

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LA INTERRELACIÓN ENTRE
LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES Y
LAS CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS EN PACIENTES CON
SÍNDROME MIELODISPLÁSICO**

Olga López Villar

2010



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina

**D^a. M^a CONSUELO DEL CAÑIZO FERNÁNDEZ-ROLDÁN,
PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado **“ESTUDIO DE LA INTERRELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES Y LAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO”** ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada **OLGA LÓPEZ VILLAR** en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 22 de Enero de 2010.

Fdo. Prof^a. Dr^a. D^a. M^a Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán.



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina

**D. FERMÍN MARTÍN SÁNCHEZ-GUIJO,
PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA,**

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado “**ESTUDIO DE LA INTERRELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES Y LAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS EN PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO**” ha sido realizado bajo mi dirección por la licenciada **OLGA LÓPEZ VILLAR** en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, a 22 de Enero de 2010.

Fdo. Dr. D. Fermín Martín Sánchez-Guijo.

A mis padres
A mi hermana

Agradecimientos

Índice y Abreviaturas

1. Introducción

2. Hipótesis de trabajo

3. Objetivos

4. Material y Métodos

5. Resultados

6. Discusión

7. Conclusiones

8. Bibliografía

Quisiera mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a mi formación como médico especialista en Hematología y Hemoterapia, y por ello a todos los miembros del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario de Salamanca. En especial a todas aquellas personas que de un modo u otro han posibilitado la realización de este trabajo.

Quiero agradecer en primer lugar a la Profesora M^a Consuelo del Cañizo su constante apoyo durante todos estos años. Sin su ayuda, orientación, paciencia y disponibilidad este trabajo no habría sido posible. Gracias también por transmitirme su curiosidad científica.

Al Dr. Fermín M. Sánchez-Guijo por su ayuda e interés en este trabajo. Quisiera darle la enhorabuena por ser esta su primera tesis dirigida.

Al Profesor Jesús San Miguel por permitirme trabajar en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario de Salamanca y también por transmitir siempre su espíritu de trabajo y mejora constante.

A la Dra. Eva Villarón por haberme ayudado desde mi primer día en el laboratorio de cultivos.

Al Dr. Juan Luis García por habernos ayudado desde el inicio con todos los estudios genéticos, antes de saber si nuestros resultados serían positivos.

Al Dr. Carlos Santamaría por la realización de los estudios de PCR, por su mediación en parte de los estudios de arrays y por su ayuda en los estudios de rutas.

A Sandra Muntion por su ayuda y por haberse incorporado rápidamente a unos estudios ya iniciados.

A la Dra. Pilar Hernández por su ayuda con el estudio de “sorting” y con las figuras de citometría.

A la Dra. Norma Gutiérrez por su ayuda en los estudios de arrays de cultivos.

A la Dra. Julia Almeida por haberme ayudado con los estudios de citometría.

Al Dr. José Antonio Pérez Simón por aportar siempre un punto de vista diferente.

A los Drs. Jesús María Hernández Rivas y Marcos González por su mentalidad crítica con los distintos estudios.

A los Drs. M^a Victoria Barbado y Jesús G. Briñón por la realización de las tinciones de condrocito.

A Irene Rodríguez, Sara González, Cristina Robledo y Francisco González por su ayuda en los distintos estudios de arrays.

A M^a Luz Sánchez por reservarnos el “sorter”.

Al Dr. Luis Ignacio Sánchez Abarca por haberme ayudado siempre que ha estado en su mano, incluso sin que se lo pidiera. A la Dra. Belén Blanco por resolver muchas de mis dudas científicas básicas. A la Dra. Mercedes Alberca por haberme enseñado a congelar y descongelar células. A Rebeca Ortega por ayudarme con el clinimacs y por estar pendiente de las muestras. A Soraya Carrancio, Teresa García,

Eva Lorenzo, Manuel Herrero y Miryam Santos por ocuparse de “mis celulitas” cuando yo no he podido. A Eva García por avisarme de las muestras. También a Concepción Rodríguez, Luis Alba, Silvia Gutiérrez, a la Dra. Natalia López, Carmen Herrero, Teresa Caballero, en definitiva, a todo el Laboratorio de Cultivos Celulares.

A los Drs. José Ramón González y María Díez por avisarme de los pacientes candidatos cuando los han visto en la consulta.

A la Dra. M^a Antonia García Marcos por enseñarme a valorar los signos de mielodisplasia en las células hematopoyéticas. A todos los residentes que han pasado por el Laboratorio de Morfología, por acordarse de enviarme muestras de los pacientes. También disculpadme si alguna vez he sido muy insistente.

A las técnicas del Laboratorio de Citogenética, en especial a Teresa Prieto e Isabel Isidro por su ayuda.

A Juan Blanco, por el envío de muestras de donantes sanos.

A los Drs. Luis Palomera del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Regina García del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, y Alejandro Martín del Hospital Virgen de la Concha, porque cada uno de ellos nos ha enviado una muestra para nuestros estudios.

A todos los pacientes y donantes que han dado su consentimiento para emplear su médula ósea y / o sangre periférica en nuestros estudios.

Agradecer a los que de algún otro modo hayan colaborado con este trabajo y que, involuntariamente, pueda haber omitido.

Finalmente quiero agradecer a todos mis compañeros de residencia por su apoyo durante y después de la residencia y nuevamente a todos los que han colaborado a mi formación como médico y como especialista en Hematología y Hemoterapia.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Síndrome mielodisplásico	1
1.1.1. Epidemiología	1
1.1.2. Etiología	1
1.1.3. Fisiopatología	2
1.1.3.1. Origen celular y células hematopoyéticas de los SMD	3
1.1.3.2. Alteraciones genéticas y moleculares	5
1.1.3.3. Papel de la apoptosis	8
1.1.3.4. El micromedioambiente medular en los SMD	10
1.1.3.5. Presencia de disregulación inmune	10
1.1.4. Clasificación	11
1.2. Células stem mesenquimales	14
1.2.1. Características biológicas e identificación	14
1.2.2. Progenitoras del estroma medular	16
1.2.3. Potencial terapéutico	18
1.3. Células stem mesenquimales en los síndromes mielodisplásicos	19
1.3.1. El micromedioambiente medular en los SMD	19
1.3.2. Características de las MSC de los SMD	21
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
3. OBJETIVOS	25

4. MATERIAL Y MÉTODOS	27
4.1. MATERIAL	27
4.2. MÉTODOS	33
4.2.1. Extracción de la médula ósea	33
4.2.2. Muestras de sangre periférica	33
4.2.2.1. Obtención de las muestras	33
4.2.2.2. CGH arrays en células hematopoyéticas	33
4.2.2.3. CGH arrays en linfocitos T de SP	34
4.2.3. Separación de células mononucleadas	34
4.2.4. Células stem mesenquimales	35
4.2.4.1. Aislamiento y expansión	35
4.2.4.2. Estudio morfológico e inmunofenotípico	36
4.2.4.3. Estudios de diferenciación	37
4.2.4.4. Ciclo celular	39
4.2.4.5. Apoptosis	39
4.2.4.6. Estudio de las MSC mediante FISH con sondas comerciales	40
4.2.4.7. CGH arrays de las MSC cultivadas	40
4.2.4.8. Aislamiento de MSC no expandidas	44
4.2.4.9. CGH arrays de las MSC seleccionadas en el separador celular	45
4.2.4.10. Estudio por FISH con sondas procedentes de BAC de las MSC	46
4.2.4.11. Estudios de PCR cuantitativa en MSC	46
4.2.4.12. Estudios por Micro-Arrays de expresión de MSC de pacientes con SMD	48
4.2.5. Estudios en transwell	50
4.2.5.1. Preparación de las muestras	50
4.2.5.2. Estudio del perfil de expresión génica mediante “microarrays”	51
4.2.6. Análisis estadístico	54

5. RESULTADOS	55
5.1. Estudios de expansión y caracterización de las MSC de pacientes con síndrome mielodisplásico	55
5.1.1. Cultivo de MSC	57
5.1.2. Análisis fenotípico de las MSC	58
5.1.3. Diferenciación	61
5.1.4. Ciclo celular y apoptosis	62
5.2. Análisis de clonalidad de MSC	63
5.3. Análisis mediante CGH arrays	67
5.4. Estudio de las MSC mediante PCR tras CGH arrays	77
5.5. Estudio de las MSC mediante microarrays de expresión	86
5.6. Estudios en transwell	91
6. DISCUSIÓN	95
7. CONCLUSIONES	111
8. BIBLIOGRAFÍA	113

Abreviaturas

APC: Aloficocianina.

