

El nicho de las células troncales: los secretos de su “código postal”



Resumen

El conocimiento de las células troncales ha salido de las cajas petri y los animales de experimentación para llegar a áreas que habían sido inexploradas por el conocimiento biológico. Líderes religiosos, presidentes y artistas han hablado y debatido sobre ellas. Las células troncales pueden ser consideradas como celebridades biológicas y, como cualquier celebridad, son escasas y difíciles de encontrar en cualquier otro sitio que no sean los titulares periodísticos. Las células troncales poseen varias características funcionales, dentro de las que destacan su capacidad de autorenovación y su gran potencial de proliferación y de diferenciación, características que las colocan en la mira tanto de la investigación básica como la investigación translacional o aplicada. Las células troncales se localizan en áreas muy específicas dentro de los tejidos, denominadas como *nichos*. Los nichos proveen a las células troncales las condiciones necesarias para regular su fisiología preservar su estado de “célula troncal”, además de que participan en la

H. Jannet Saldívar-Santoyo^a, Patricia Flores-Guzmán^b,
Héctor Mayani^b, Eugenia Flores Figueroa^a

regulación de su proliferación y diferenciación. El conocer la localización de las células troncales y los mecanismos que las regulan en estos sitios, nos permitirá descubrir los secretos que guardan, para conocer su papel en la fisiopatología de las enfermedades y utilizarlos como posible blanco terapéutico, sacarlas de sus nichos más eficientemente para que sean accesibles para trasplantarlas e, incluso, producir células troncales en el laboratorio e inducir su diferenciación hacia tipos celulares específicos para su uso en protocolos de terapia celular y medicina regenerativa. En esta revisión nos enfocaremos a presentar el nicho de las células troncales hematopoyéticas (CTH) y la aplicación médica de este conocimiento.

The niche of stem cells: the secrets of their “zip code”

Abstract

Stem cells can be considered the new celebrities in biology and medicine, reaching areas that had been unexplored by biological knowledge. Religious leaders, presidents and artists have spoken and debated about them. Like any celebrity, they are rare and hard to find anywhere else other than news headlines. Self-renewal and their vast proliferation and differentiation potentials are among some characteristics that place them in the crosshairs of both basic and translational research. Stem cells are found in very specific areas within tissues, known as niches. Stem Cell niches provide the necessary conditions

^aLaboratorio de Nicho y Microambiente. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, DF.

^bLaboratorio de Células Troncales y Progenitoras. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, DF.

Correo electrónico: eugenia.flores@imss.gob.mx

Facebook: <https://www.facebook.com/LaboratorioDeNichoyMicroambiente>

to regulate their physiology, preserving their “stemness” and controlling their proliferation and differentiation. Elucidating their “zip code” will lead us to know and manipulate their regulatory mechanisms. The stem cell niche is emerging as a new therapeutic target. We will discuss the hematopoietic stem cell niche and the clinical application of this knowledge.

HEMATOPOYESIS: PRODUCCIÓN DE CÉLULAS SANGUÍNEAS A PARTIR DE CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS

Nuestro cuerpo posee en promedio 6 mil millones de células sanguíneas/kilogramo que tienen una vida limitada (desde algunas horas hasta varios días), por lo que se producen constantemente mediante un proceso denominado hematopoyesis. Comúnmente este proceso es representado como una pirámide (**figura 1**), en la cual la altura simboliza la jerarquía celular (incluye el potencial de autorenovación, diferenciación y proliferación de las células) y el tamaño del área, la abundancia. Así en la punta de la pirámide se encuentran las células con mayor jerarquía, pero que son más escasas y en la base las de menor jerarquía y con mayor abundancia^{1,2}.

Células troncales hematopoyéticas: encabezando la pirámide

Las células troncales hematopoyéticas (CTH) pertenecen a la categoría de células troncales somáticas, que incluye también a células troncales presentes en la etapa embrionaria y fetal, pero que son distintas a las nombradas células troncales embrionarias (obtenidas en la etapa previa a la organogénesis, en la fase del blastocisto). Las CTH presentan varias características únicas como su capacidad de autorenovación, la expresión de la enzima telomerasa y su gran capacidad de proliferación y potencial de diferenciación (**tabla 1**). Las CTH no pueden ser reconocidas por su morfología, por lo que la presencia de diferentes antígenos en su membrana (proteínas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune) es lo que nos permite identificarlas con anticuerpos específicos. Las CTH humanas expresan los antígenos: CD34, CD49f, CD117, CD90 y CD133 y carecen de la expresión de CD38 y de otras moléculas presentes en las células maduras (marcadores de linaje), como CD14, CD19, CD33 y CD56, entre otras³.

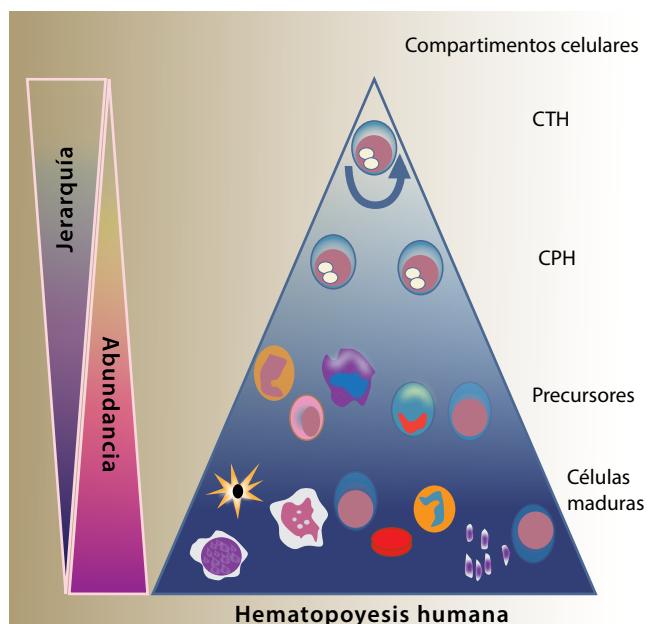


Figura 1. Representación de la hematopoyesis humana. La producción de células sanguíneas se lleva a cabo mediante un sistema jerárquico a partir de una célula troncal hematopoyética (CTH) que no puede ser reconocida por su morfología, únicamente por su inmunofenotipo (CD34+CD90+CD133+CD49f+CD38-Linaje- [Lin]) y en estudios funcionales; que da origen a las células progenitora hematopoyéticas (CPH), las cuales tampoco pueden ser reconocidas por su morfología y comienzan a expresar el antígeno CD38 y algunos marcadores de linaje. Las CPH se diferencian en célula precursora y finalmente maduras, las cuales ya son reconocidas por su morfología, pierden la expresión del antígeno CD34 y adquieren antígenos de linaje característicos (como el CD3 para los linfocitos T, CD19 para los linfocitos B, glicoforina para las células eritroides, etcera). En la punta de la pirámide se muestra una mayor jerarquía, definida como una mayor capacidad de auto-renovación, potencial de diferenciación y potencial de proliferación, la cual disminuye conforme crece la pirámide, inversamente esta descrita la proporción de células (abundancia). Flecha circular, indica capacidad de auto-renovación de la CTH.

