. 2017;19(11):1336-1347. doi:10.1038/ncb3625

91. Yamazaki K, Allen TD. Ultrastructural and morphometric alterations in bone marrow stromal tissue after 7 Gy irradiation. *Blood Cells*. 1991;17(3):527-549.
92. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-263. doi:10.1038/nature08099
93. Zhu R-J, Wu M-Q, Li Z-J, Zhang Y, Liu K-Y. Hematopoietic recovery following chemotherapy is improved by BADGE-induced inhibition of adipogenesis. *Int J Hematol*. 2013;97(1):58-72. doi:10.1007/s12185-012-1233-4
94. Poloni A, Maurizi G, Serrani F, et al. Molecular and functional characterization of human bone marrow adipocytes. *Experimental Hematology*. 2013;41(6):558-566.e2. doi:10.1016/j.exphem.2013.02.005
95. Mattiucci D, Maurizi G, Izzi V, et al. Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival. *Journal of Cellular Physiology*. 2018;233(2):1500-1511. doi:10.1002/jcp.26037
96. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
97. Ferrucci L, Giallauria F, Guralnik JM. Epidemiology of Aging. *Radiologic Clinics of North America*. 2008;46(4):643-652. doi:10.1016/j.rcl.2008.07.005
98. Jaul E, Barron J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Frontiers in Public Health*. 2017;5. doi:10.3389/fpubh.2017.00335
99. Bandaranayake T, Shaw AC. Host Resistance and Immune Aging. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2016;32(3):415-432. doi:10.1016/j.cger.2016.02.007
100. Bowen DT. Etiology of Acute Myeloid Leukemia in the Elderly. *Seminars in Hematology*. 2006;43(2):82-88. doi:10.1053/j.seminhematol.2006.01.005
101. Chronic Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts. Accessed February 5, 2020. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmyle.html>
102. de Haan G, Nijhof W, Van Zant G. Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood*. 1997;89(5):1543–1550.
103. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(26):9194-9199. doi:10.1073/pnas.0503280102
104. Florian MC, Dörr K, Niebel A, et al. Cdc42 Activity Regulates Hematopoietic Stem Cell Aging and Rejuvenation. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):520-530. doi:10.1016/j.stem.2012.04.007
105. Florian MC, Nattamai KJ, Dörr K, et al. A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature*. 2013;503(7476):392-396. doi:10.1038/nature12631

106. Kuranda K, Vargaftig J, de la Rochere P, et al. Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells: Aging of human HSC. *Aging Cell*. 2011;10(3):542-546. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00675.x
107. Adelman ER, Huang H-T, Roisman A, et al. Aging Human Hematopoietic Stem Cells Manifest Profound Epigenetic Reprogramming of Enhancers That May Predispose to Leukemia. *Cancer Discov*. 2019;9(8):1080-1101. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1474
108. Woolthuis CM, Mariani N, Verkaik-Schakel RN, et al. Aging Impairs Long-Term Hematopoietic Regeneration after Autologous Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2014;20(6):865-871. doi:10.1016/j.bbmt.2014.03.001
109. Pang WW, Price EA, Sahoo D, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *PNAS*. 2011;108(50):20012-20017. doi:10.1073/pnas.1116110108
110. Rundberg Nilsson A, Soneji S, Adolfsson S, Bryder D, Pronk CJ. Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. Eaves CJ, ed. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0158369. doi:10.1371/journal.pone.0158369
111. Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood*. 2008;111(12):5553-5561. doi:10.1182/blood-2007-11-123547
112. Grover A, Sanjuan-Pla A, Thongjuea S, et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. *Nature Communications*. 2016;7(1). doi:10.1038/ncomms11075
113. Geiger H, de Haan G, Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(5):376-389. doi:10.1038/nri3433
114. Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2011;208(13):2691-2703. doi:10.1084/jem.20111490
115. Köhler A, Schmithorst V, Filippi M-D, et al. Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood*. 2009;114(2):290-298. doi:10.1182/blood-2008-12-195644
116. Xing Z, Ryan MA, Daria D, et al. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood*. 2006;108(7):2190-2197. doi:10.1182/blood-2005-12-010272
117. Chambers SM, Shaw CA, Gatzka C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging Hematopoietic Stem Cells Decline in Function and Exhibit Epigenetic Dysregulation. Dillin A, ed. *PLoS Biol*. 2007;5(8):e201. doi:10.1371/journal.pbio.0050201
118. Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*. 2013;12(2):661-684. doi:10.1016/j.arr.2012.02.001

119. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Søreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing: Molecular and biological hallmarks of ageing. *British Journal of Surgery*. 2016;103(2):e29-e46. doi:10.1002/bjs.10053
120. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003;421(6921):436-440. doi:10.1038/nature01408
121. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007;447(7145):725-729. doi:10.1038/nature05862
122. Rube CE, Fricke A, Widmann TA, et al. Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17487. doi:10.1371/journal.pone.0017487
123. Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13(9):579-590. doi:10.1038/nrm3420
124. Kerber RA, O'Brien E, Cawthon RM. Gene expression profiles associated with aging and mortality in humans. *Aging Cell*. 2009;8(3):239-250. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00467.x
125. Yang L, Zheng Y. Cdc42: a signal coordinator in hematopoietic stem cell maintenance. *Cell Cycle*. 2007;6(12):1445-1450.
126. Ho TT, Warr MR, Adelman ER, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature*. 2017;543(7644):205-210. doi:10.1038/nature21388
127. Mohrin M, Shin J, Liu Y, et al. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science*. 2015;347(6228):1374-1377. doi:10.1126/science.aaa2361
128. de Haan G, Lazare SS. Aging of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2018;131(5):479-487. doi:10.1182/blood-2017-06-746412
129. Beerman I, Rossi DJ. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell aging. *Experimental Cell Research*. 2014;329(2):192-199. doi:10.1016/j.yexcr.2014.09.013
130. Beerman I, Bock C, Garrison BS, et al. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):413-425. doi:10.1016/j.stem.2013.01.017
131. Sun D, Luo M, Jeong M, et al. Epigenomic Profiling of Young and Aged HSCs Reveals Concerted Changes during Aging that Reinforce Self-Renewal. *Cell Stem Cell*. 2014;14(5):673-688. doi:10.1016/j.stem.2014.03.002
132. Ergen AV, Boles NC, Goodell MA. Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood*. 2012;119(11):2500-2509. doi:10.1182/blood-2011-11-391730
133. Tuljapurkar SR, McGuire TR, Brusnahan SK, et al. Changes in human bone marrow fat content associated with changes in hematopoietic stem cell numbers and cytokine levels

with aging: Fat, stem cells, cytokines and aging. *Journal of Anatomy*. 2011;219(5):574-581. doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01423.x