AR: Anemia refractaria.

AREB: Anemia refractaria con exceso de blastos.

AREBt: Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación.

AREB-1: Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1.

AREB-2: Anemia refractaria con exceso de blastos tipo 2.

ARSA: Anemia refractaria con sideroblastos en anillo.

BAC: Cromosomas artificiales de bacterias.

BFU-E: Unidad formadora de “burst” eritroides.

BFU-MK: Unidad formadora de “burst” megacariocíticas.

CD: Cluster de diferenciación.

CFU-B: Unidad formadora de colonias basofílicas.

CFU-E: Unidad formadora de colonias eritroides.

CFU-Eo: Unidad formadora de colonias eosinofílicas.

CFU-G: Unidad formadora de colonias granulocíticas.

CFU-GM: Unidad formadora de colonias granulomonocíticas.

CFU-M: Unidad formadora de colonias monocíticas.

CFU-MK: Unidad formadora de colonias megacariocíticas.

CFU-L: Unidad formadora de colonias linfocitarias.

CFU-Mix: Unidad formadora de colonias mixtas.

CGH: Hibridación genómica comparada.

CH: Células hematopoyéticas.

cols: Colaboradores.

CO₂: Dióxido de carbono.

CSH: Célula “stem” hematopoyética.

CRDM: Citopenia refractaria con displasia multilínea.

CRDM-SA: Citopenia refractaria con displasia multilínea y sideroblastos en anillo.

Cy3: Colorante fluorescente de Cyanina-3 color verde.

Cy5: Colorante fluorescente de Cyanina-5 color rojo.

del: deleción.

D-MEM: Medio “Dulbecco’s modified Eagle”.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilen diamino tetraacético.

EGTA: Ácido etilen glicol tetraacético.

EIF2AK1: “Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase1”.

FAB: Conferencia Franco-Americo-Británica.

FCHs: Factores de crecimiento.

Fig.: Figura.

FISH: Hibridación in situ fluorescente.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FGF: Fibroblastic grow factor.

FSC: Forward scatter (dispersión frontal de luz).

GDF15: “Growth differentiation factor 15”.

Hb: Hemoglobina.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperzineetanolsulfónico.

HLA: Human leukocyte antigen.

IMDM: Medio “Iscove’s Modified Dulbeccos’s”.

INF: Interferon.

IL: Interleucina.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.

KCl: Cloruro potásico.

LAM: Leucemia aguda mieloblástica.

LMMC: Leucemia mielomonocítica crónica.

MO: Médula ósea.

MSC: Célula “stem” mesenquimal.

NaHCO₃: Bicarbonato sódico.

NOD-SCID: Ratón no obeso diabético con inmunodeficiencia severa combinada.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAC: Cromosoma artificial P1.

PBS: Buffer fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PE: Ficoeritrina.

PerCPCy5.5: Proteína peridín clofoflica-cianina 5.5.

RNA: Ácido ribonucleico.

rpm: Revoluciones por minuto.

RQ-PCR: PCR en tiempo real.

SAM: Análisis de significación de microarrays.

SMD: Síndrome mielodisplásico.

SMD/SMP: Síndromes mielodisplásicos / mieloproliferativos.

SMDu: Síndrome mielodisplásico inclasificable.

SP: Sangre periférica.

SSC: Side scatter (dispersión lateral de luz).

TCR: Receptor de célula T.

TGF: factor de crecimiento tumoral.

TNF: factor de necrosis tumoral.

TRAIL: “Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand”.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial.

1.1. Síndromes Mielodisplásicos

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo de enfermedades clonales de la célula stem hematopoyética. Se caracterizan por una hematopoyesis ineficaz que se manifiesta como anemia, neutropenia y / o trombocitopenia en grado y combinaciones variables, que provoca dependencia trasfusional y riesgo de infección o hemorragia; se caracterizan además por un riesgo incrementado de transformación a leucemia aguda mieloblástica (LAM) ^{1;2}.

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia global de los SMD varía entre 2,1 y 12,6 casos por 10⁵ habitantes/año, pero se aproxima a 50 casos por 10⁵ habitantes/año en personas mayores de 70 años. La mediana de edad de los pacientes se encuentra entre 60 y 70 años con predominio en varones ².

1.1.2. ETIOLOGÍA

En la etiología de los SMD se han implicado distintos factores entre los que se incluyen la edad, el sexo masculino, el consumo de alcohol o tabaco, la exposición a radiaciones ionizantes o benceno, el tratamiento inmunosupresor o las infecciones víricas. Sin embargo, estos factores no son frecuentes pudiéndose encontrar antecedentes de los mismos únicamente en el 20-30% de los casos y casi siempre se describen en aquellos casos considerados como SMD secundarios. En el resto, es

decir en la mayoría de los pacientes, no se conoce ningún agente etiológico que influya en su desarrollo ².

1.1.3. FISIOPATOLOGÍA

Se considera que el desarrollo de un SMD es un proceso multi-escalonado. Eventos oncogénicos no bien definidos dan lugar a una población genéticamente inestable con una capacidad proliferativa aumentada que condicionará nuevas alteraciones genómicas que, a su vez, influirán en la progresión de la enfermedad. Entre las alteraciones que condicionan el comportamiento anormal de esta población se describe el daño a nivel de DNA junto a mecanismos de reparación del mismo defectuosos, vías de transducción de señal alteradas, incremento de la apoptosis, un micromedioambiente favorecedor del crecimiento de esta población y unos mecanismos de inmunovigilancia también alterados ³. (Fig. 1) Revisaremos someramente estos mecanismos.

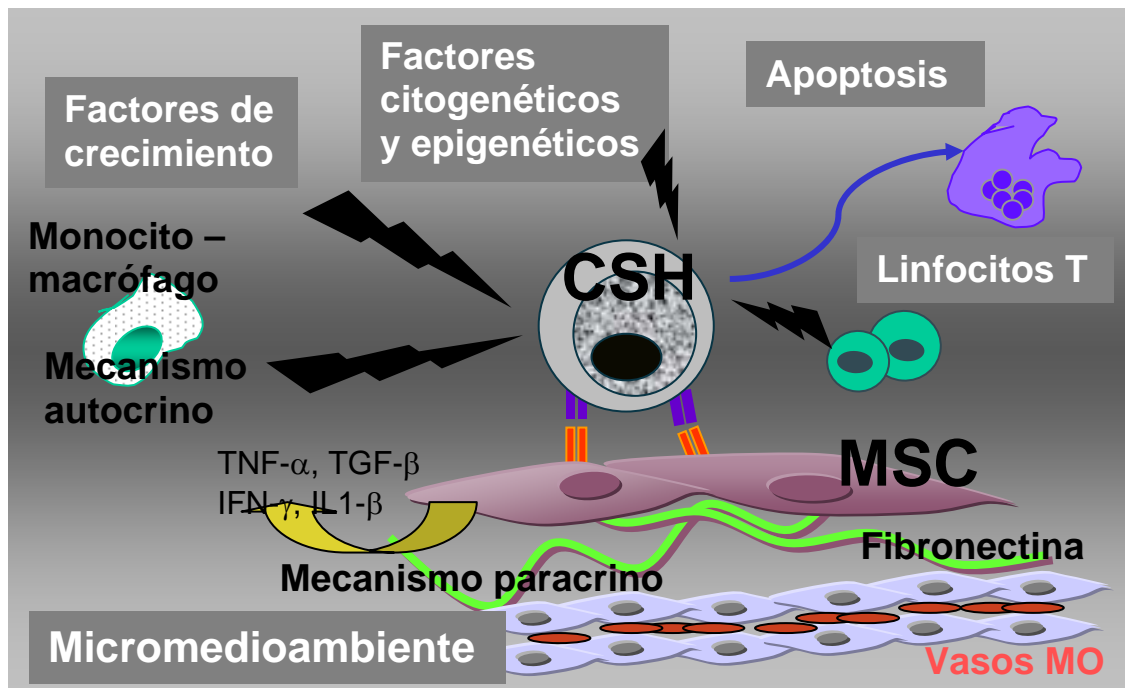


Figura 1: Mecanismos fisiopatológicos que influyen en el desarrollo de los SMD. CSH: célula stem hematopoyética. MSC: célula stem mesenquimal. TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa. TGF- β : factor de crecimiento tumoral beta. IFN- γ : interferón gamma. IL1- β : interleucina 1beta. VasosMO: microvasculatura de la médula ósea.