Tabla 1. Características de las células troncales

Alto potencial de diferenciación	Se distinguen por ser células inmaduras con la capacidad de dar origen a muchos tipos celulares (multipotentes)
Alto potencial de proliferación	Son capaces de generar mediante divisiones celulares, un número elevado de células hijas
Fenotipo indiferenciado	Debido a que poseen una morfología de células inmaduras, su identificación es a través de la detección de antígenos específicos y a la carencia de antígenos de linaje o de células maduras
Autorenovación	Es la capacidad de una célula troncal, que al dividirse al menos una de la células hijas conserve su jerarquía.
Actividad de la telomerasa	La función de la enzima telomerasa es restituir el acortamiento de los telómeros que ocurre en cada ciclo replicativo, evitando su senescencia y permitiendo su alta capacidad de proliferación

Células progenitoras, precursoras y maduras

Las CTH dan origen al siguiente compartimento o escalafón dentro de la pirámide, al de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales aún siguen expresando el antígeno CD34 pero comienzan a expresar antígenos de linaje, carecen de auto renovación o es muy limitada (en el caso de progenitores multipotentes) y poseen propiedades de proliferación y diferenciación inferiores a las CTH. Las CPH tiene la capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos *in vitro* (por lo que también se les denomina como células formadoras de colonias o CFC) y dan a su vez origen a los precursores, células inmaduras pero que son reconocibles por su morfología y que por lo general pierden la capacidad de proliferación. Por último, los precursores maduran y dan origen a todas las categorías de células sanguíneas funcionales presentes en circulación (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), las cuales representan la base de la pirámide descrita, por ser las células más abundantes y que tienen una capacidad de proliferación y diferenciación nula³.

CONCEPTO DE NICHO: LA IMPORTANCIA DEL "CÓDIGO POSTAL"

El concepto de nicho surge en el campo de la ecología, acuñado por Joseph Grinnell, un naturalista que en 1917 utilizó el término para describir la suma de los requerimientos del hábitat o ambiente que le permite a una especie persistir y reproducirse². Años después, fue adaptado al campo de las células troncales por Ray Schofield en su publicación de 1978⁴.

En los años setenta la célula más inmadura que

había sido identificada era la unidad formada de colonias en el bazo (CFU-S, por sus siglas en inglés, *colony forming unit-spleen*). Las CFU-S son los nódulos o colonias que se observaban en el bazo, después de realizar un trasplante con células de médula ósea previo a una irradiación letal o semiletal del ratón receptor. Estas colonias son clonales (originadas a partir de una sola célula) y tienen la capacidad de dar origen a nuevas colonias si son trasplantadas a un receptor secundario (un segundo ratón), por lo que se consideraba presentaban capacidad de autorenovación. Las CFU-S primero fueron descritas por James Till y Ernest McCulloch⁵ (considerados como los padres del campo de las células troncales). Schofield analizó los datos experimentales publicados hasta ese momento y observó que la capacidad de las CFU-S para dar origen a nuevas colonias se iba perdiendo conforme se iban realizando trasplantes seriales (a partir de un primer ratón transplantado, se toman las células del donador y se transfieren a un segundo receptor; de este segundo, se toman nuevamente las células del primer donador y se llevan a un tercer o cuarto receptor). Estos resultados demostraban que las CFU-S no tenían una “verdadera” capacidad de auto renovación (**figura 2**). Gracias a esta observación, el autor propuso que las CFU-S que estaban siendo trasplantadas no eran las células hematopoyéticas más inmaduras, es decir no pertenecerían a las células que se encuentran en la punta de la pirámide, sino que corresponden a progenitores con un mayor grado de diferenciación (progenitores hematopoyéticos multipotenciales), que exhibían una limitada capacidad de autorenovación. De acuerdo a su hipótesis, las células más inmaduras (CTH) deben de

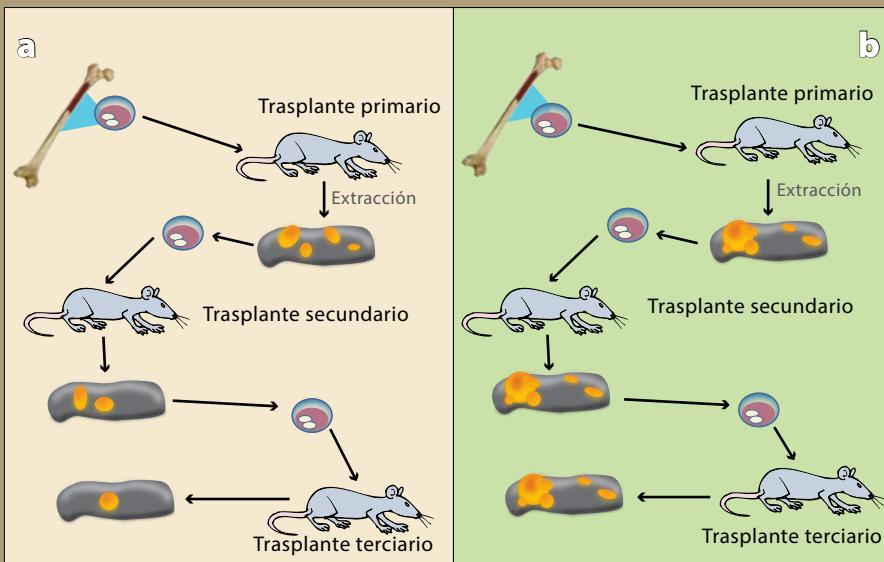


Figura 2. Representación esquemática de las observaciones realizadas por Schofield en comparación con el comportamiento esperado en auto renovación. Schofield encontró que en cada trasplante serial, las células capaces de originar colonias/nódulos hematopoyéticos en el bazo (CFU-S) reducían su capacidad de proliferación, diferenciación y auto renovación, lo que da lugar a un número menor de colonias, experimentos representados en el panel (a). Este comportamiento reflejaba una ganancia de compromiso y una pérdida de autorenovación, por lo que predijo que las CFU-S no exhibían propiedades de células troncales. En contraste, si las CFU-S hubieran exhibido autorenovación (b), en cada trasplante deberían de generarse el mismo número de CFU-S si se inicia con un número constante de células transplantadas.

permanecer en la médula ósea en “un sitio específico”, asociadas fuertemente con otros tipos celulares, tan estrechamente, que no pueden ser extraídas fácilmente para ser transplantadas. Las células de este sitio específico además de retenerlas, debían de regular su fisiología y protegerlas de señales inductoras de maduración o proliferación. Este sitio fue nombrado por Schofield como nicho de las células troncales (*stem cell niche*, en inglés)⁴. A partir del 2003, el uso de modelos murinos permitió comprobar y conocer experimentalmente el concepto de nicho hematopoyético¹.