134. Vas V, Senger K, Dörr K, Niebel A, Geiger H. Aging of the Microenvironment Influences Clonality in Hematopoiesis. Wagner W, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(8):e42080. doi:10.1371/journal.pone.0042080
135. Saçma M, Pospiech J, Bogeska R, et al. Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing. *Nat Cell Biol*. 2019;21(11):1309-1320. doi:10.1038/s41556-019-0418-y
136. Maryanovich M, Zahalka AH, Pierce H, et al. Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat Med*. 2018;24(6):782-791. doi:10.1038/s41591-018-0030-x
137. Singh L, Brennan TA, Russell E, et al. Aging alters bone-fat reciprocity by shifting in vivo mesenchymal precursor cell fate towards an adipogenic lineage. *Bone*. 2016;85:29-36. doi:10.1016/j.bone.2016.01.014
138. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*. 2001;2(3):165-171. doi:10.1023/a:1011513223894
139. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, et al. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2017;20(6):771-784.e6. doi:10.1016/j.stem.2017.02.009
140. Brusnahan SK, McGuire TR, Jackson JD, et al. Human blood and marrow side population stem cell and Stro-1 positive bone marrow stromal cell numbers decline with age, with an increase in quality of surviving stem cells: Correlation with cytokines. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2010;131(11-12):718-722. doi:10.1016/j.mad.2010.10.002
141. Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*. 2008;7(3):335-343. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00377.x
142. Maijenburg MW, Kleijer M, Vermeul K, et al. The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. *Haematologica*. 2012;97(2):179-183. doi:10.3324/haematol.2011.047753
143. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2008;129(3):163-173. doi:10.1016/j.mad.2007.12.002
144. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Age-dependent Wnt gene expression in bone and during the course of osteoblast differentiation. *AGE*. 2008;30(4):273-282. doi:10.1007/s11357-008-9069-9
145. Stenderup K. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells,. *Bone*. 2003;33(6):919-926. doi:10.1016/j.bone.2003.07.005

146. O'Hagan-Wong K, Nadeau S, Carrier-Leclerc A, et al. Increased IL-6 secretion by aged human mesenchymal stromal cells disrupts hematopoietic stem and progenitor cells' homeostasis. *Oncotarget*. 2016;7(12):13285-13296. doi:10.18632/oncotarget.7690
147. Griffith JF, Yeung DKW, Ma HT, Leung JCS, Kwok TCY, Leung PC. Bone marrow fat content in the elderly: A reversal of sex difference seen in younger subjects. *J Magn Reson Imaging*. 2012;36(1):225-230. doi:10.1002/jmri.23619
148. Miggitsch C, Meryk A, Naismith E, et al. Human bone marrow adipocytes display distinct immune regulatory properties. *EBioMedicine*. Published online July 18, 2019. doi:10.1016/j.ebiom.2019.07.023
149. Flores-Figueroa E, Gratzinger D. Beyond the Niche: Myelodysplastic Syndrome Topobiology in the Laboratory and in the Clinic. *IJMS*. 2016;17(4):553. doi:10.3390/ijms17040553
150. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors and CXCL12<sup>+</sup> CD271<sup>+</sup> mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Laboratory Investigation*. 2012;92:12.
151. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 2013;502(7473):637-643. doi:10.1038/nature12612
152. Frisch BJ, Hoffman CM, Latchney SE, et al. Aged marrow macrophages expand platelet-biased hematopoietic stem cells via interleukin-1B. *JCI Insight*. 2019;4(10). doi:10.1172/jci.insight.124213
153. Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K. Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2000;117(1-3):57-68. doi:10.1016/S0047-6374(00)00137-8
154. Guezguez B, Campbell CJV, Boyd AL, et al. Regional Localization within the Bone Marrow Influences the Functional Capacity of Human HSCs. *Cell Stem Cell*. 2013;13(2):175-189. doi:10.1016/j.stem.2013.06.015
155. Johnson RC, Kurzer JH, Greenberg PL, Gratzinger D. Mesenchymal Stromal Cell Density Is Increased in Higher Grade Myelodysplastic Syndromes and Independently Predicts Survival. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014;142(6):795-802. doi:10.1309/AJCP71OPHKOTLSUG
156. Berry R, Church CD, Gericke MT, Jeffery E, Colman L, Rodeheffer MS. Imaging of adipose tissue. *Meth Enzymol*. 2014;537:47-73. doi:10.1016/B978-0-12-411619-1.00004-5
157. Chang Q, Ornatsky O, Hedley D. Staining of Frozen and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues with Metal-Labeled Antibodies for Imaging Mass Cytometry Analysis. *Current Protocols in Cytometry*. 2017;82(1). doi:10.1002/cpcy.29
158. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457-462. doi:10.1038/nature10783

159. Chang Q, Ornatsky OI, Siddiqui I, Straus R, Baranov VI, Hedley DW. Biodistribution of cisplatin revealed by imaging mass cytometry identifies extensive collagen binding in tumor and normal tissues. *Scientific Reports*. 2016;6(1):36641. doi:10.1038/srep36641
160. Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood*. 2008;111(12):5553-5561. doi:10.1182/blood-2007-11-123547
161. Sun L, Brown R, Chen S, Zhuge Q, Su D-M. Aging induced decline in T-lymphopoiesis is primarily dependent on status of progenitor niches in the bone marrow and thymus. *aging*. 2012;4(9):606-619. doi:10.18632/aging.100487
162. Jmili NB, Nsaibia S, Jacob M, et al. Immunophenotypic Analysis of Bone Marrow B Lymphocyte Precursors (Hématogones) by Flow Cytometry. :8.
163. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-834. doi:10.1038/nature09262
164. Tormin A, Li O, Brune JC, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*. 2011;117(19):5067-5077. doi:10.1182/blood-2010-08-304287
165. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. :8.
166. Wilson A, Fu H, Schiffrin M, et al. Lack of Adipocytes Alters Hematopoiesis in Lipodystrophic Mice. *Front Immunol*. 2018;9:2573. doi:10.3389/fimmu.2018.02573
167. Aglietta M, Pasquino P, Sanavio F, et al. Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: Target cells and kinetics of response in vivo. *STEM CELLS*. 1993;11(S2):83-87. doi:10.1002/stem.5530110814
168. Cuminetti V, Arranz L. Bone Marrow Adipocytes: The Enigmatic Components of the Hematopoietic Stem Cell Niche. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(5):707. doi:10.3390/jcm8050707
169. Zhang Z, Huang Z, Ong B, Sahu C, Zeng H, Ruan H-B. Bone marrow adipose tissue-derived stem cell factor mediates metabolic regulation of hematopoiesis. *Haematologica*. Published online February 21, 2019;haematol.2018.205856. doi:10.3324/haematol.2018.205856
170. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
171. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
172. Fali T, Fabre-Mersseman V, Yamamoto T, et al. Elderly human hematopoietic progenitor cells express cellular senescence markers and are more susceptible to pyroptosis. *JCI Insight*. 2018;3(13). doi:10.1172/jci.insight.95319

173. Baldrige MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends in Immunology*. 2011;32(2):57-65. doi:10.1016/j.it.2010.12.003
174. Hakuno F, Takahashi S-I. 40 YEARS OF IGF1: IGF1 receptor signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2018;61(1):T69-T86. doi:10.1530/JME-17-0311
175. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*. 2009;122(20):3589-3594. doi:10.1242/jcs.051011
176. Baksh D, Tuan RS. Canonical and non-canonical wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2007;212(3):817-826. doi:10.1002/jcp.21080
177. Stenderup K. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells,. *Bone*. 2003;33(6):919-926. doi:10.1016/j.bone.2003.07.005
178. Dexheimer V, Mueller S, Braatz F, Richter W. Reduced Reactivation from Dormancy but Maintained Lineage Choice of Human Mesenchymal Stem Cells with Donor Age. Capogrossi MC, ed. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e22980. doi:10.1371/journal.pone.0022980

## Anexos

### Anexo 1 Aprobación Ética del Protocolo

SIRELCIS

Página 1 de 1



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

20 de noviembre del 2012

Ref. 09-B5-61-2800/201100/ 2545

Dr. Flores Figueroa Eugenia  
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas Siglo XXI  
Nivel Central