1.1.3.1. Origen celular y células hematopoyéticas de los SMD

Una cuestión básica para conocer a fondo la biología de los SMD es determinar en qué célula se origina la enfermedad. En la actualidad se sabe que, en la hematopoyesis normal y en la leucémica, existen células capaces de iniciar la hematopoyesis normal en el ratón NOD-SCID (SRCs- “SCID repopulating cell”) ó la hematopoyesis leucémica (SLICs- “SCID leukemia initiating cell”) que se consideran las verdaderas células “stem” de cada proceso respectivamente. En los SMD no existen datos fidedignos sobre esta población celular ya que, en el modelo de xenotrasplante, el injerto es muy escaso ³. Recientemente se ha comunicado que en ratones inmunodeprimidos negativos, además, para la β 2-microglobulina (NOD-

SCID- β 2-deficientes) se obtiene más fácilmente el injerto con células de SMD lo que tal vez permita conocer mejor el origen celular de la enfermedad.

Otra estrategia utilizada para definir estas células ha sido, en pacientes con un marcador citogenético de clonalidad, obtener mediante técnicas de “sorting” (separación celular) diferentes poblaciones celulares y analizar en cuáles se encontraba dicho marcador clonal. Así, se ha observado que en pacientes con síndrome 5q- células CD34+CD38-, con potencial linfomieloide son portadoras de la alteración citogenética ⁴. En un trabajo recientemente publicado los autores muestran que las células CD34+CD38-Thy+ son clonales en pacientes con 5q- ⁵. Analizando en esta población su patrón de expresión génica comprueban que es similar al de las células “stem” hematopoyéticas normales con sobre-expresión de BMI1, gen implicado en los procesos de autorrenovación. Incluso células aún más inmaduras, (CD45-CD34-CD38-Lin-) pueden mostrar alteraciones citogenéticas clonales ⁶.

El análisis de los progenitores hematopoyéticos ya determinados ha demostrado que su comportamiento “in vitro” es muy variable, pero en general, el crecimiento de los granulomonocíticos es fundamentalmente a base de agregados con escasas colonias y el resto de los progenitores, -eritroides, megacariocíticos y mixtos- está disminuido ^{6,7}. Incluso el crecimiento de los progenitores más inmaduros es menor que el de las MO normales. Estudios de nuestro grupo han mostrado que el número de estos progenitores está disminuido y que esta disminución es más evidente en SMD con alteraciones citogenéticas, con diferencias en el comportamiento “in vitro” dependiendo de la alteración citogenética ⁸.

Además, los progenitores hematopoyéticos de estos pacientes presentan una respuesta disminuida o incluso anómala a los factores de crecimiento (FCHs) ⁹. Esta disminución en la respuesta puede, asimismo, favorecer los fenómenos de apoptosis

pues es bien conocido que los FCHs actúan también como factores de supervivencia. En algunos casos los progenitores hematopoyéticos pueden responder de forma adecuada a los FCHs cuando éstos se encuentran a concentraciones farmacológicas en el medio de cultivo ⁹.

También los progenitores pueden presentar otras alteraciones funcionales. Así, se ha demostrado que las células progenitoras de los SMD presentan disminución de algunas moléculas implicadas en la adhesión al estroma, lo que podría además favorecer su apoptosis ¹⁰.

1.1.3.2. Alteraciones genéticas y moleculares

Alteraciones genéticas

Aproximadamente en el 50% de los pacientes con SMD “de novo” se encuentran alteraciones citogenéticas clonales ^{11;12}. En este epígrafe nos centraremos en los mecanismos que pueden estar implicados en la fisiopatología del proceso.

A diferencia de lo que se observa normalmente en las LAM, en estos pacientes los hallazgos más frecuentes son alteraciones no balanceadas con pérdidas completas o parciales de material cromosómico: del(5q), -5, del(11q), del(12q), del(20q), del(7q), -7, del(17p) y del(13q) ^{1;12;13}. Estas alteraciones citogenéticas y/o el número de ellas presentes en cada caso reflejarían la inestabilidad genética de estos clones celulares y la tendencia a adquirir nuevas alteraciones. Por otro lado, la presencia de deleciones sugiere la pérdida de genes supresores de tumor o implicados en la reparación del DNA.

La pérdida total o parcial del cromosoma 5 es una de las alteraciones citogenéticas más frecuentemente observadas en los SMD ². El cromosoma 5, a nivel de su brazo largo, contiene numerosos genes implicados en la regulación de la

hematopoyesis como citocinas y sus receptores, reguladores del ciclo celular y factores de transcripción. La posibilidad de que a este nivel se localice un gen supresor tumoral cuya pérdida sea la que condicione el inicio del síndrome 5q-, ha llevado a la búsqueda de dicho gen. Para ello se ha delimitado la región crítica de pérdida genética a nivel de 5q31-q32 que es diferente de la región definida en otros SMD o LAM en los que está afectado el brazo largo del cromosoma 5. Muchos son los genes que se han mapeado en esta región. Hasta el momento actual, sin embargo, no se ha identificado ningún gen supresor tumoral responsable del proceso aunque se han sugerido algunos (MEGF1, G-3BP) ¹⁴. En esta búsqueda ha cobrado especial importancia el gen RPS14 puesto que se ha demostrado que la haploinsuficiencia en este gen causa un fenotipo idéntico al que presentan los casos de síndrome 5q- y su sobreexpresión forzada revierte este fenotipo ¹⁵. Gracias al estudio del mecanismo de acción de lenalidomida se ha implicado al gen SPARC en la fisiopatología de los SMD, puesto que con este tratamiento se hiperexpresa este gen que está implicado en la inhibición del crecimiento, de la adhesión y de la angiogénesis ¹⁶.

La pérdida total o parcial del cromosoma 7 se observa en el 10% de los SMD “de novo” y en el 50% de los secundarios. El segmento comúnmente delecionado se encuentra en la banda q22 e incluye 14 genes candidatos. El mecanismo implicado en estos procesos podría ser la haploinsuficiencia.

Alteraciones moleculares

Las alteraciones moleculares de los SMD se conocen en menor medida que las que se producen en las LAM siendo mucho menos frecuentes las mutaciones puntuales. Se considera que para que se desarrolle una LAM se precisan al menos dos tipos de mutaciones: una mutación clase I que produzca una activación

constitucional de moléculas con actividad tirosin-kinasa o que afecte a algún miembro de la familia RAS, y una mutación clase II que disregule un factor de transcripción hematopoyético o un co-activador transcripcional. Esto va a producir alteraciones en el control de la proliferación/autorrenovación celular y por otro lado una parada en la diferenciación. Sin embargo, estas alteraciones no se reproducen en los SMD ¹⁷. De hecho en estos procesos, aunque la diferenciación está alterada, ésta no se bloquea hasta las fases avanzadas cuando se produce la transformación a LAM. Así, algunas de las alteraciones descritas, comunes con las observadas en la LAM como mutaciones o duplicaciones internas en tandem de FLT3, se relacionan con la transformación de estos procesos a LAM. De igual manera, las mutaciones de *NRAS* son más frecuentes en estadios avanzados por lo que se considera que puedan estar más en relación con la progresión de la enfermedad que con un evento primario ¹⁸. Una de las pocas mutaciones puntuales que se han observado con cierta frecuencia (7-25% de los casos) afecta a *AML1/RUNX1* pero se observa preferentemente en pacientes con SMD secundarios o aquellos que tienen pérdidas del cromosoma 7 ¹⁹.