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

A partir del nacimiento y hasta la muerte del individuo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético. Es un tejido esponjoso que se localiza en

el interior de los huesos y está formado por 3 componentes celulares: el componente hematopoyético, el mesenquimal y el endotelial.

Componente hematopoyético

El componente hematopoyético, como ya revisamos, está compuesto por las CTH y toda su progenie, incluyendo a las células sanguíneas maduras. Lleva a cabo 2 funciones: por una parte, genera las células sanguíneas maduras –como los eritrocitos, las plaquetas y las células de la respuesta inmune (monocitos, linfocitos)– que salen a la circulación para llevar a cabo sus funciones particulares, y por la otra, producen células que se quedan como residentes de la médula ósea y se integran al estroma y microambiente medular, ayudando a regular la hematopoyesis, como los macrófagos y los osteoclastos⁶.

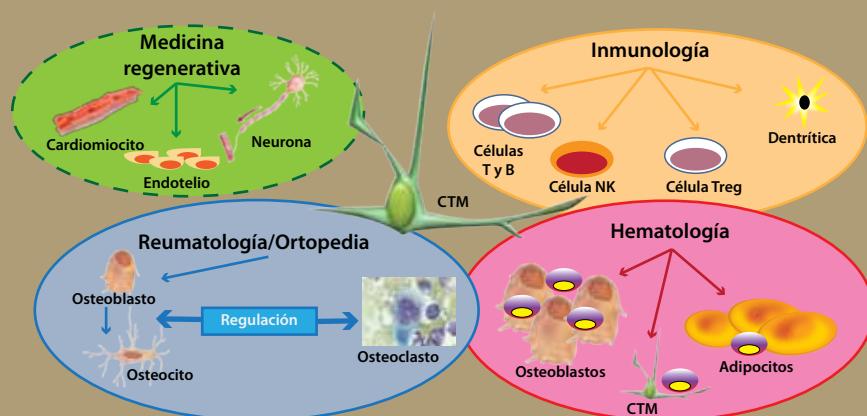


Figura 3. Participación de las células troncales mesenquimales (CTM) en distintas áreas de la biomedicina y su interrelación. La hematología fue la primer área en donde se reconoció la participación de las CTM, regulando (al dar origen a osteoblastos y adipocitos) la producción de células sanguíneas. En la reumatología y traumatología tienen gran relevancia al ser reguladores centrales de la osteogénesis, y contribuyen a la formación ósea generando osteoblastos y osteocitos, así como indirectamente al regular la producción y activación de los osteoclastos en el proceso de reabsorción ósea. Recientemente se encontró que contribuyen en la regulación de la respuesta inmune, siendo ahora parte del complejo campo de la Inmunología. Inhiben la función de linfocitos B, T, celulas NK y dendríticas, y favorecen la producción de linfocitos T citotóxicos. Uno de los campos más recientes y de mayor crecimiento ha sido en la medicina regenerativa y terapia celular. Las CTM han sido exitosamente trasplantadas y son parte de ensayos clínicos para probar su utilidad como coadyuvantes en el trasplante de médula ósea, para mejorar el injerto y diminuir la enfermedad injerto contra huésped, así como para enfermedades no hematológicas, al lograr que *in vitro* estas células originen, células no medulares: neuronas, cardiomioctos y endotelio.

Componente mesenquimal

El componente mesenquimal es generado por las células troncales/estromales mesenquimales (CTM, por sus siglas en inglés, *mesenchymal stem/stromal cells*). Las CTM dan origen a los osteoblastos, adipocitos y condrocitos y forman parte del microambiente y nicho medular; son parte del mecanismo de osteogénesis al dar origen a osteocitos y regular la producción y activación de osteoclastos⁷. En la ultima década el conocimiento sobre las CTM ha crecido exponencialmente, y ha llegado a otros campos de la medicina (figura 3) como la inmunología y la medicina regenerativa y terapia celular⁸.

Componente vascular

El componente vascular, integrado por células endoteliales, tiene su origen en el angioblasto, un progenitor capaz de generar células endoteliales. Éste se encuentra relacionado estrechamente con las CTH desde su origen (el hemangioblasto), junto con las que regula

tanto el tráfico celular y de nutrientes, así como la proliferación de las células hematopoyéticas⁹.

Estos componentes celulares se encuentran distribuidos en la médula ósea en 3 zonas espaciales (figura 4): el parénquima, constituido por todos los elementos hematopoyéticos y cantidades variables de grasa o adipocitos; la zona endosteal y trabécular, integrada por osteocitos y osteoblastos (así como osteoclastos que se encargan de la reabsorción ósea), y la vasculatura, que incluye arteriolas, capilares y sinusoides¹⁰. El parénquima se encuentra abundantemente vascularizado, tanto por capilares como por sinusoides, lo cuales pueden también localizarse junto a la zona trabécular.

EL NICHO DE LAS CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS EN MÉDULA ÓSEA: UNA CÉLULA CON DISTINTOS CÓDIGOS POSTALES

Nicho endosteal

La zona endosteal fue el primer “código postal” identificado como nicho de las células troncales. Los estu-