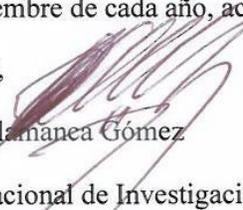
Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Estudio comparativo del nicho hematopoyético reticular de la médula ósea murina y humana**, fue sometido a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales de la Comisión de Ética y Científica, se ha emitido el dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: R-2012-785-092.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar a esta Comisión en los meses de Junio y Diciembre de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente,

  
Dr. Fabio Salamanca Gómez  
Presidente  
Comisión Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:

 JMM/iah. F-CNIC-2012-28

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ext. 21210 [causa@cis.gob.mx](mailto:causa@cis.gob.mx)



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

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

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

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

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

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

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

Anexo 3 Anticuerpos utilizados para IHQ

Anticuerpo	Especie	Clona	Marca	Catalogo
<b>CD34</b>	Conejo	EP373Y	Genetex	EP373Y
<b>Pax5</b>	Conejo	EPR3730	Abcam	ab109443
<b>CD3</b>	Conejo	poly rabbit C-term	Fluidigm	3170019D
<b>CD20</b>	Ratón	H1	Fluidigm	3161029D
<b>Mieloperoxidasa</b>	Conejo	Policlonal	Abcam	ab9535
<b>E-caderina</b>	Conejo	24E10	Fluidigm	3158029D
<b>CD31</b>	Ratón	C31.3+C31.7+C31.10	LSBio	LS-C390863
<b>CD68</b>	Ratón	CloneKP1	Fluidigm	3159035D
<b>CD163</b>	Conejo	Policlonal	Abcam	ab87099
<b>NGFR</b>	Conejo	EP1039Y	Biogenex	NU522-UC
<b>Perilipina</b>	Conejo	Policlonal	Abcam	ab3526
<b>Osteocalcina</b>	Conejo	Policlonal	Millipore	AB10911
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Ratón	1A4	Fluidigm	3141017D

## Human Aging Alters the Spatial Organization between CD34+ Hematopoietic Cells and Adipocytes in Bone Marrow

Alicia G. Aguilar-Navarro,<sup>1</sup> Berenice Meza-León,<sup>1</sup> Dita Gratzinger,<sup>2</sup> Fany G. Juárez-Aguilar,<sup>3</sup> Qing Chang,<sup>4</sup> Olga Ornatsky,<sup>4</sup> Hubert Tsui,<sup>5</sup> Ricardo Esquivel-Gómez,<sup>6</sup> Antonio Hernández-Ramírez,<sup>7</sup> Stephanie Z. Xie,<sup>8</sup> John E. Dick,<sup>8,9,\*</sup> and Eugenia Flores-Figueroa<sup>1,8,\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA

<sup>3</sup>Departamento de Patología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Fluidigm Canada Inc., Markham, ON, Canada

<sup>5</sup>Division of Hematopathology, Sunnybrook Health Sciences Centre, Toronto, ON, Canada

<sup>6</sup>División de Ortopedia, Hospital de Traumatología y Ortopedia Lomas Verdes, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

<sup>7</sup>Unidad de Reemplazo Articular, Hospital de Traumatología y Ortopedia Lomas Verdes, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

<sup>8</sup>Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, Toronto, ON, Canada

<sup>9</sup>Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON M5S 1A8, Canada

\*Correspondence: [jdick@uhnresearch.ca](mailto:jdick@uhnresearch.ca) (J.E.D.), [eugenia.flores-figueroa@uhnresearch.ca](mailto:eugenia.flores-figueroa@uhnresearch.ca) (E.F.-F.)

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.011>

### SUMMARY

Age-related clonal hematopoiesis is a major risk factor for myeloid malignancy and myeloid skewing is a hallmark of aging. However, while it is known that non-cell-autonomous components of the microenvironment can also influence this risk, there have been few studies of how the spatial architecture of human bone marrow (BM) changes with aging. Here, we show that BM adiposity increases with age, which correlates with increased density of maturing myeloid cells and CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) and an increased proportion of HSPCs adjacent to adipocytes. However, NGFR+ bone marrow stromal cell (NGFR+ BMSC) density and distance to HSPCs and vessels remained stable. Interestingly, we found that, upon aging, maturing myeloid cell density increases in hematopoietic areas surrounding adipocytes. We propose that increased adjacency to adipocytes in the BM microenvironment may influence myeloid skewing of aging HSPCs, contributing to age-related risk of myeloid malignancies.