Otras anomalías que se han relacionado con estos procesos son amplificación de *MLL* o traslocaciones que dan lugar a nuevas proteínas de fusión como *MLL-CBP*, *AML1-FOG2*.

En general, podemos decir que diferentes genes con distintas funciones se han implicado en el desarrollo de los SMD: genes supresores tumorales como hemos comentado previamente, oncogenes (se han descrito mutaciones por ejemplo en genes de la familia *ras*), genes implicados en la regulación del ciclo celular o genes implicados en los mecanismos de apoptosis ¹³.

Como se ha hecho en otras hemopatías, también en los SMD se ha estudiado el patrón de expresión génica utilizando la metodología de microarrays. Varios genes

estaban sobre o infraexpresados y algunos importantes implicados en mecanismos de proliferación celular o apoptosis ¹⁶.

Pero no solamente se han descrito las alteraciones genéticas antedichas en los SMD. También pueden estar alterados mecanismos epigenéticos, fundamentalmente los genes que regulan la metilación de DNA y la deacetilación de histonas. La disregulación de genes que codifican enzimas y proteínas implicadas en modificar la estructura de la cromatina y los patrones de metilación del DNA está implicada en la oncogénesis a través de la inactivación transcripcional de genes críticos. Entre éstos pueden estar incluidos genes supresores de tumor, genes implicados en la reparación del DNA o en la proliferación y diferenciación celular. En los SMD se ha descrito metilación aberrante de *p15*, un inhibidor de ciclina dependiente de kinasas y calcitonina ^{1;13}.

En resumen, las alteraciones descritas a nivel genético y epigenético son muy variadas y en relación con distintos aspectos fisiopatológicos implicados en el desarrollo y evolución de estos procesos, poniendo de manifiesto la gran complejidad de los SMD.

1.1.3.3. Papel de la apoptosis

Uno de los procesos implicados en la fisiopatología de los SMD y actualmente aceptado por la mayoría de los autores es el incremento en la apoptosis. Este mecanismo justificaría de alguna manera la existencia de citopenias periféricas junto a una médula ósea (MO) normo o hiper celular. Queda por establecer de forma definitiva si este incremento se produce en las células más inmaduras, en los progenitores determinados o en ambas poblaciones ⁴. Pese a que este mecanismo es aceptado por la mayoría de los autores su relevancia clínica es controvertida ³.

El incremento de la apoptosis puede estar implicado de diferentes formas, como iremos viendo en los epígrafes siguientes.

En los subtipos de bajo riesgo es mayor la muerte celular y va disminuyendo con la progresión de la enfermedad ⁶. Estos hallazgos han sido confirmados por diferentes grupos y con distintos métodos de estudio: expresión de Anexina V, expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis como Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bad, estudio de caspasas, etc.

Este incremento en la apoptosis se debe a un aumento en la señalización a través de receptores de muerte celular. Las células hematopoyéticas de los SMD sobreexpresan algunas moléculas como CD95 (FAS) y TRAIL (tumor necrosis factor- related apoptosis inducing ligand) que son receptores de dicha muerte celular así como un incremento en sus ligandos. El origen de estos últimos, TNF α y FAS-ligando, es incierto habiéndose implicado en su producción a macrófagos, células del estroma medular o linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, se ha descrito que las propias células hematopoyéticas de los SMD sobre-expresan TNF α y CD95-ligando por lo que se podría producir un estímulo continuado de esta vía por un mecanismo autocrino ³.

La vía mitocondrial de la apoptosis también puede estar implicada en este proceso, sobre todo en los casos de SMD en los que un componente celular importante son los sideroblastos en anillo. En estos casos, el depósito anómalo de hierro en las mitocondrias podría estimular esta ⁹.

1.1.3.4. El micromedioambiente medular en los SMD

Dado que es el eje central de presente trabajo se verá detalladamente en el punto 1.3.1

1.1.3.5. Presencia de disregulación inmune

Aunque en muchos casos no se ha podido demostrar la clonalidad de los linfocitos en los pacientes con SMD, un hallazgo frecuente y de todos conocido son las alteraciones inmunológicas que se encuentran en estos pacientes. De hecho, en un estudio realizado con un amplio número de casos, se comprobó que el 63% de los pacientes analizados presentaban alguna alteración en los estudios biológicos relacionados con la inmunidad ⁹. Las alteraciones más frecuentemente descritas son hipergammaglobulinemia así como alteraciones cuantitativas y funcionales de los linfocitos T y de las células NK ⁶. Estos datos llevaron a proponer que la mielosupresión observada en los SMD podría deberse a un proceso autoinmune mediado por linfocitos T ¹. La inhibición específica de la hematopoyesis, al menos *in vitro*, ha sido demostrada recientemente por Sloand y cols ²⁰. Estos autores comprobaron que en pacientes con SMD y trisomía 8 existía una expansión de linfocitos T CD8+ de una misma familia o más, definidas por el receptor T (TCR) V β . Separando estas células y realizando cultivos de progenitores hematopoyéticos comprobaron que dichos linfocitos inhibían específicamente el crecimiento de colonias con trisomía 8.

Más recientemente se ha demostrado que en muchos pacientes con SMD puede observarse una expansión de linfocitos T citotóxicos y que los clonotipos inmunodominantes pueden utilizarse para el seguimiento del tratamiento inmunosupresor ²¹.

Nuevas aportaciones sobre las alteraciones que pueden demostrarse en los SMD están abriendo más puertas al conocimiento del desarrollo y progresión de los SMD²².

1.1.4. CLASIFICACIÓN

Dada la heterogeneidad de los SMD se han realizado varias clasificaciones. La clasificación FAB (tabla 1) separaba 5 subgrupos de SMD en función del porcentaje de blastos en MO y en sangre periférica (SP), el porcentaje de sideroblastos en anillo y la presencia de monocitosis en SP²³. La clasificación OMS de 1999 (tabla 2), modificó esta clasificación separando como LAM los pacientes con un conteo de blastos en MO superior al 20%. También en la clasificación OMS, la leucemia mielomocítica crónica fue incluida en una nueva categoría mixta síndromes mielodisplásicos / mieloproliferativos (SMD/SMP) y se incorporaron nuevos subtipos de SMD, a destacar el síndrome 5q-²⁴. En el año 2008 se ha publicado una actualización de esta clasificación²⁵, no obstante la empleada en este estudio ha sido la clasificación de 1999 por ser la vigente al inicio del estudio.