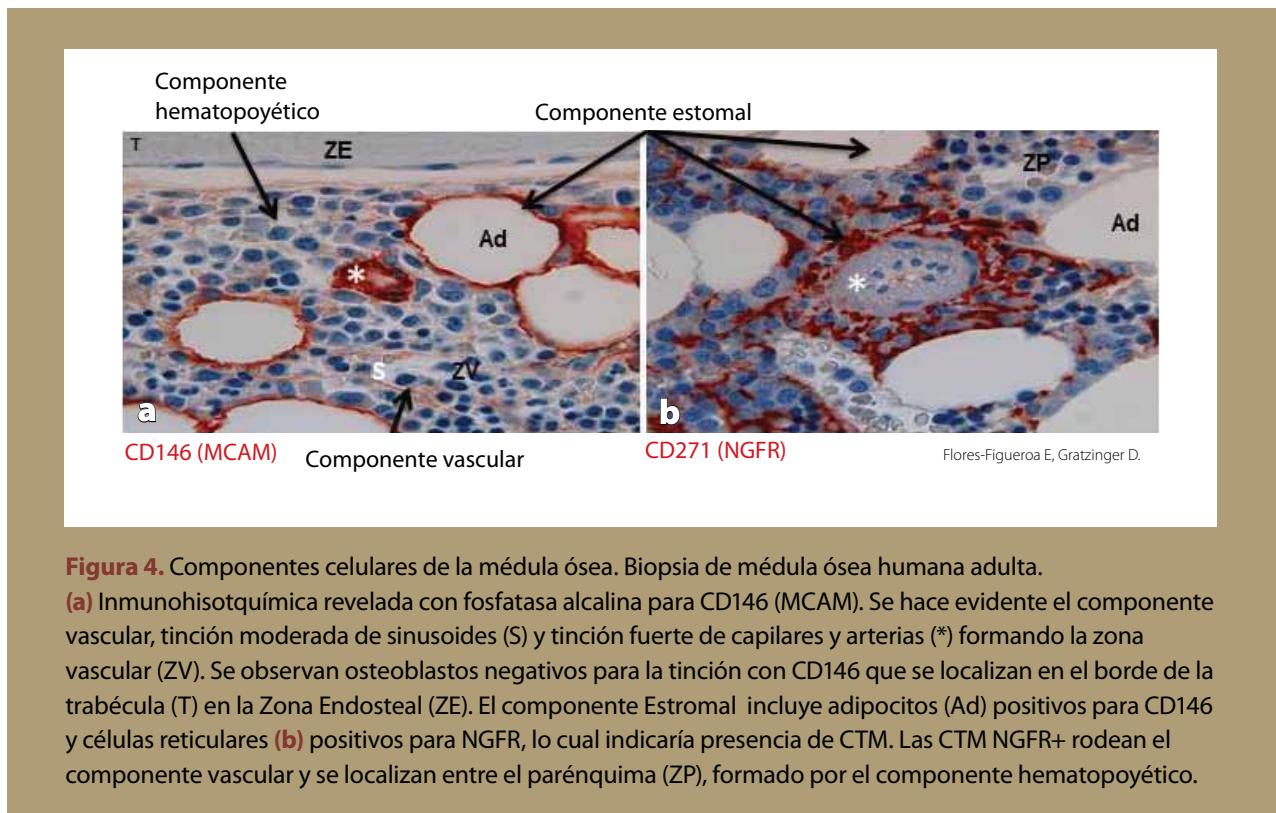


Figura 4. Componentes celulares de la médula ósea. Biopsia de médula ósea humana adulta.

(a) Inmunohistoquímica revelada con fosfatasa alcalina para CD146 (MCAM). Se hace evidente el componente vascular, tinción moderada de sinusoides (S) y tinción fuerte de capilares y arterias (*) formando la zona vascular (ZV). Se observan osteoblastos negativos para la tinción con CD146 que se localizan en el borde de la trabécula (T) en la Zona Endosteal (ZE). El componente Estromal incluye adipocitos (Ad) positivos para CD146 y células reticulares (b) positivos para NGFR, lo cual indicaría presencia de CTM. Las CTM NGFR+ rodean el componente vascular y se localizan entre el parénquima (ZP), formado por el componente hematopoyético.

dios que han llevado a su identificación consisten, por una parte, en demostrar la asociación espacial entre las CTH y una determinada estructura, mediante el uso de la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Sin embargo, estos estudios únicamente establecen una relación espacial y no confirman si las CTH están siendo reguladas por estos sitios. Por lo que los análisis de localización se complementan con estudios funcionales, generalmente realizados en modelos murinos, en donde se puede modificar (aumentando, disminuyendo o bloqueando) la expresión de una determinada proteína, en una población celular^{11,12}.

En 3 modelos murinos que involucran la eliminación de células del linaje de osteoblastos¹²⁻¹⁴ se observó una drástica disminución en el número de progenitores hematopoyéticos y de CTH. Por otra parte, en modelos murinos, en donde se incrementó el volumen óseo, y con ello al número de osteoblastos, resultó en un aumento en el número de CTH, por lo que surgió el concepto de *nicho endosteal*, que se refiere a la zona en donde se localizan las CTH en cercana asociación con los osteoblastos.

Es importante mencionar que en los modelos murinos en donde se eliminan los osteoblastos, las CTH disminuyen pero no desaparecen¹²⁻¹⁴; lo que sugiere que las CTH tienen otros nichos dentro de la médula ósea o que los osteoblastos apoyan indirectamente a ese nicho, así como estudios posteriores demostraron que la mayoría de las células inmaduras no se localizan en esta zona.

Nicho vascular

La evidencia de un nicho adicional al endosteal proviene principalmente de 2 estudios, ambos publicados en el 2005. Spinkins y colaboradores localizaron a las CTH y progenitoras hematopoyéticas en zonas vasculares que contenían células endoteliales productoras de CXCL12, lo que ubicaba al sitio vascular como un posible nicho¹⁵. La utilización de una combinación de antígenos de la familia SLAM (por sus siglas en inglés, *signaling lymphocyte activation molecule*) permitió que Kiel y colaboradores tuvieran la capacidad de localizar específicamente a las CTH. Estos autores describieron que con el

uso de únicamente 3 antígenos, CD150, CD48 y CD244, podían distinguir 3 subpoblaciones: CTH (CD150+CD244-CD48-), progenitores multipotentes (CD150-CD244+CD48-) y progenitores más maduros (CD150-CD244+CD48+). Con apoyo de la inmunofluorescencia y de los marcadores SLAM, reportaron que las CTH se encontraban asociadas en un 60% con los sinusoides, en la médula ósea de ratones¹⁶. Gracias a estas evidencias surgió el concepto del *nicho vascular* o nicho endotelial. Los sinusoides son parte del sistema vascular y están formados por una capa sencilla de células endoteliales, las cuales median el paso de los elementos celulares y proteicos hacia dentro y hacia fuera de la cavidad medular¹⁵.

Nicho reticular

Estudios recientes han demostrado, también en el modelo murino, evidencia de un nuevo nicho, el *Nicho reticular*^{17,18}, que no se refiere a una nueva zona espacial dentro de la médula ósea, sino a que dentro de la zona endosteal y vascular, las CTH hacen contacto directo con CTM¹⁹. En estudios funcionales *in vivo*, utilizando un ratón modificado genéticamente para acoplar la expresión de la proteína verde fluorescente con la de nestina, Méndez-Ferrer y colaboradores identificaron a una subpoblación de CTM perivasculares (aunque también en menor proporción cercanas al endostio)¹⁸.

La nestina es una proteína de filamento intermedio clase VI que ha sido identificada en progenitores neuronales, células troncales mesenquimales y endoteliales²⁰. Las CTM Nestina+ se encontraron asociadas a CTH y a fibras adrenérgicas del sistema nervioso simpático. Al eliminar a las CTM Nestina+, se indujo una migración del 50% de las CTH al bazo y existió una reducción de hasta un 90% en la llegada a la médula ósea de CTH trasplantadas al ratón receptor¹⁸. Por otra parte, Omatsu y colaboradores describieron una población de CTM productoras de la quimiocina SDF-1 (factor derivado del estroma) o CXCL12 a la cual denominaron como célula reticular con abundante CXCL12 (CAR, por sus siglas en inglés).

El CXCL12 es esencial para el *homing* y mantenimiento de las CTH, el desarrollo de células B y de células dendríticas plasmacitoides¹⁹. La mayoría de las CTH fueron encontradas en cercana asociación con las células CAR, las cuales se localizaron en áreas más

centrales de la médula ósea, lejanas al endostio. Estas células también se encontraron asociadas a las zonas perivasculares. Las células CAR además producen el factor de células troncales (SCF), una citocina importante para mantener la viabilidad de las CTH¹⁷.