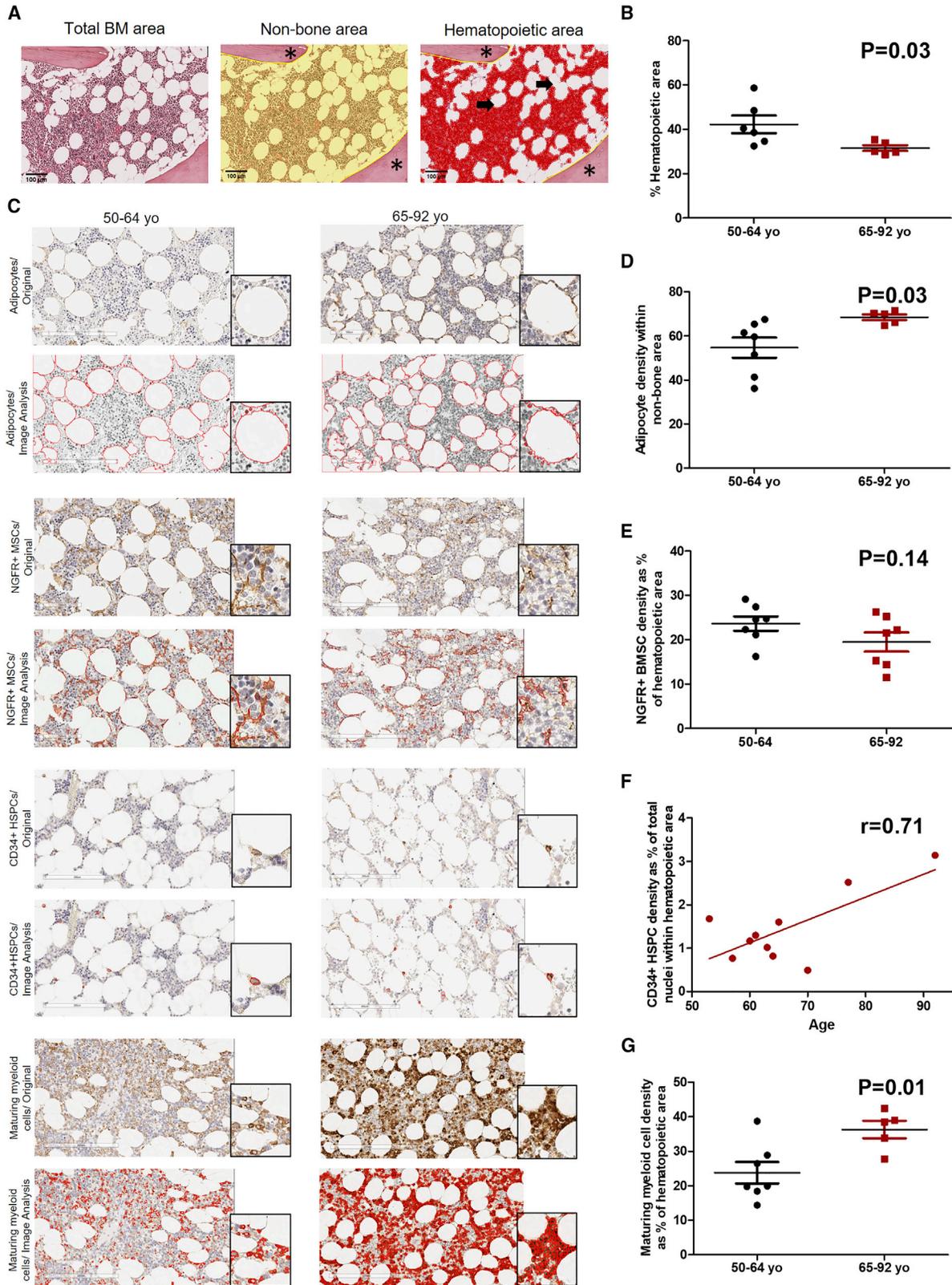
### INTRODUCTION

The frequency of somatic mutations and clonal hematopoiesis, known risk factors of hematological cancer, increase dramatically with aging (Jaiswal and Ebert, 2019; Steensma and Ebert, 2020). Numerous mouse studies have shown that hematopoietic stem cells (HSCs) lose their repopulation capacity while increasing their quiescence and frequency with aging (de Haan et al., 1997; Rossi et al., 2005). Aging also favors myeloid, megakaryocytic, and erythroid over lymphoid lineages (Cho et al., 2008; Rundberg Nilsson et al., 2016), which has been linked to the influence of intrinsic (Beerman et al., 2010; Chambers et al., 2007; Rossi et al., 2005) and microenvironmental factors (Ergen et al., 2012; Lee et al., 2019; Vas et al., 2012). In mouse models, bone marrow (BM) microenvironmental populations that have been reported to be essential for hematopoietic regulation include osteoblasts, endothelial cells, bone marrow stromal cells (BMSCs), and adipocytes (Acar et al., 2015; Ding et al., 2012; Ding and Morrison, 2013; Zhou et al., 2017). Aging-associated changes in these populations result in changes in BM architecture, including vascular remodeling (Maryanovich et al., 2018; Saçma et al., 2019), decreases in trabecular area, and increases in adipocyte area (Singh et al., 2016). In contrast, BMSC frequency has been reported

to remain stable in mouse BM with aging (Maryanovich et al., 2018; Saçma et al., 2019).

In humans, aging studies are limited by sample availability of benign BM. Furthermore, many studies compared older adult BM with pediatric groups obscuring possible differences between middle-aged and older adults; a key age range when the incidence of myeloid neoplasia markedly increases. Samples from oncologic patients (staging marrows) are often included that may not reflect normal individuals (Ogawa et al., 2000). Functional studies have found epigenetic and genetic changes of human aged HSCs (Pang et al., 2011; Rundberg Nilsson et al., 2016; Sun et al., 2014). However, these reports on the effect of aging on myeloid-lymphoid lineage skewing are few and showed contradictory findings. Although, there is an evident decline of lymphoid lineages (Kuranda et al., 2011; Pang et al., 2011; Rundberg Nilsson et al., 2016), changes within the myeloid lineage with age are less clear, as a decline or no effect has been reported (Kuranda et al., 2011; Pang et al., 2011). While older individuals show an increase in BM adipocytes (Justesen et al., 2001), the reports on BMSCs are not consistent (Maijenburg et al., 2012; Zhou et al., 2008).

To date, it remains unknown whether age-related changes occur in human CD34+ hematopoietic stem and



(legend on next page)



progenitor cells (HSPCs) and their myeloid progeny in the BM microenvironment. Here, we report a systematic comparison of the frequency and location of maturing myeloid and CD34+ HSPCs with respect to the marrow microenvironment composed of adipocytes, vessels, and BMSCs of hematologically normal BM from individuals aged from 50 to 92 years.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Aging Alters BM Architecture by Increasing Adipocytes, CD34+ HSPCs, and Maturing Myeloid Cells

Two BM regions were defined to quantify and compare the different BM cell populations between middle-aged (50–64 years) and older adults (65–92 years). These regions were non-bone area, which excludes artifacts and trabeculae; and hematopoietic area (parenchyma), corresponding to the non-bone/non-adipocytic region, which is recognized by hematoxylin stain (Figure 1A). Non-bone area was used to quantify adipocytes and the hematopoietic area was used to quantify the rest of the BM cell populations. Cell markers were selected according to their specificity and sensitivity. Myeloperoxidase (MPO) was used for maturing myeloid cells (Tsuruta et al., 1999); CD34 was selected for HSPC detection, as it identifies all HSPCs, including HSCs and myeloid and lymphoid progenitors (Bhatia et al., 1997). Adipocytes were identified using perilipin (Boyd et al., 2017); and, for BMSCs, low-affinity nerve growth factor receptor (NGFR) was used. NGFR was chosen due to strong *in vitro* and *in situ* evidence that this marker highlights BMSCs (Quirici et al., 2002; Tormin et al., 2011). Systematic scoring and image analysis of middle-aged and older adult BM showed a statistically significant decrease in hematopoietic area (Figure 1B) and an increase in adipocytic content in older adult BM (Figures 1C and 1D). Both age groups have the same density of NGFR+ BMSCs (Figures 1C and 1E). Middle-aged and older adult BM showed no difference on the percentage of CD34+ HSPCs, measured as the percentage of

CD34+ cells over total nuclei within the hematopoietic area ( $p = 0.14$ , data not shown). However, a strong positive correlation was found between CD34+ HSPCs and age (Figures 1C and 1F). Moreover, an increase in maturing myeloid cells, was observed in the hematopoietic area of BM of older adults (Figures 1C and 1G). To determine if the increase in maturing myeloid cells in the BM of older adults, is also seen in peripheral blood, peripheral blood counts from both groups were compared. We found an increase in total myeloid cells and a decrease in lymphoid cells in the older adult group (Table 1). Our findings confirm previous studies that reported an increase in HSPCs (Kuranda et al., 2011; Pang et al., 2011; Rundberg Nilsson et al., 2016). However, in contrast to our results, these studies did not find an increase in myeloid cells. While previous reports used flow cytometry to detect committed progenitors, our study measured maturing myeloid cells *in situ* by IHC.

### CD34+ HSPCs Are Immediately Adjacent to Adipocytes Maintaining Perivascular Location in Middle-Aged and Older Adult Human BM

Given the increased number of CD34+ HSPCs and adipocytes in the BM of older adults, we determined if there was an association between these two populations. We confirmed a positive correlation between the density of adipocytes and CD34+ HSPCs in samples from both groups (Figure 2A). Furthermore, we observed CD34+ HSPCs located immediately adjacent to adipocytes (Figure 2B). Interestingly, we found a statistically significant increase in the percentage of CD34+ HSPCs immediately adjacent to adipocytes in the older adult group (Figures 2B and 2C). Given the increased adipocyte content in the BM of older adults, we also tested whether a single adipocyte could make contact with more than one CD34+ HSPC. Interestingly, we found a higher number of adipocytes immediately adjacent to more than one CD34+ HSPC in older individuals (Figure 2D).