Tabla 1: Clasificación FAB de los SMD²³

Subtipo SMD	% Blastos en SP	% Blastos en MO	% Sideroblastos	Monocitos en SP
AR	<1	<5	<15	-
ARSA	<1	<5	>15	-
AREB	<5	5-20	-	-
AREBt	>5	21-30	-	-
LMMC	<5	5-20	-	>1x10 ⁹ /L

AR: anemia refractaria. ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo. AREB: anemia refractaria con exceso de blastos. AREBt: anemia refractaria con exceso de blastos en transformación. LMMC: leucemia mielomonocítica crónica

Tabla 2: Clasificación OMS 1999 de los SMD ²⁴

Subtipo SMD	SP	MO
AR	Anemia	Solo displasia eritroide
	No blastos o escasos	<5% blastos <15% sideroblastos en anillo
ARSA	Anemia	Solo displasia eritroide
	No blastos	≥15% sideroblastos en anillo <5% blastos
CRDM	Citopenias (bicitopenia o pancitopenia)	Displasia en ≥10% de las células en 2 o más líneas mieloides
	No blastos o escasos	<5% blastos
	No bastones de Auer	No bastones de Auer
	<1x10 ⁹ /L monocitos	<15% sideroblastos en anillo
CRDM-SA	Citopenias (bicitopenia o pancitopenia)	Displasia en ≥10% de las células en 2 o más líneas mieloides
	No blastos o escasos	≥15% sideroblastos en anillo
	No bastones de Auer	<5% blastos
	<1x10 ⁹ /L monocitos	No bastones de Auer
AREB-1	Citopenias	Displasia en una o múltiples líneas
	<5% blastos	Blastos 5-9%
	No bastones de Auer	No bastones de Auer
	<1x10 ⁹ /L monocitos	
AREB-2	Citopenias	Displasia en una o múltiples líneas
	Blastos 5-19%	Blastos 10-19%
	Bastones de Auer ±	Bastones de Auer ±
	<1x10 ⁹ /L monocitos	
Síndrome 5q-	Anemia	Megacariocitos normales o aumentados
	<5% blastos	con núcleo hipolobulado
	Plaquetas normales o aumentadas	<5% blastos
		No bastones de Auer del(5q) aislada

SMDu	Citopenias	Displasia de una línea en granulocitos o megacariocitos
	No blastos o escasos	
	No bastones de Auer	<5% blastos
		No bastones de Auer

AR: anemia refractaria. ARSA: anemia refractaria con sideroblastos en anillo. CRDM: citopenia refractaria con displasia multilinea. CRDM-SA: citopenia refractaria con displasia multilinea y sideroblastos en anillo. AREB-1: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 1. AREB-2: anemia refractaria con exceso de blastos-tipo 2. SMDu: SMD inclasificable.

1.2. Células Stem Mesenquimales

Gracias a Fridenstein y cols. se conoce desde 1966 la presencia en MO de una población de células no hematopoyéticas, progenitoras del estroma medular, denominadas actualmente células stem mesenquimales (MSC) ²⁶. Esta población puede aislarse a partir de distintas fuentes celulares además de la médula ósea, entre las que se encuentran la trabécula ósea, la decidua dental, el tejido sinovial, el tejido adiposo, el tejido muscular y el periostio, además de la sangre periférica y la sangre de cordón umbilical ²⁷. Como células stem o células madre presentan capacidad de proliferación y de autorrenovación, son capaces de diferenciarse a varias líneas y responden a distintos estímulos ²⁸. A continuación veremos estos puntos.

Dado que el número de éstas células en la MO es muy limitado (1 MSC por cada 10^4 - 10^5 de células mononucleadas de MO) ^{29;30}, los estudios realizados en estas células se han llevado a cabo sobre células expandidas in vitro.

1.2.1. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E IDENTIFICACIÓN

En cultivo, las MSC humanas constituyen una población de células con morfología en forma de huso alargado y aspecto fibroblástico, adherentes al plástico ³¹. Presentan una vida limitada, con un tiempo medio de duplicación de 33 h y con un número máximo de duplicaciones en torno a 40. Según aumenta el número de pases, estos progenitores aparentemente pierden su capacidad multipotencial y entran en apoptosis. Los estudios de ciclo celular en cultivos de MSC en humanos revelan que mientras una pequeña fracción de estas células está proliferando (aproximadamente

el 10% de las células están en fase S+G2+M), la amplia mayoría de las células están en fase G0/G1, la cual incluye una minoría de células en estado quiescente^{29;32}.

Debido a la ausencia de un marcador fenotípico específico, su identificación se realiza excluyendo los distintos marcadores de línea hematopoyética (CD34, CD45, CD14, CD19) y realizando una identificación positiva para alguno de los siguientes antígenos CD90, CD73, CD105, CD44, CD106^{33;34}.

Las MSC son capaces de diferenciarse in vitro hacia diversos tipos celulares derivados del mesodermo como son adipocitos, osteoblastos, condroblastos, células reticulares, tenocitos, miocitos^{27;33}, pero también se postula su posible diferenciación a neuroectodermo³⁵. De confirmarse este último resultado, las MSC pasarían a ser células madre pluripotenciales, aumentando así su posible utilización en terapia regenerativa.

Debido a la ausencia de un marcador de superficie específico y a la necesidad de estandarización, en el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció, como consenso, los criterios mínimos para identificar las MSC³⁶. Estos criterios se encuentran resumidos en la tabla 3.

Tabla 3: Criterios para identificar MSC (ISCT)³⁶.

1	Adherencia al plástico en cultivo
2	Fenotipo Positivo ($\geq 95\%$): CD90, CD73, CD105 Negativo ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19, HLA-DR
3	Diferenciación in vitro a osteoblastos, adipocitos y condroblastos

Estos criterios indican el estudio mínimo a realizar para confirmar que se está trabajando con MSC, lo que no excluye la posibilidad de ampliar los marcadores de superficie estudiados.

Se está intentando realizar la caracterización de las MSC sin necesidad de expansión *in vitro*. Para ello hay que destacar el trabajo de Buhrin en el que describe cómo se pueden aislar las MSC de MO seleccionándolas por su expresión de CD271 y CD73 dentro del compartimento negativo para marcadores hematopoyéticos³⁷.

1.2.2. PROGENITORAS DEL ESTROMA MEDULAR

La población de células que forman el estroma hematopoyético es heterogénea. Está compuesta por diversos tipos celulares, como son células endoteliales, reticulares, adipocitos, fibroblastos y osteoblastos³⁸, todas ellas tienen un origen común, la MSC^{27;33}. El estroma, como ya hemos dicho, no tiene únicamente un papel de sustento físico de las células hematopoyéticas (CH) sino que además regula la hematopoyesis mediante la secreción de citocinas, bien en reposo o bien tras estimulación, entre las que se incluyen tanto factores de crecimiento hematopoyéticos como no hematopoyéticos^{39;40}. Las MSC tienen un papel clave en este estroma, no sólo como células madre sino que ellas mismas realizan interacciones directas con las células hematopoyéticas^{40;41}.

Todo ello confirma una participación dinámica de las MSC en el microambiente medular, demostrado esto además por la producción de estas células de fibronectina, laminina, colágeno y proteoglicanos. De particular interés es la expresión de CD44 por parte de las MSC, receptor que puede jugar un papel importante en la organización de la matriz extracelular en la médula⁴².

Recordamos en este punto la organización del sistema hematopoyético preferentemente en regiones diferenciales o nichos medulares (Fig. 2). En el nicho osteoblástico las células progenitoras hematopoyéticas permanecen períodos

prolongados en un estado no proliferativo. En el nicho vascular las CH diferenciadas alcanzan finalmente la circulación. Es en estos nichos donde las células del estroma ejercen su función reguladora local, facilitando contactos celulares adecuados y sintetizando moléculas que contribuyen al mantenimiento celular, así como a la producción del número adecuado de precursores comprometidos para diferenciarse hacia cada estirpe celular^{39;40;43}. El papel que el microambiente de la médula ósea juega en los mecanismos de proliferación y diferenciación ha sido ampliamente demostrado^{44;45}, principalmente a través de los cultivos a largo plazo de precursores mieloides y linfoides^{8;46}.