Estos hallazgos son de gran relevancia ya que ahora se reconoce que las CTM se localizan tanto en las zonas trabeculares y vasculares englobando a ambos nichos, el endosteal y vascular. Las CTM podrían ser la pieza clave que une estos sitios, formando un solo nicho. Sin embargo, junto con estos hallazgos surgen nuevas interrogantes: ¿el estado de ciclo celular de las CTH que se encuentran en el nicho reticular varía de acuerdo a su localización, ya sea endosteal/trabecular o vascular? ¿Cuáles son los tipos celulares que participan dentro de los nichos? ¿Cuál es la relación entre CTM y osteoblastos y células endoteliales? Un componente adicional en la médula ósea de ratón ha sido la presencia de neuronas del sistema nervioso simpático que se encuentran irradiadas hacia el parénquima; su participación en el nicho es regular indirectamente la fisiología de las CTH y la liberación de CXCL12 por las CTM mediante la secreción de noradrenalina²¹.

Recientemente el Dr. Toshio Suda (excelente investigador japonés líder en el estudio del nicho de las células troncales) ha propuesto que el nicho de las CTH está compuesto por células no especializadas, y que son las interacciones de múltiples linajes celulares –osteoblastos, endoteliales, mesenquimales y hematopoyéticas– las que conforman el nicho de las CTH, y hacen de este un panorama mucho más complejo²². Por supuesto que una pregunta fundamental es si estos mecanismos son aplicables a humanos (**figura 5**).

El nicho de las CTH en el ser humano

En humanos se ha encontrado que las células CD146+ (MCAM) y las células positivas al receptor del factor de crecimiento neuronal de baja afinidad (NGFR) o CD271, tienen características de CTM: las primeras tienen la capacidad de diferenciarse en los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico²³ y las segundas también tienen capacidad de diferenciación a linajes mesenquimales y de originar colonias fibroblastoides en cultivos *in vitro*²⁴. Tormin y colaboradores²⁴ demostraron mediante inmunofluorescencia que ambas poblaciones pueden tener contacto con células CD34+,

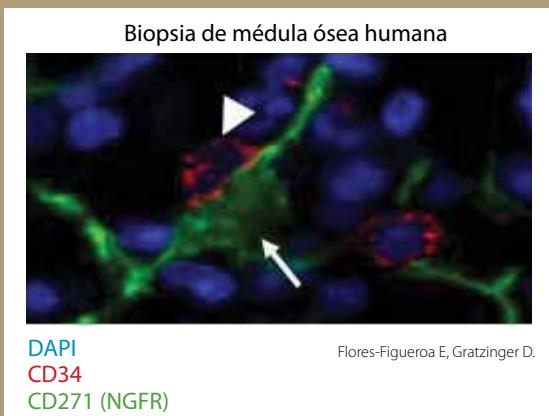


Figura 5. Contacto directo entre células troncales/progenitoras hematopoyéticas y células troncales/estromales mesenquimales. Microfotografía de una inmunofluorescencia (CD34-rojo, CD271-verde, DAPI-azul) observada en un microscopio confocal, de una biopsia de médula ósea humana. La punta de flecha señala la célula hematopoyética (CD34+) que se localiza directamente asociada con la CTM (flecha blanca).

y propusieron que las CTM CD146+ y NGFR+ son subpoblaciones de las CTM; aquellas con una localización vascular tienen el inmunofenotipo CD146(?)+ NGFR+, mientras que aquellas con una localización endosteal son CD146- NGFR²⁴.

Estudios del nicho reticular en biopsias de médula ósea adulta humana

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

Si consideramos que el tamaño promedio de una célula en esta preparación varía entre 5 y 10 micras, las CTH y CPH estarían localizadas entre 2 a 4 células

de distancia de la vasculatura en médula ósea normal, por lo que no se encontrarían en contacto directo con las células endoteliales sino en contacto directo con las CTM NGFR+ (**figura 5**). Mediante inmunofluorescencia demostramos que el 80% de las células CD34+ se asociaban estrechamente con las CTM NGFR+ CD146-, y menos del 5% con las CD146+. Estos hallazgos sugieren fuertemente que, en médula ósea humana, las CTH y CPH se localizan en un nicho reticular asociadas a la vasculatura, pero no hacen contacto directamente con las células endoteliales, sino con las CTM²⁵.

Es interesante que en este estudio encontramos diferencias sustanciales con respecto a lo reportado en modelos murinos. En nuestro estudio no fue posible encontrar a las CTH y CPH asociadas a osteoblastos ni a células endoteliales, ni evidencia de CTM nestin+ o de CTM productoras de CXCL12 en médula ósea normal, sólo en muestras de pacientes. Por lo anterior, consideramos que es necesario elucidar si las diferencias observadas en los estudios de médula ósea murina y humana son debidas a la especie, a la cepa, a la edad o al tipo de hueso utilizado (**figura 6**).

APLICACIÓN CLÍNICA DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL NICHO HEMATOPOYÉTICO: UTILIZANDO LOS SECRETOS DE SU CÓDIGO POSTAL

El papel del nicho de las CTH en enfermedades hematológicas

La evidencia del posible papel de las CTM en la fisiopatología de las enfermedades hematológicas emana tanto de experimentos en modelos animales como de estudios clínicos. En modelos animales experimentales ha sido demostrado que la modificación en la expresión de algunas moléculas en éstas células conduce a la generación de mieloproliferación, displasias hematológicas e, incluso, en la transformación leucémica de las células hematopoyéticas²⁶⁻²⁸. Estos estudios han cambiado el paradigma sobre la fisiopatología de las enfermedades hematológicas, debido a que demuestran que aún cuando las células hematopoyéticas sean normales, un cambio en su nicho puede conducir incluso a su transformación leucémica, por lo que queda de manifiesto la importancia de las CTM y del nicho reticular en la regulación de la hematopoyesis.