Functional studies using mouse models have shown that BMSCs are key components of the hematopoietic stem cell

### Figure 1. Aged Human BM Shows an Increased Density of Adipocytes, CD34+ HSPCs, and Maturing Myeloid Cells

- (A) Representative images of an H&E stain of a middle-aged adult BM (total bone marrow area) and quantification of non-bone and hematopoietic area. Non-bone area (yellow area) excluding trabeculae (asterisk). Hematopoietic area (red area) excluding trabeculae (asterisk) and adipocytes (arrow). Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . IHC staining, DAB; counterstain, hematoxylin. 20 $\times$  magnification.
- (B) Percentage of BM hematopoietic area in both age groups: 50–64 years ( $n = 7$ ) versus 65–92 years ( $n = 5$ ),  $p = 0.03$ .
- (C) Representative IHC images (original) of adipocytes, NGFR+ BMSCs, CD34+ HSPCs, and maturing myeloid cells in BM biopsies from hematologically healthy patients aged 50–64 and 65–92 years. Each image is accompanied by its objects' identification outline image produced by CellProfiler (Image Analysis). Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ .
- (D) Adipocyte density in patients aged 50–64 years ( $n = 7$ ) and 65–92 years ( $n = 5$ ).  $p = 0.03$ .
- (E) NGFR+ BMSC density: 50–64 years ( $n = 7$ ) versus 65–92 years ( $n = 7$ ),  $p = 0.14$ .
- (F) Association between CD34+ HSPCs and age. Pearson correlation test,  $r = 0.71$ ,  $n = 10$ .
- (G) Maturing myeloid cell density: 50–64 ( $n = 7$ ) and 65–92 years ( $n = 5$ ),  $p = 0.01$ .



**Table 1. Peripheral Blood Parameters from Hematologically Healthy Patients Aged 50–92 Years**

Age Groups	Leukocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	Myeloid Cells (10 <sup>3</sup> /μL)	Neutrophils (10 <sup>3</sup> /μL)	Monocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	Lymphocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	Erythrocytes (10 <sup>3</sup> /μL)	Hematocrit (%)	Platelets (10 <sup>3</sup> /μL)
50–64 years (n = 28)	7.15 ± .59	4.92 ± .39	4.21 ± 0.38	0.52 ± 0.04	2.26 ± 0.14	4.62 ± 0.08	40.67 ± 0.74	254.1 ± 11.09
65–92 years (n = 30)	8.36 ± .73	6.54 ± .55	5.70 ± 0.53	0.64 ± 0.04	1.78 ± 0.13	4.55 ± 0.09	41.16 ± 0.80	274.6 ± 15.37
p values	0.21	0.02	0.02	0.04	0.01	0.58	0.66	0.28

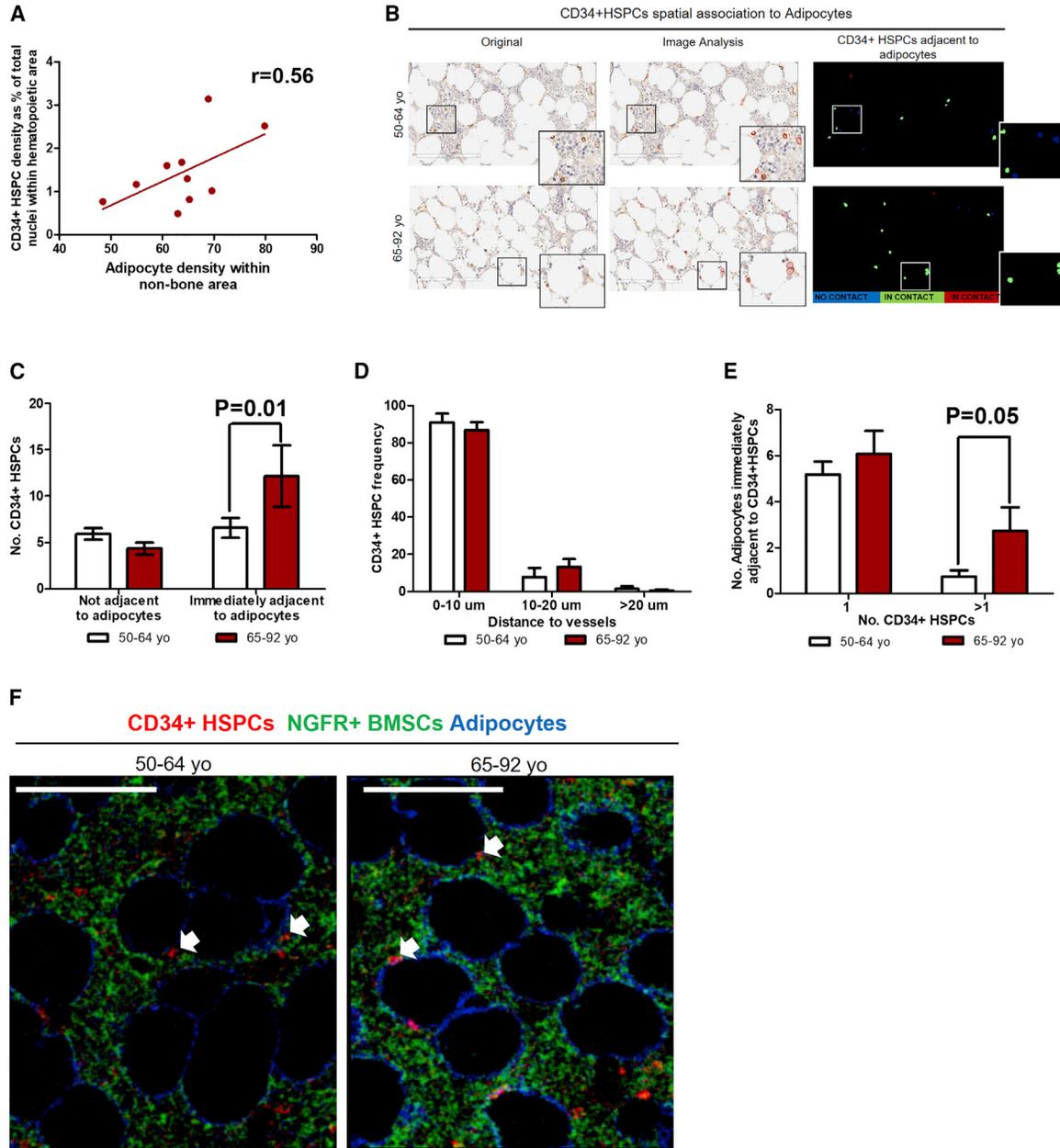
niche (Ding et al., 2012); and in humans it has been reported that more than 80% of CD34+ HSPCs are in close contact to NGFR+ BMSCs in perivascular areas (Flores-Figueroa et al., 2012). Therefore, we assessed whether the increased association of CD34+ HSPCs to adipocytes in older adults had an impact on their perivascular distribution and contact with NGFR+ BMSCs. We found that CD34+ HSPCs in human BM, from both groups, are located in perivascular areas, with >80% of HSPCs located <10 μm from the closest blood vessel, with no differences between age groups (Figure 2E). Using imaging mass cytometry (IMC) technology, we found that, in all samples analyzed from both age groups, CD34+ HSPCs remained in close contact to NGFR+ BMSCs (Figure 2F).

### Aging Increases Maturing Myeloid Cell Density Surrounding Adipocytes

We next assessed whether there was an association between the density of maturing myeloid cells and adipocytes and found only a weak positive association (Figure 3A). However, given that both cell populations are increased with aging, we studied whether maturing myeloid cells preferentially locate closer to adipocytes. We analyzed maturing myeloid cell density in the immediate hematopoietic area surrounding adipocytes (within one cell distance from adipocyte membrane) and in the parenchyma (at least two-cell distance from adipocyte membrane) (Figure 3B, middle panel). Using image analysis software, we quantified maturing myeloid cell density in the above-mentioned areas of BM from middle-aged and older adult groups (Figure 3B, lower panel). Maturing myeloid cells distribute equally in both hematopoietic areas in both age groups (Figure 3C). However, we found a higher density of maturing myeloid cells surrounding adipocytes in the older adult group in comparison with the middle-aged group (Figure 3C). Such difference was not observed when comparing parenchyma areas of both age groups, suggesting that increases in maturing myeloid cell density associated to aging occur in the hematopoietic areas close to adipocytes. Our results support recent findings suggesting that adipocytes are the niche cells for myelopoiesis (Boyd et al., 2017).