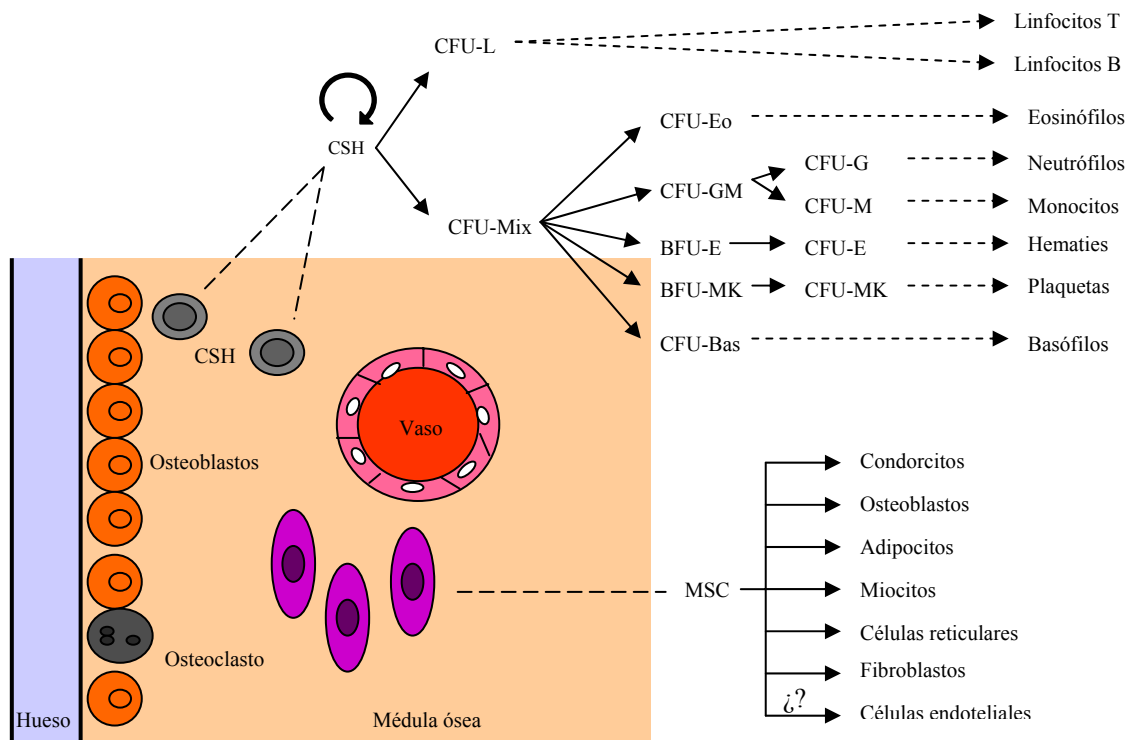


Figura 2: Relación entre las células hematopoyéticas y el estroma. Modificado de Yin et al.³⁹.

1.2.3. POTENCIAL TERAPÉUTICO

En la actualidad se están llevando a cabo numerosos estudios preclínicos / clínicos utilizando las MSC en terapia regenerativa debido a su potencial de diferenciación ⁴⁷⁻⁵¹. Además se ha observado que en el trasplante de progenitores hematopoyéticos la co-infusión de MSC favorece el injerto hematopoyético, tanto en modelos animales ⁵²⁻⁵⁴ como en estudios piloto en humanos ⁵⁵. Hay que destacar otra importante aplicación de las MSC en el contexto del trasplante hematopoyético, debido a su capacidad de inmunomodulación ⁵⁶⁻⁶⁰ y a su escasa inmunogenicidad ⁶¹ se están empleando, en el contexto de ensayos clínicos, en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped tanto aguda ⁶²⁻⁶⁵ como crónica ⁶³.

1.3. Células Stem Mesenquimales en los Síndromes Mielodisplásicos

1.3.1. EL MICROMEDIOAMBIENTE MEDULAR EN LOS SMD

En los últimos años está tomando cuerpo la hipótesis de que para el desarrollo tumoral, además de las células clonales, también el micromedioambiente en el que éstas se desarrollan tiene una importancia clave, pues para que la enfermedad se produzca necesitaría un ambiente “favorecedor”⁶⁶. En los SMD, como hemos comentado previamente, se produce una alteración en los mecanismos de proliferación/diferenciación y un incremento de la apoptosis. Las células del estroma son productoras de gran número de citocinas implicadas en regular estos procesos. Hasta qué punto las células del estroma son realmente defectuosas o si su papel es simplemente reactivo es algo que se está debatiendo ampliamente en los últimos años^{67;68}.

Se han planteado dos cuestiones básicas que en el momento actual aún no están completamente resueltas: ¿las células del estroma medular forman parte del clon neoplásico? y si no forman parte ¿son normales?.

Con respecto a la primera cuestión la mayoría de los autores que han estudiado las células adherentes obtenidas mediante metodología de cultivo a largo plazo consideran que las células del estroma no pertenecen al clon tumoral⁶⁹.

Con respecto a la segunda cuestión también han existido discordancias en cuanto a si el estroma medular es o no funcionalmente normal. Mientras algunos autores consideran que su capacidad de mantener la hematopoyesis es similar a la de

los controles ⁷⁰, otros autores consideran que esta capacidad es defectuosa e incluso la composición celular del estroma está alterada con una proporción mayor de osteoblastos respecto a las MO normales ⁷¹. Como es bien sabido, los osteoblastos son componentes fundamentales del nicho de la CSH y están implicados en su regulación ⁷².

Lo que no plantea dudas en el momento actual es que en los SMD tiene lugar una secreción alterada de citocinas con mayor producción de citocinas pro-inflamatorias y pro-apoptóticas por parte del estroma (TNF- α , IFN, TGF- β , IL-1 β , VEGF) que disminuiría la proliferación de los progenitores hematopoyéticos y promovería su apoptosis. El componente celular responsable de su producción no está claramente definido. Parecen estar implicados en el proceso los macrófagos (por lo tanto células pertenecientes al clon patológico), linfocitos T y probablemente células del estroma medular ⁶⁸. En la Fig. 1 se muestra un esquema de cómo el estroma puede estar implicado en la fisiopatología de estos procesos.

El incremento de la angiogénesis es uno de los mecanismos implicados en la fisiopatología de diferentes hemopatías, entre ellas los SMD. Como comentábamos, una de las citocinas implicadas sería el VEGF. Varios estudios han analizado la densidad de microvasculatura en la MO y han comprobado que ésta se encuentra aumentada ^{73;74}. Pero el incremento en la secreción de VEGF no va a actuar únicamente sobre la angiogénesis. Los progenitores hematopoyéticos, sobre todo los más inmaduros poseen receptores para VEGF produciéndose de esta manera un incremento de la proliferación promovido por mecanismo autocrino y/o paracrino ⁷⁵.

Puesto que las células que originan los componentes del estroma medular son las MSC, más recientemente algunos autores han analizado por diferentes métodos si las MSC son o no normales, tanto si pertenecen al clon patológico como si no. Para

llevar a cabo este tipo de estudios es preciso expandir estas células in vitro puesto que su número es muy escaso. Soenen-Cornu y cols. en casos de pacientes con SMD que presentaban alteraciones citogenéticas, descartaron la existencia de dichas alteraciones clonales en las MSC mediante análisis por hibridación in situ fluorescente (FISH) ⁷⁶. Sin embargo, otros autores han encontrado alteraciones cromosómicas en MSC de pacientes con SMD. En la gran mayoría de los casos estas alteraciones eran diferentes a las observadas en las células hematopoyéticas ^{30;77}. Todos estos datos junto a los anteriormente referidos sobre secreción de citocinas por parte del estroma, parecen sugerir que efectivamente el estroma medular de pacientes con SMD está de alguna manera alterado y probablemente desempeña un papel favorecedor del desarrollo de la enfermedad.

1.3.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MSC DE LOS SMD

Puesto que las MSC son claves en la formación del estroma medular ^{27;33;38} y éste a su vez, como hemos visto, juega un papel fundamental en la fisiopatología de los SMD ⁶⁶⁻⁶⁸, en los últimos años se han realizado varios estudios sobre las MSC con resultados contradictorios ^{30;69;76-83}.

Al igual que con las MSC de MO normales, los estudios han tenido que realizarse en células expandidas en cultivo.