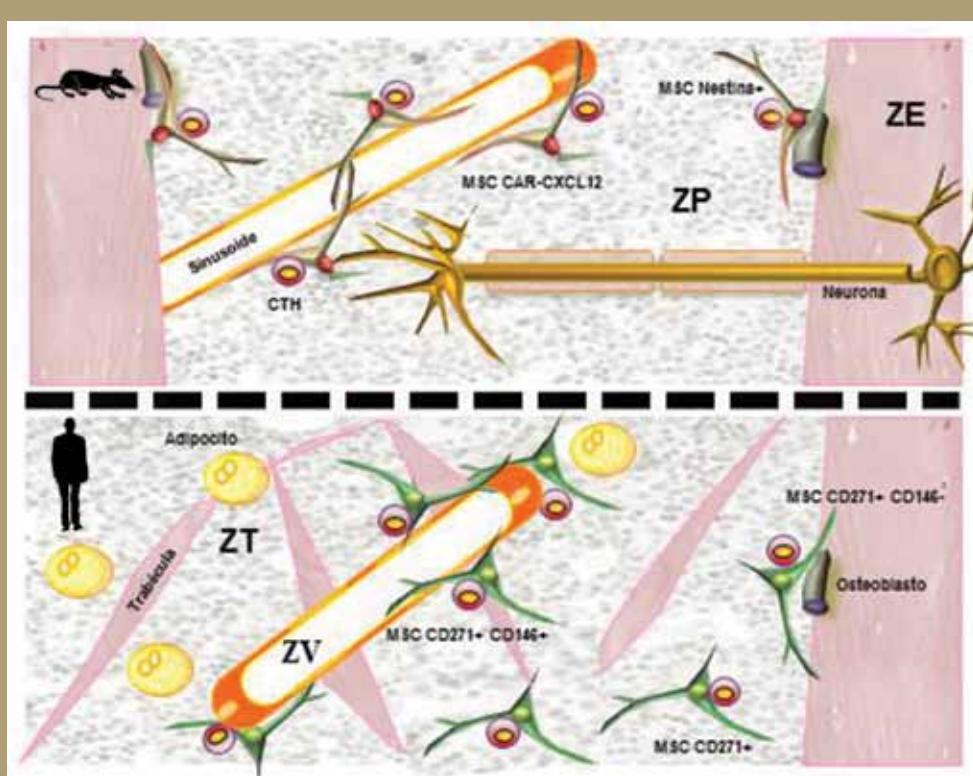


Figura 6. Comparación del nicho reticular entre humano y ratón. La existencia del nicho reticular tanto en ratón así como en humano, pone en evidencia la participación de las CTM en la regulación de las CTH. En el ratón existe una subpoblación de CTM Nestina+ y CTM-CXCL12 (células reticulares abundantes en CXCL12) con las cuales están estrechamente relacionadas las CTH en la zona vascular (ZV) y también en la zona endosteal (ZE). En humano, se ha observado que las subpoblaciones de CTM son CD271+ que se ubican en las tres zonas ZE, ZV y zona del parénquima (ZP), y sólo expresan CD146+ las de ZV. Las CTH están relacionadas estrechamente a las CTM en las zonas: ZE, ZE, y ZP.

Por otra parte, se ha demostrado, en diversas enfermedades hematológicas, que existen alteraciones en las CTM. Nuestro grupo fue el primero en demostrar que las CTM presentan alteraciones en una patología hematológica en humanos. En SMD demostramos²⁹ que, aproximadamente el 60% de los pacientes presentan alteraciones cromosómicas en las CTM.

Recientemente se encontró que pacientes con SMD y LMA, cuyas MSC presentaban alteraciones cromosómicas, tienen una sobrevida menor que pacientes con CTM con un cariotipo normal³⁰. En LMA y en SMD las anomalías cromosómicas reportadas hasta ahora no han sido clonales, es decir, son aberraciones distintas a las de las células hemato-

poyéticas de los pacientes; sin embargo, en leucemia linfoblástica aguda se reportó la presencia de traslocaciones cromosómicas en las CTM entre el 10 y 54% de los pacientes, las cuales se encuentran presentes en las células hematopoyéticas (TEL-AML1, E2A-PBX1, MLL), lo que sugiere un origen clonal³¹. También se han reportado alteraciones en los patrones de expresión génica y proteica en CTM provenientes de pacientes con mieloma múltiple (MM)³² y deficiencias en la proliferación y diferenciación de las CTM de pacientes con anemia aplásica (AA)³³. Trabajando con biopsias de médula ósea de pacientes con SMD y LMA, encontramos que pacientes con SMD presentan un incremento en la población de CTM NGFR+

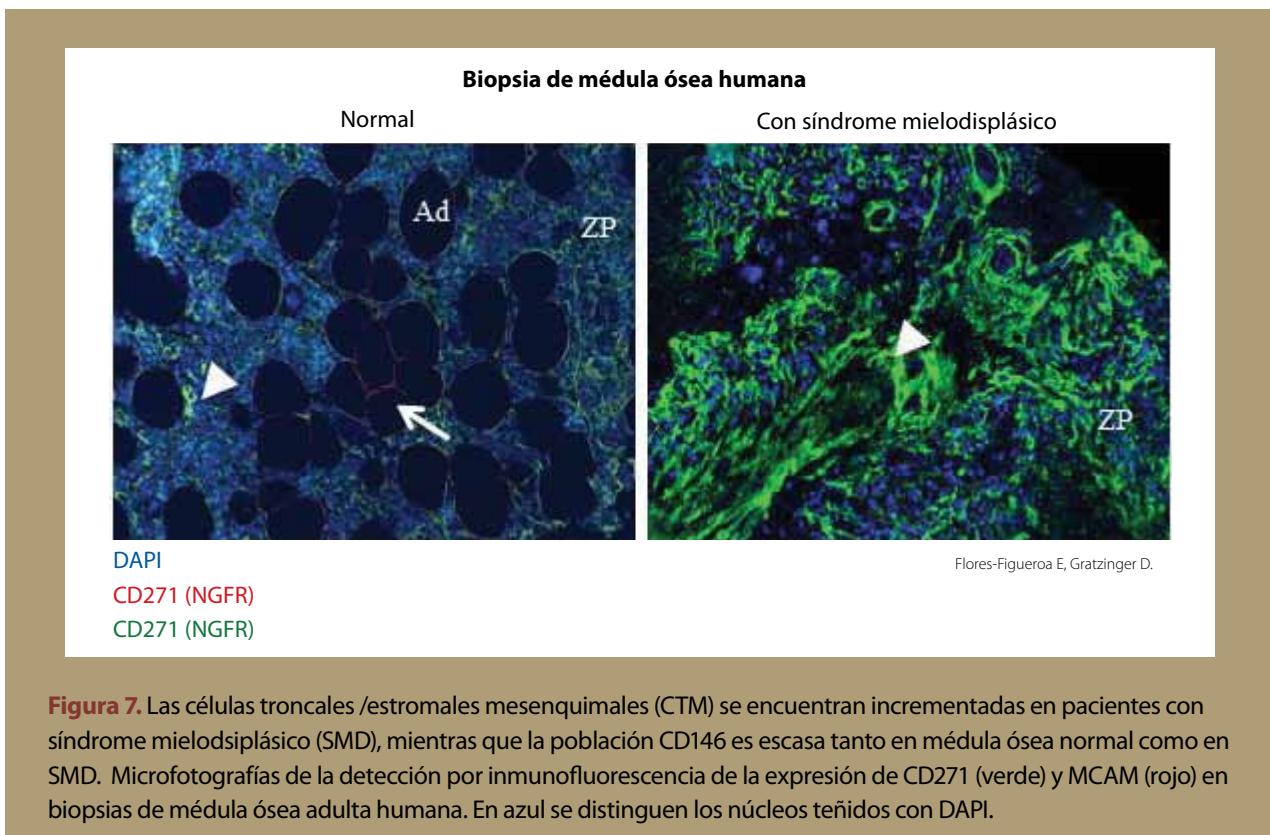


Figura 7. Las células troncales /estromales mesenquimales (CTM) se encuentran incrementadas en pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD), mientras que la población CD146 es escasa tanto en médula ósea normal como en SMD. Microfotografías de la detección por inmunofluorescencia de la expresión de CD271 (verde) y MCAM (rojo) en biopsias de médula ósea adulta humana. En azul se distinguen los núcleos teñidos con DAPI.