Based on the increases that we found in CD34+ HSPCs and maturing myeloid cells surrounding adipocytes with aging, we next assessed whether CD34+ HSPCs adjacent to adipocytes were also close to maturing myeloid cells. Using IMC technology, we identified CD34+ HSPCs that were both adjacent to adipocytes and maturing myeloid cells in BM samples from both age groups (Figure 3D). Consequently, we calculated the percentage of CD34+ HSPCs adjacent to adipocytes that were also adjacent to maturing myeloid cells in both age groups (50–64 years, n = 2; 65–92 years, n = 3). In all samples analyzed, >70% of CD34+ HSPCs adjacent to adipocytes were adjacent to maturing myeloid cells (Figure 3E). The increased association of CD34+ HSPCs to adipocytes with aging and the spatial association of myeloid cells with adipocytes suggests that adipocytes may be favoring myeloid differentiation (Figure 3E).

Our study refines the location of CD34+ HSPCs in humans across the spectrum of middle-aged to elderly BM. We showed that CD34+ HSPCs are located in a perivascular area and in close contact to NGFR+ BMSCs across all age groups, but there was increased association with adipocytes in older age groups. To our knowledge, this is the first report that locates CD34+ HSPCs immediately adjacent to adipocytes and highlights that aging correlates with changes in the location of CD34+ HSPCs in humans. This result highlights the importance of human studies, since adipocytes are underrepresented in mouse models (Flores-Figueroa and Gratzinger, 2016), which tend to rely on nearly adipocyte-free mouse femurs. While some previous studies suggested a negative role for adipocytes as regulators of the hematopoietic microenvironment (Naveiras et al., 2009), there is now accumulating evidence pointing to adipocytes as positive regulators by promoting the regeneration of HSCs (Zhou et al., 2017) and playing an important role in HSPC mobilization (Wilson et al., 2018). Our findings refine a periadipocytic/perivascular location of CD34+ HSPCs in humans that increases with aging (Figure 3F). The increased mature myeloid output that correlates with these findings raises the idea that these age-related changes in the interplay of HSPCs to their microenvironment may influence myeloid skewing and the attendant risk of myeloid malignancy.



**Figure 2. Human Aging Is Associated with Increased Adjacency between CD34+ HSPCs and Adipocytes**

(A) Positive correlation between adipocytes and CD34+ HSPCs. Pearson correlation test,  $r = 0.56$ ,  $n = 10$ .

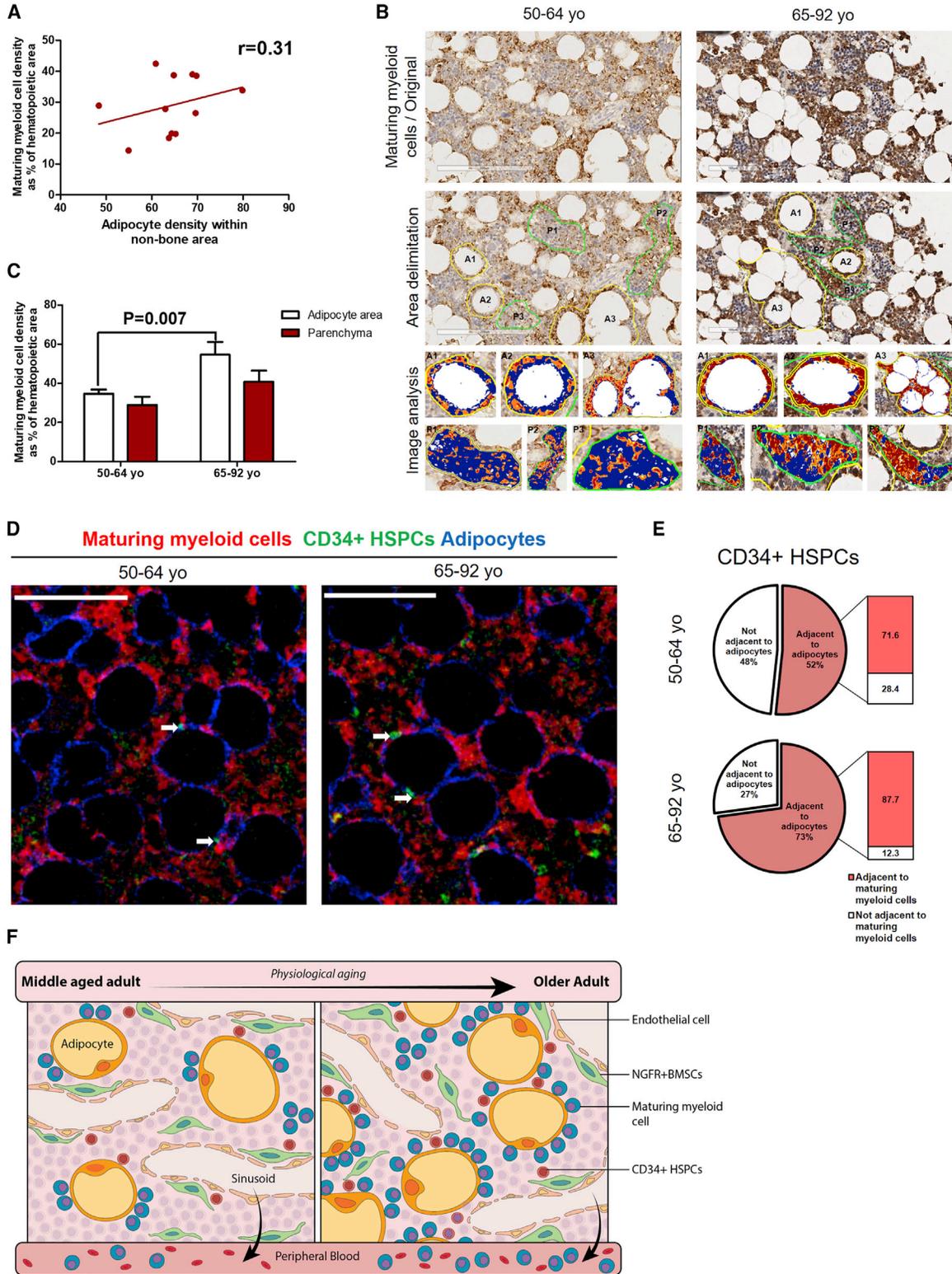
(B) Representative images of CD34+ HSPCs spatially associated with adipocytes in BM biopsies from hematologically healthy patients aged 50–64 and 65–92 years. From left to right, CD34+ HSPCs IHC image, CD34+ objects' detection image and digitalized image showing cells not adjacent (in blue) and immediately adjacent to adipocytes (in green and red). Scale bar, 200  $\mu$ m.

(C) Bar graph showing number of CD34+ HSPCs not adjacent and immediately adjacent to adipocytes: 50–64 years ( $n = 6$ ) versus 65–92 years ( $n = 4$ ), two-way ANOVA,  $p = 0.01$ , unpaired t test, immediately adjacent to adipocytes,  $p = 0.01$ .

(D) Bar graph showing number of adipocytes immediately adjacent to 1 or >1 CD34+ HSPCs: 50–64 years ( $n = 6$ ) versus 65–92 years ( $n = 4$ ), two-way ANOVA  $p = 0.052$ , unpaired t test, >1 in both age groups,  $p = 0.05$ .