En lo que se refiere a la expansión y a la capacidad de diferenciación, únicamente hay dos trabajos en los que se indiquen diferencias en estos procesos respecto a los controles. En ambos se observa mayor dificultad en expandir las MSC de los pacientes y una mayor lentitud para que el cultivo alcance confluencia ^{30;78}.

Otro de los campos investigados por algunos autores ha sido la expresión de marcadores de superficie. Mientras en la mayoría de los estudios la expresión antigénica de las MSC de pacientes con SMD era normal ^{30;76}, otros autores encontraron una disminución en la expresión de CD90 y CD105 ⁷⁹.

Una de las propiedades fundamentales de las MSC es su capacidad de sustentar la hematopoyesis in vitro sin necesidad de añadir al medio de cultivo otros factores de crecimiento. En los estudios realizados con las MSC de los pacientes con SMD los resultados son contradictorios, puesto que hay estudios donde se ha encontrado que conservaban esta capacidad ^{76;80;81} mientras que en otro caso no la presentaban ⁸².

Dado que se acepta por la mayoría de la comunidad científica que el estroma de estos pacientes es anormal, una de las cuestiones más frecuentemente planteadas es saber si las células que lo componen pertenecen o no al clon patológico. Para comprobar este dato se han realizado estudios citogenéticos utilizando técnicas convencionales o FISH. Nuevamente los datos no son concluyentes. Mientras algunos autores no encontraron las alteraciones citogenéticas clonales al utilizar FISH ^{69;76}, otros encontraron alteraciones del clon displásico en las MSC ⁸³ y otros finalmente encontraron alteraciones estructurales clonales pero diferentes a las presentes en las células clonales hematopoyéticas ^{30;77}.

De lo expuesto en el apartado de INTRODUCCIÓN, se deduce que existe gran controversia en cuanto a las características morfológicas y funcionales de las células stem mesenquimales de los pacientes con síndrome mielodisplásico.

Al inicio del presente trabajo continúan existiendo numerosas cuestiones por dilucidar: si estas células presentan o no características definitorias de MSC normales, desde un punto de vista morfológico, fenotípico, en su capacidad de diferenciación, así como en sus propiedades funcionales. Las posibles alteraciones observadas en éstas nos orientarían hacia la hipótesis de que las MSC de los SMD son anormales.

Nuestra hipótesis de trabajo es que, dado que está claramente demostrado que el micromedioambiente de la MO es anormal en pacientes con SMD, las MSC, dado que son las células progenitoras del estroma, pueden presentar alteraciones que podrían estar implicadas en la fisiopatología de la enfermedad.

El interés en profundizar en la fisiopatología de los SMD, en concreto en el papel del estroma, se debe a la posibilidad creciente de diseñar tratamientos en esta patología dirigidos contra una u otra de las alteraciones implicadas.

Todos estos interrogantes han sido los que nos han inducido a realizar el presente trabajo, cuyos OBJETIVOS se exponen a continuación.

Objetivo global:

Estudiar en los SMD las características funcionales y genómicas de las MSC, progenitoras del estroma medular, comparándolas con las de sujetos sanos, y valorar su papel en la fisiopatología de la enfermedad.

Objetivos específicos:

1. Analizar si las MSC de pacientes con SMD presentan alteraciones con relación a su capacidad de proliferación, fenotipo y diferenciación.
2. Analizar la presencia de alteraciones genómicas en las MSC de pacientes con SMD que puedan justificar las alteraciones anteriormente descritas.
3. Comprobar si las alteraciones genómicas pueden estar implicadas en la disregulación de los mecanismos de control de la hematopoyesis.

4.1. Material

CÉLULAS STEM MESENQUIMALES

Se analizó la población de MSC en un total de 76 muestras de MO procedentes de pacientes diagnosticados de SMD que no habían recibido tratamiento previo. En 3 pacientes el análisis se realizó de forma secuencial en el momento del diagnóstico y en el de la progresión. Éstos 3 pacientes sólo habían recibido tratamiento de soporte entre ambos momentos.

La relación varón / mujer fue 41/35 y la mediana de edad 72 (rango 34-92).

El diagnóstico de SMD de los pacientes se estableció por los datos de hematimetría en SP, frotis, morfología de la MO y estudio citogenético. Se clasificaron de acuerdo a la clasificación de la OMS de 1999, por ser la vigente al inicio del estudio. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 4. Siete pacientes fueron diagnosticados de anemia refractaria (AR), 13 de anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA), 7 de citopenia refractaria con displasia multilinea (CRDM), 2 más de citopenia refractaria con displasia multilinea y sideroblastos en anillo (CRDM-SA), 6 pacientes con anemia refractaria con exceso de blastos tipo 1 (AREB-1) y 12 con tipo 2 (AREB-2), 8 pacientes con SMD inclasificable (SMDu) y finalmente 21 casos de síndrome 5q-.

En lo que se refiere a las alteraciones citogenéticas presentes en las células hematopoyéticas de éstos pacientes, 47 de los 76 (61,8%) presentaban alguna alteración, siendo la delección del brazo largo del cromosoma 5 la más frecuente,

presente en 30 casos. En la tabla 4 se muestran las características citogenéticas de todos los pacientes incluidos en el presente estudio.

Tabla 4. Características clínicas y citogenéticas de los pacientes

Caso	Diagnóstico OMS	Edad	Sexo	Citogenética Convencional	Marcadores FISH
1	AR	60	F	No mitosis	5q- (4%)
2	AR	72	M	46, XY [20]	No aplicable
3	AR	64	F	46, XX [4] 46,XX,t(6;11)(q22; q14) [16]	No realizada
4	ARSA	40	F	46, XX [20]	No realizada
5	ARSA	81	M	46,XY [4] 45,X,-Y [16]	No realizada
6	ARSA	68	F	46, XX [20]	No aplicable
7	ARSA	68	F	46, XX [20]	No aplicable
8	ARSA	72	M	46,XY [3] 46,XY,-Y,+8 [17]	+ 8 (51%)
9	ARSA	77	M	No mitosis	7q- (8%)
10	CRDM-SA	80	M	No mitosis	No aplicable
11	AREB-1	55	F	46, XX [10] 46, XX, del (5)(q13q31)[8]	5q- (56%)
12	AREB -1	87	F	No mitosis	5q- (48%)
13	AREB -1	77	M	46, XY [20]	No aplicable
14	AREB -1	62	M	46, XY [20]	No aplicable
15	AREB -2	55	M	46, XY [21]	No aplicable
16	AREB -2	72	M	46, XY [20]	No aplicable
17	AREB -2	89	F	46, XX [20]	No realizada
18	AREB -2	79	M	46,XY [11] 47,XY,+8 [6] 46,XY,del(9)(q31) [2]	+ 8 (13%)
19	AREB -2	40	F	46,XX [20]	No aplicable
20	AREB -2	70	M	46,XY [12] 47,XY,+8 [8]	+ 8 (55%)
21	Síndrome 5q-	52	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [17]	5q- (41%)
22	Síndrome 5q-	79	F	5q 46,XX [6] 46,XX,del(5)(q13q31) [14]	5q- (46%)
23	Síndrome 5q-	34	F	No mitosis	5q- (20%)