CD146-, las cuales, adicionalmente, comienzan a secretar la quimiocina SDF-1 (**figura 7**).

En LMA también se observó una tendencia del incremento en esta subpoblación, pero no fue estadísticamente significativo²⁵. Es importante destacar que nosotros demostramos que SDF-1 en médula ósea normal es secretada principalmente por células endoteliales y que las CTM NGFR+ secretan muy bajos niveles de esta citocina; sin embargo en SMD y LMA, las MSC NGFR+ secretan niveles incrementados de esta citocina, lo que a su vez se correlaciona con el número aumentado de células CD34+. Esto representa un cambio en el nicho reticular en estas enfermedades, tanto en la abundancia de CTM como en su patrón de secreción, de al menos una quimiocina. En conjunto, estos resultados apoyan que, en humanos, similar a ratón, las CTM regulan la hematopoyesis en sitios específicos de la médula ósea en donde cohabitan con CTH y de manera vital, alteraciones en la fisiología de las CTM condicionan la aparición y el curso de varios tipos de enfermedades hematológicas, incluyendo la mielodisplasia y leucemia.

Migración de las CTH durante la etapa embrionaria: lecciones de una “movilización” natural y su uso en el trasplante de médula ósea

México es uno de los 3 países latinoamericanos con una mayor actividad de trasplantes de médula ósea³⁴. En la actualidad, no sólo en México sino a nivel global, la principal fuente de células hematopoyéticas ya no es la médula ósea, sino la sangre periférica movilizada y la sangre de cordón umbilical³⁵. Dese el nacimiento y durante toda la etapa postnatal en la circulación sanguínea los niveles de CPH y CTH son extremadamente bajos; sin embargo, con el uso de quimioterapia y/o factores de crecimiento, es posible sacar a las células inmaduras, progenitoras y troncales de médula ósea hacia la circulación y, una vez ahí, tomarlas mediante aférésis, para posteriormente ser trasplantadas. A este producto se le conoce como sangre periférica movilizada³⁵, el cual se ha preferido por encima del histórico trasplante de médula ósea, ya que es menos invasivo para el donador y menos costoso.

Por otra parte, en la sangre de cordón umbilical se encuentran “naturalmente” circulando CPH y CTH

por lo que, desde hace algunos años, esta fuente ha sido muy utilizada para realizar los trasplantes³⁵. Por lo anterior, la sangre de cordón umbilical y la hematopoyesis embrionaria son un modelo de movilización fisiológica del cual pueden conocerse los mecanismos de movilización y utilizarlos para hacer más eficiente el trasplante de médula ósea.

Al igual que otras células troncales, las hematopoyéticas migran, durante la embriogénesis, desde su sitio de origen hasta el órgano que colonizarán, sea temporal o de forma permanente, respondiendo a señales químicas emitidas por el sitio receptor. En el caso de las CTH, el sitio de llegada serán los rudimentos del hígado, bazo, riñón, pulmones -dentro del cuerpo del embrión- y la placenta, donde se llevará a cabo una hematopoyesis activa durante la etapa final de la embriogénesis y principio de la fetal; de estos, el hígado es el que llevará la mayor carga de la generación de células sanguíneas, incluso cuando la médula ósea sea ya poblada por las CTH e inicie la hematopoyesis en ese órgano (después de la octava semana de gestación en humanos)³⁶.

Las señales químicas emitidas por células estromales de cada uno de los órganos (o rudimentos) receptores, indican a las recién generadas CTH a dónde deben llegar. Este proceso de migración y alojamiento, se conoce como *homing* y de ninguna forma es aleatorio: el llamado es sobre aquellas células que presentan los receptores específicos para la molécula atrayente y sólo ciertas células responden a determinado quimioatraventante. La interacción de los atractores específicos con sus respectivos receptores (adresinas, químiocinas, integrinas y factores de crecimiento) formará una ruta de migración específica de CTH que no será seguida por ninguna célula troncal o progenitor de otro tipo, en un punto del desarrollo lleno de señales químicas. La principal molécula que dirige esta migración es la químiocina CXCL12 o factor derivado de células estromales 1 (SDF-1, por sus siglas en inglés), al punto que su ausencia o la de su receptor, CXCR4, provoca una incapacidad de migración y establecimiento de las CTH en la médula ósea³⁷.

Se ha demostrado que la capacidad de respuesta a SDF-1 por parte de las CTH no es igual en las distintas etapas de desarrollo ontogénico; es decir, las CTH

responden más a SDF-1 cuando se encuentran en hígado fetal que cuando se encuentran en la médula ósea, sitio permanente de la hematopoyesis posnatal. La migración de las CTH a médula es gradual (**figura 8**), y se eleva cuando son más responsivas a SDF-1, por incremento no sólo en la concentración de esta químiocina o la presencia de su receptor sobre ellas, sino también por la interacción con otras moléculas como el SCF (factor de células troncales, por sus siglas en inglés), la cual se ha demostrado que sinergiza (cuando ambas están presentes el efecto es mayor que la suma de sus efectos) con el SDF-1, incrementando la migración de las CTH a médula ósea en esta etapa de desarrollo³⁷.

De forma similar, SDF-1 parece también desempeñar una función clave para la migración y alojamiento de las CTH en los vasos sanguíneos de la placenta: al inyectar un antagonista de CXCR4 directamente en los vasos coriónicos de placenta al término de la gestación, se ha logrado incrementar el número de CTH humanas a las obtenidas por una colecta tradicional vía la sangre placentaria, lo cual sugiere que los mecanismos de retención en placenta de las CTH deben ser similares a los observados en la médula ósea. También la presencia de SCF parece intervenir en la migración de las células hematopoyéticas a placenta, porque se han encontrado elevados niveles de expresión de este factor en las células endoteliales y mesenquimales que rodean los sitios donde también se localizan las CTH en etapas tempranas de gestación, poco después de que se originaran en AGM³⁷.