(E) Bar graph showing CD34+ HSPC distance to vessels. Graph representing percentage of CD34+ HSPCs at a distance of 0–10, 10–20, and >20  $\mu$ m from vessels: 50–64 years ( $n = 3$ ) versus 65–92 years ( $n = 3$ ), two-way ANOVA  $p = 0.27$ .

(F) Representative IMC images showing an overlay of CD34+ HSPCs (red channel), NGFR+ BMSCs (green channel), and adipocytes (blue channel) in BM biopsies from hematologically healthy patients aged 50–64 ( $n = 2$ ) and 65–92 years ( $n = 3$ ). Scale bar, 100  $\mu$ m. Adjacency between CD34+ HSPCs, NGFR+ BMSCs, and adipocytes are indicated by white arrows.



(legend on next page)



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### BM Samples

Femoral heads were collected from non-hematological, non-oncological patients aged 50 to 92 years ( $n = 58$ ), undergoing hip replacement surgery at the Traumatology and Orthopedics Hospital Lomas Verdes (IMSS), Mexico. Ethical approval was obtained from IMSS institutional review board (R-2012-785-092). Clinical data from patients were retrieved.

### Histology and Immunohistochemistry

Femoral heads were fixed in 10% formaldehyde. BM pieces of 2–3 cm in length were cut from the femoral neck and decalcified in 12% EDTA/PBS (pH 8; Sigma-Aldrich) solution for 10 days, then dehydrated and paraffin-embedded (Paraplast, Leica Biosystems) using a Multifunctional Tissue Processor KOS (Milestone). All samples were evaluated by two independent hematopathologists. A total of 75% of samples were excluded due to identified dysplasia of any of the hematopoietic lineages or lack of hematopoietic tissue present. IHC staining was performed as described previously (Flores-Figueroa et al., 2012). Antigen retrieval was performed using citrate buffer solution (pH 6; Sigma-Aldrich) with 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) at 110°C for 5 min using KOS (Milestone). Primary antibodies used were the following: MPO, rabbit, 1:250 (polyclonal/Abcam); Perilipin, rabbit, 1:1,000 (polyclonal/Abcam); NGFR, rabbit, 1:50 (clone EP1039Y/Biogenex), and CD34, rabbit, 1:5,000 (clone EP373Y/Genetex). Secondary antibody kit used was anti-rabbit (Vector Laboratories).

### Image Analysis

Slides were scanned using Aperio CS2 (Leica Biosystems). Three 20 $\times$  field images per sample were analyzed. For NGFR and adipocytes previous published pipelines were used (Berry et al., 2014; Johnson et al., 2014). For CD34 and MPO, pipelines were created and are available in <https://github.com/Alicia-AguilarN/Cell-Profiler-pipelines>. For CD34+ HSPC and adipocyte spatial association analysis, a pipeline with neighbor analysis module was created, which is also available in <https://github.com/Alicia-AguilarN/Cell-Profiler-pipelines>. ImageJ software was used to

measure distance between CD34+ HSPCs and vessels and for manual quantification of CD34+ HSPCs adjacent to both adipocytes and NGFR+ BMSCs and maturing myeloid cells and adipocytes. For quantification of positive area of maturing myeloid cells surrounding adipocytes and parenchyma, positive pixel count algorithm was used in Image Scope software (Leica Biosystems).

### IMC

IMC staining and ablation was carried out as reported previously (Chang et al., 2017). Antibodies used for IMC staining were CD34-158Gd (1:100), Perilipin-142Nd (1:100), NGFR-160Gd (1:50), and MPO-146Nd (1:2,000). Overlaid images were obtained using Wolfram Mathematica v.10.3 software (Fluidigm). Images were contrast-enhanced by Adobe photoshop only for visualization purposes.

### Statistics

Statistics were performed using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad software, La Jolla, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). For two-group comparisons, unpaired t test was used. For multiple comparisons, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test were performed. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM. Correlation analysis were performed using Pearson correlation test.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, A.G.A.-N., D.G., J.E.D., and E.F.-F.; Investigation, A.G.A.-N., B.M.-L., D.G., F.G.J.-A., and Q.C.; Clinical Investigation, R.E.-G. and A.H.-R.; Data Analysis, A.G.A.-N., D.G., Q.C., O.O., H.T., and S.Z.X.; Writing – Original Draft, A.G.A.-N. and E.F.-F.; Writing – Review & Editing, A.G.A.-N., D.G., S.Z.X., O.O., J.E.D., and E.F.-F.; Review and Final Approval, A.G.A.-N., J.E.D., D.G., S.Z.X., E.F.-F., B.M.-L., D.G., F.G.J.-A., Q.C., R.E.-G., and A.H.-R.; Funding Acquisition, Resources, and Supervision, J.E.D. and E.F.-F.

### CONFLICTS OF INTEREST

Q.C. and O.O. are employees of Fluidigm Inc. The authors declare no competing financial interests.

### Figure 3. Human Aging Increases Maturing Myeloid Cell Density in Hematopoietic Areas Surrounding Adipocytes

- (A) Weak correlation between adipocytes and maturing myeloid cell density. Pearson correlation test,  $r = 0.31$ ,  $n = 11$ .
- (B) Representative IHC images of maturing myeloid cells (MPO) (original) in BM biopsies from hematologically healthy patients aged 50–64 and 65–92 years (upper panel). Adipocyte area (A) and parenchyma (P) delimitation for image analysis quantification (middle panel). Image analysis of A and P, showing positive (yellow to red) and negative (blue) areas (lower panel). Scale bar, 200  $\mu\text{m}$ .
- (C) Bar graph showing the density of maturing myeloid cells in adipocyte area and parenchyma of the 50–64-year ( $n = 7$ ) and 65–92-year ( $n = 5$ ) groups. Two-way ANOVA,  $p = 0.002$ , unpaired t test, adipocyte area,  $p = 0.007$ .
- (D) Representative IMC images showing an overlay of maturing myeloid cells (red channel), CD34+ HSPCs (green channel), and adipocytes (blue channel) in BM biopsies from hematologically healthy patients aged 50–64 years ( $n = 2$ ) and 65–92 years ( $n = 3$ ). Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . Adjacency between maturing myeloid cells, CD34+ HSPCs, and adipocytes are indicated by white arrows.
- (E) Diagram showing the percentage of CD34+ HSPCs adjacent to maturing myeloid cells out of percentage of CD34+ HSPCs adjacent to adipocytes in both age groups. Percentage of CD34+ HSPCs adjacent to adipocytes was calculated from IHC analysis and the percentage of CD34+ HSPCs adjacent to both adipocytes and maturing myeloid cells was calculated from IMC analysis.
- (F) Proposed model of physiological aging-related changes in human BM spatial organization. Increasing marrow adiposity correlates with an increased CD34+ HSPC and maturing myeloid density and adjacency with adipocytes, while contact with MSCs and perivascular localization remains unchanged across age groups.