CONCLUSIONES

El estudio del nicho de las CTH ha crecido exponencialmente en los últimos años. Prueba de ello es que en los últimos 5 años se ha publicado el 75% del total de los artículos que existen en relación al nicho de las células troncales. Es interesante que en el mismo periodo, se ha publicado el 26% de artículos sobre CTH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Esto se debe en gran medida al avance metodológico para estudiar al nicho, nuevos marcadores y técnicas de microscopia, así como a la gran motivación y el potencial clínico del área. Por lo tanto, no nos debemos sorprender si, en los próximos 5 años, la novedosa

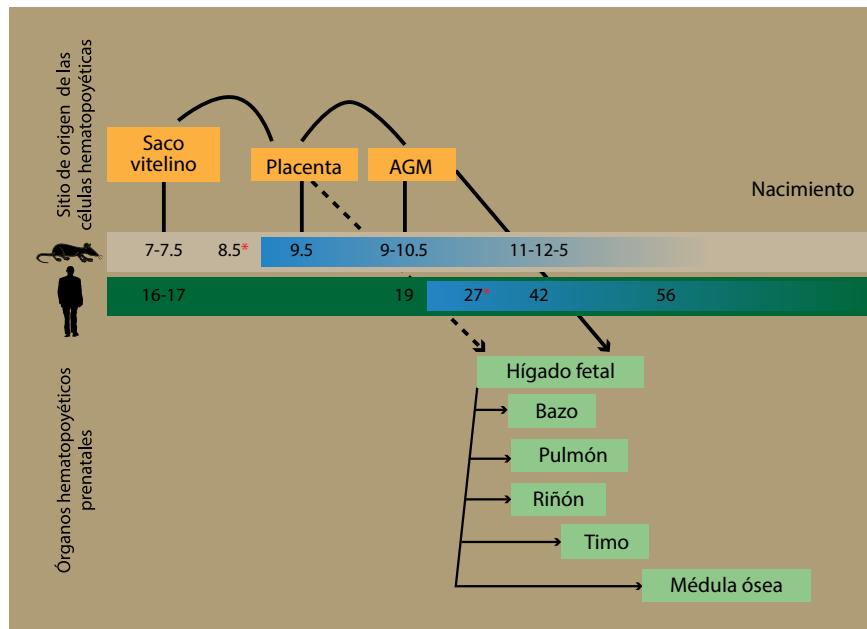


Figura 8. Migración de las HSC a través de los diferentes nichos: extraembriónicos y embrionarios de ratón y humano. Las HSC migran a través de los diferentes órganos/rudimentos hematopoyéticos del embrión en respuesta a estímulos químicos (adhesinas, quimosinas, integrinas y factores de crecimiento) producidos por los órganos emisores, las HSC poseen receptores a dichos estímulos químicos y colonizan, un proceso denominado *homing* de las HSC.

nichoterapia³⁸, que se basa en la modificación del ambiente y nicho de las células troncales con fines terapéuticos, llega a ser uno mas de los tratamientos clínicos aplicados para diferentes enfermedades del sistema hematopoyético. Sin embargo, debemos ser muy cautelosos al respecto y debemos estar conscientes que, como cualquier avance científico y médico, estas nuevas terapias primero deberán ser probadas en ensayos clínicos aprobados por comités científicos y de ética, y deberán ser publicados en revistas especializadas.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Cooperación Internacional de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, al Fondo AMEH-291/ FUNSALUD y REDFARMED por el apoyo recibido para realizar la estancia de investigación en el Departamento de Patología de la Universidad de Stanford y del Hospital de Veteranos en Palo Alto, California. Al Dr. Peter Greenberg por su colaboración y discusión sobre el tema durante esta estancia. A la Dra. Dita Gratzinger por su tutoría durante la visita mencionada y por proporcionar las imágenes de microscopia; la Dra. Gratzinger recibió el apoyo del Hospital de Veteranos en Palo Alto, California. Al apoyo Conacyt (CB-2012-01-179417) y apoyo IMSS (FIS/IMSS/PROT/021). La Ing.

Saldivar-Santoyo agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirle ser estudiante de posgrado. Al CONACyT por la beca (REGISTRO/CVU: 261421/412853) y apoyo Programa de Formación de Investigadores, y al Fondo de Investigación en Salud, IMSS (R-2006-3602-15).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hoggatt J, Scadden DT. The stem cell niche: tissue physiology at a single cell level. *J Clin Invest.* 2012;122(9):3029-34.
- Flores-Figueroa E. El nicho de las celulas troncales. En: Celulas troncales y medicina regenerativa, Pelayo R, Santa-Olalla J, Velasco I, editores. Universidad Nacional Autónoma de Mexico; 2011, p. 176-94.
- Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell.* 2012;10(2):120-36.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25.
- McCulloch EA, Till JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat. Res.* 1960 Jul;13:115-25.
- Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Chavez-Gonzalez A. Hematopoiesis. *Cancerología.* june;2(2):95-107.
- Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Las Células Troncales Mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin.* 2006 Oct;58(5):498-511.
- Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature

- and function of mesenchymal stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011 Feb;12(2):126-31.
9. Butler JM, Nolan DJ, L.Vertes E, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;6(3):251-64.
 10. Brown DC, Gatter KC. The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. *Histopathology.* 1993;22(5):411-22.
 11. Calvi LM, Adams GB, Weibreth KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature.* 2003;425(6960):841-6.
 12. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425(6960):836-41.
 13. Deguchi K, Yagi H, Inada M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Komori T. Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfα1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;255(2):352-9.
 14. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katainic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 2004;103(9):3258-64.
 15. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Côté D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature.* 2005;435(7044):969-73.
 16. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-21.
 17. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity.* 2010 Sep 24;33(3):387-99.
 18. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466(7308):829-34.
 19. Nagasawa T, Omatsu Y, Sugiyama T. Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: the role of reticular cells. *Trends Immunol.* 2011;32(7):315-20.
 20. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2011;17(4):409-18.
 21. Méndez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 2008;452(7186):442-7.
 22. Nakamura-Ishizu A, Suda T. Hematopoietic stem cell niche: An interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1830(2):2404-9.
 23. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131(2):324-36.
 24. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schütz B, Ehinger M, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood.* 2011;117(19):5067-77.
 25. 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):1330-41.
 26. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell.* 2007;129(6):1097-110.
 27. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell.* 2007;129(6):1081-95.
 28. Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature.* 2010;464(7290):852-7.
 29. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk. Res.* 2005;29(2):215-24.
 30. Blau O, Baldus CD, Hofmann W-K, Thiel G, Nolte F, Burmeister T, et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood.* 2011;118(20):5583-92.
 31. Shalapour S, Eckert C, Seeger K, Pfau M, Prada J, Henze G, et al. Leukemia-associated genetic aberrations in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Mol. Med.* 2010;88(3):249-65.
 32. Reagan MR, Ghobrial IM. Multiple myeloma mesenchymal stem cells: characterization, origin, and tumor-promoting effects. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(2):342-9.
 33. Chao Y-H, Peng C-T, Harn H-J, Chan C-K, Wu K-H. Poor potential of proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells derived from children with severe aplastic anemia. *Ann. Hematol.* 2010;89(7):715-23.
 34. Eckrich M, Pasquini M. Hematopoietic cell transplantation in Latin America. *Hematology.* 2012 Apr;17 Suppl 1:S189-91.
 35. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzmán P. Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch. Med. Res.* 2003;34(6):476-88.
 36. McGrath KE, Palis J. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp. Hematol.* 2005;33(9):1021-8.
 37. Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* 2004;2(3):E75.
 38. Levesque J-P, Winkler IG, Rasko JEJ. Nichotherapy for stem cells: There goes the neighborhood. *Bioessays.* 2013;35(3):183-90. doi: 10.1002/bies.201200111.