## ACKNOWLEDGMENTS

A.G.A.-N. is a doctoral student from Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, and received fellowship 246604 from CONACyT, México, and Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (99096800). A.G.A.-N. and E.F.-F. received a scholarship from Programa de Cooperación Internacional del Instituto Mexicano del Seguro Social. This work was supported by funds to J.E.D. from the Princess Margaret Cancer Centre Foundation, Ontario Institute for Cancer Research with funding from the Province of Ontario, Canadian Institutes of Health Research, Joint Canada Israel Health Research Program of the IDRC, Canadian Cancer Society Research Institute, Terry Fox Research Institute PPG, and a Canada Research Chair and with funding to E.F.-F. from CONACyT (CB-2012-179417) and Canadian Institutes of Health Research, Joint Canada Israel Health Research Program of the IDRC. This work was carried out with the aid of a grant from the International Development Research Centre, Ottawa, Canada; the views expressed herein do not necessarily represent those of IDRC or its Board of Governors. We thank Monica Reynoso, Victor Pérez, Jorge Anaya, and Fernando Valverde for their technical support. We acknowledge Dr. Patricia Piña and Laboratorio de Microscopía Avanzada IMSS for the use of slide scanners. We thank Queralt Vallmajo-Martin and the Dick laboratory members for the discussion on the paper, especially to Kerstin Kaufman.

Received: February 29, 2020

Revised: June 9, 2020

Accepted: June 10, 2020

Published: July 9, 2020

## REFERENCES

Acar, M., Kocherlakota, K.S., Murphy, M.M., Peyer, J.G., Oguro, H., Inra, C.N., Jaiyeola, C., Zhao, Z., Luby-Phelps, K., and Morrison, S.J. (2015). Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* *526*, 126–130.

Beerman, I., Bhattacharya, D., Zandi, S., Sigvardsson, M., Weissman, I.L., Bryder, D., and Rossi, D.J. (2010). Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *107*, 5465–5470.

Berry, R., Church, C.D., Gericke, M.T., Jeffery, E., Colman, L., and Rodeheffer, M.S. (2014). Imaging of adipose tissue. *Methods Enzymol.* *537*, 47–73.

Bhatia, M., Wang, J.C.Y., Kapp, U., Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *94*, 5320–5325.

Boyd, A.L., Reid, J.C., Salci, K.R., Aslostovar, L., Benoit, Y.D., Shapovalova, Z., Nakanishi, M., Porras, D.P., Almakadi, M., Campbell, C.J.V., et al. (2017). Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1336–1347.

Chambers, S.M., Shaw, C.A., Gatzka, C., Fisk, C.J., Donehower, L.A., and Goodell, M.A. (2007). Aging hematopoietic stem cells decline

in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* *5*, e201.

Chang, Q., Ornatsky, O., and Hedley, D. (2017). Staining of frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with metal-labeled antibodies for imaging mass cytometry analysis. *Curr. Protoc. Cytometry* *82*, 12.47.1–12.47.8.

Cho, R.H., Sieburg, H.B., and Muller-Sieburg, C.E. (2008). A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* *111*, 5553–5561.

Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* *495*, 231–235.

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

Ergen, A.V., Boles, N.C., and Goodell, M.A. (2012). Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood* *119*, 2500–2509.

Flores-Figueroa, E., and Grattinger, D. (2016). Beyond the niche: myelodysplastic syndrome topobiology in the laboratory and in the clinic. *IJMS* *17*, 553.

Flores-Figueroa, E., Varma, S., Montgomery, K., Greenberg, P.L., and Grattinger, D. (2012). Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab. Invest.* *92*, 1330–1341.

de Haan, G., Nijhof, W., and Van Zant, G. (1997). Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. *Blood* *89*, 1543–1550.

Jaiswal, S., and Ebert, B.L. (2019). Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science* *366*, eaan4673.

Johnson, R.C., Kurzer, J.H., Greenberg, P.L., and Grattinger, D. (2014). Mesenchymal stromal cell density is increased in higher grade myelodysplastic syndromes and independently predicts survival. *Am. J. Clin. Pathol.* *142*, 795–802.

Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L., Steiniche, T., and Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* *2*, 165–171.

Kuranda, K., Vargaftig, J., de la Rochere, P., Dosquet, C., Charron, D., Bardin, F., Tonnelle, C., Bonnet, D., and Goodhardt, M. (2011). Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells: aging of human HSC. *Aging Cell* *10*, 542–546.

Lee, G.-Y., Jeong, S.-Y., Lee, H.-R., and Oh, I.-H. (2019). Age-related differences in the bone marrow stem cell niche generate specialized microenvironments for the distinct regulation of normal hematopoietic and leukemia stem cells. *Sci. Rep.* *9*, 1007.

Maijenburg, M.W., Kleijer, M., Vermeul, K., Mul, E.P.J., van Alphen, E.P.J., van der Schoot, C.E., and Voermans, C. (2012). The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. *Haematologica* *97*, 179–183.



- Maryanovich, M., Zahalka, A.H., Pierce, H., Pinho, S., Nakahara, F., Asada, N., Wei, Q., Wang, X., Ciero, P., Xu, J., et al. (2018). Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat. Med.* *24*, 782–791.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* *460*, 259–263.
- Ogawa, T., Kitagawa, M., and Hirokawa, K. (2000). Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and macrophages. *Mech. Ageing Dev.* *117*, 57–68.
- Pang, W.W., Price, E.A., Sahoo, D., Beerman, I., Maloney, W.J., Rossi, D.J., Schrier, S.L., and Weissman, I.L. (2011). Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *108*, 20012–20017.
- Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Delilieri, G.L. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* *30*, 783–791.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Zahn, J.M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *102*, 9194–9199.
- Rundberg Nilsson, A., Soneji, S., Adolfsson, S., Bryder, D., and Pronk, C.J. (2016). Human and murine hematopoietic stem cell aging is associated with functional impairments and intrinsic megakaryocytic/erythroid bias. *PLoS One* *11*, e0158369.
- Saçma, M., Pospiech, J., Bogeska, R., de Back, W., Mallm, J.-P., Sakk, V., Soller, K., Marka, G., Vollmer, A., Karns, R., et al. (2019). Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing. *Nat. Cell Biol.* *21*, 1309–1320.
- Singh, L., Brennan, T.A., Russell, E., Kim, J.-H., Chen, Q., Brad Johnson, F., and Pignolo, R.J. (2016). Aging alters bone-fat reciprocity by shifting in vivo mesenchymal precursor cell fate towards an adipogenic lineage. *Bone* *85*, 29–36.
- Steensma, D.P., and Ebert, B.L. (2020). Clonal hematopoiesis as a model for premalignant changes during aging. *Exp. Hematol.* *83*, 48–56.
- Sun, D., Luo, M., Jeong, M., Rodriguez, B., Xia, Z., Hannah, R., Wang, H., Le, T., Faull, K.F., Chen, R., et al. (2014). Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell* *14*, 673–688.
- Tormin, A., Li, O., Brune, J.C., Walsh, S., Schutz, B., Ehinger, M., Ditzel, N., Kassem, M., and Schending, S. (2011). CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* *117*, 5067–5077.
- Tsuruta, T., Tani, K., Hoshika, A., and Asano, S. (1999). Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leuk. Lymphoma* *32*, 257–267.
- Vas, V., Senger, K., Dörr, K., Niebel, A., and Geiger, H. (2012). Aging of the microenvironment influences clonality in hematopoiesis. *PLoS One* *7*, e42080.
- Wilson, A., Fu, H., Schiffrin, M., Winkler, C., Koufany, M., Jouzeau, J.-Y., Bonnet, N., Gilardi, F., Renevey, F., Luther, S.A., et al. (2018). Lack of adipocytes alters hematopoiesis in lipodystrophic mice. *Front. Immunol.* *9*, 2573.
- Zhou, B.O., Yu, H., Yue, R., Zhao, Z., Rios, J.J., Naveiras, O., and Morrison, S.J. (2017). Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. *Nat. Cell Biol.* *19*, 891–903.
- Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., LeBoff, M.S., and Glowacki, J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* *7*, 335–343.