24	Síndrome 5q-	62	F	46, XX [3] 46, XX, del (5) (q14q34) [16] 53, XX, +1, +2, +11, +11, +14, +21, +22 [6]	5q- (27%)
25	Síndrome 5q-	62	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [15]	-5q- (66%)
26	Síndrome 5q-	63	F	46,XX [6] 46,XX,del(5)(q13q31) [14]	5q- (49%)
27	Síndrome 5q-	75	M	No mitosis	5q- (40%)
28	SMDu	34	F	No mitosis	No aplicable
29	SMDu	69	M	46,XY [12] 47,XY,+8 [8]	+ 8 (55%)
30	SMDu	79	M	46, XY [20]	No realizada
31	SMDu	62	F	46,XX [20]	No aplicable
32	SMDu	83	M	No mitosis	No aplicable
33	ARSA	71	M	46,XY [6] 46,XY,+8 [14]	No realizada
34	Síndrome 5q-	81	F	No mitosis	5q- (48%)
35	Síndrome 5q-	48	M	No mitosis	5q- (37%)
36	Síndrome 5q-	73	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [15]	No realizada
37	Síndrome 5q-	62	M	46, XY [5] 46, XY, del(5)(q13q31)[15]	5q- (70%)
38	Síndrome 5q-	61	M	No mitosis	5q- (77%)
39	Síndrome 5q-	65	F	46, XX [12] 46, XX, del(5)(q13q31)[8]	5q- (49%)
40	Síndrome 5q-	70	F	No mitosis	5q- (44%)
41	Síndrome 5q-	72	F	46,XX [15] 46, XX, del(5)(q13q31)[5]	5q- (64%)
42	AREB -1	87	F	46, XX [2] 46, XX, del(5)(q13q31)[18]	5q- (48%)
43	ARERB -2	62	M	47, XY, del(5)(q13q31), +8, ins(13)(q13q22), add(19)(p13) [20]	5q- (62%) +8 (53%)
44	AREB -2	80	M	No mitosis	5q- (30%)
45	AR	54	F	No mitosis	+8 (5%)
46	ARSA	72	M	46, XY [4] 47, XY, +8 [10] 48, XY, +8, +17 [6]	+8 (81)
47	ARSA	74	M	No mitosis	+8 (60%)

48	AREB -2	79	M	46, XY [11] 46, XY, del(9)(q31) [2] 47, XY, +8 [7]	+8 (13%)
49	AREB -2	76	F	46, XX [7] 46, XX, del(3)(p13p23) [11] 48, XX, +8, +21 [2]	+8 (8%)
50	AREB -2	73	M	46, XY [11] 47, XY, +8[9]	+8 (28%)
51	Síndrome 5q-	60	F	No mitosis	5q- (40%)
52	Síndrome 5q-	59	M	46, XY [14] 46, XY, del(5)(q13q31)[6]	No realizada
53	Síndrome 5q-	69	M	46, XY [20]	5q- (30%)
54	Síndrome 5q-	88	M	46, XY, del(5)(q13q31)[20]	5q- (91%)
55	Síndrome 5q-	68	F	No mitosis	5q- (10%)
56	AR	65	F	46, XX [20]	No realizada
57	AR	76	M	46, XY [11] 46, XY, +8[9]	No realizada
58	ARSA	84	M	46, XY [5] 45, X, -Y [15]	No realizada
59	ARSA	81	M	46, XY [20]	No realizada
60	ARSA	67	F	46, XX [20]	No realizada
61	ARSA	72	F	46, XX [20]	No aplicable
62	CRDM	55	F	46, XX [18] 46, XX, t(2;13)(p23;q14)[2]	L13 (40%)
63	CRDM	79	M	46, XY [20]	No realizada
64	CRDM	92	F	46, XX [20]	No realizada
65	CRDM	84	F	46, XX [20]	No marcadores
66	CRDM	81	M	46, XY [21]	No marcadores
67	CRDM	77	F	46, XX [20]	No realizada
68	CRDM-SA	91	F	46, XX [20]	No aplicable
69	AREB-1	87	M	46, XY [20]	5q- (15%) 7q (17%)
70	AREB-2	62	M	47, XY, del(5)(q13q31), +8, ins13(q13q22), add(19)(p13) [20]	5q- (62%) +8 (53%)
71	SMDu	63	F	No mitosis	No aplicable
72	SMDu	79	F	No mitosis	No aplicable
73	Síndrome 5q-	71	M	46, XY [18] 46, XY, del(5)(q13q31)[2]	5q- (17%)

74	CRDM	84	M	46, XY [18] 46, XY, del(5)(q13q31)[2]	5q- (62%)
75	SMDu	87	M	46, XY, del(5)(q13q31)[20]	5q- (91%)
76	AR	73	F	No mitosis	No aplicable

Sexo: F-femenino, M-masculino. No aplicable- FISH normal para 5q, 7q y 8. L- librería.

Como controles se utilizaron muestras de 36 donantes sanos,. Relación varón / mujer 20/16, mediana de edad 60 años (rango 37-88). La diferencia de edad entre los pacientes afectados de SMD y los donantes no resultó estadísticamente significativa ($p>0,05$).

Se solicitó consentimiento informado tanto a los pacientes como a los donantes para participar en este estudio.

4.2. Métodos

4.2.1. EXTRACCIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA

La extracción de la médula ósea se realizó en todos los casos bajo anestesia local, por punción de cresta iliaca o esternón. Los tubos utilizados eran estériles (Venoject; Terumo®) y como anticoagulante tenían heparina libre de aditivos (Heparina 5000U/ml; Seromed Biochrom KG), reconstituida con agua destilada Vitulia estéril (Laboratorios ERN, SA).

Todos los sujetos fueron debidamente informados y el procedimiento se realizó de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca.

4.2.2. MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

4.2.2.1. Obtención de las muestras

Se obtuvieron mediante venopunción, empleando tubos estériles (Venoject; Terumo®) con heparina libre de aditivos (Heparina 5000U/ml; Seromed Biochrom KG), reconstituida con agua destilada Vitulia estéril (Laboratorios ERN, SA).

4.2.2.2. CGH arrays en células hematopoyéticas

Se separaron células mononucleadas de SP al diagnóstico según lo descrito en el punto 4.2.3. Se usaron como controles en los estudios genómicos para verificar

que los cambios detectados no eran somáticos. El DNA se extrajo y se realizó el CGH array según lo descrito en el punto 4.2.4.7.

4.2.2.3. CGH arrays en linfocitos T de SP

Para separar los linfocitos T se realizó marcaje con CD3 de las células mononucleadas de sangre periférica, usando el protocolo de selección inmunomagnética para AutoMACS (CD3 microbeads human, MACS Milenyi Biotec)⁸⁴⁻⁸⁸. El DNA se extrajo de esta población celular y se realizó el CGH array como se describe para las MSC en el punto 4.2.4.7.

4.2.3. SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEADAS

Tanto a partir de MO como de SP, las células mononucleadas se extrajeron por centrifugación de la muestra en gradiente de densidad sobre Ficoll (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Swden). Las muestras se diluyeron en Hanks (Hanks Salt Solution (1X) con 0.35g/l NaHCO₃; Seromed Biochrom KG) y posteriormente se centrifugaron sobre Ficoll (Ficoll Separating Solution. Density 1.077; Seromed® Biochrom KG) durante 30 minutos a 1200 rpm. Se recogió posteriormente la capa mononucleada, se lavó con medio Hanks (Hanks Salt Solution (1X) con 0.35g/l NaHCO₃; Seromed Biochrom KG) dos veces, centrifugando 10 minutos a 1200 rpm y, por el último, el botón celular o “pellet” se resuspendió en el medio de cultivo adecuado según el tipo de estudio que se fuera a realizar.

4.2.4. CÉLULAS STEM MESENQUIMALES

4.2.4.1. Aislamiento y expansión

Las células mononucleadas obtenidas de médula ósea se plantaron a una concentración de 1×10^6 células/cm² de superficie en medio D-MEM (GIBCO, BRL, Invitrogen corporation) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, BioWhittaker, Lonza, Veviers, Belgium) y un 1% de penicilina-streptomina (GIBCO, Invitrogen corporation) en frascos de cultivo (Corning, NY, USA). Cada 4-5 días las células no-adherentes se retiraron y se renovó el medio de cultivo. Se mantuvieron en estufa a 37°C con 5% de CO₂. Este cultivo se mantuvo hasta llegar a confluencias superiores al 80%, momento en que se tripsinizaron las células; para ello se retiró todo el medio de cultivo del frasco, se lavó con Hanks y se incubó con tripsina (0.05% Trypsin-EDTA; Gibco, Invitrogen corporation) durante 5 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente, tras neutralizar la tripsina con suero bovino fetal, se plantaron las células de nuevo para su expansión ⁸⁴ (fig. 3).

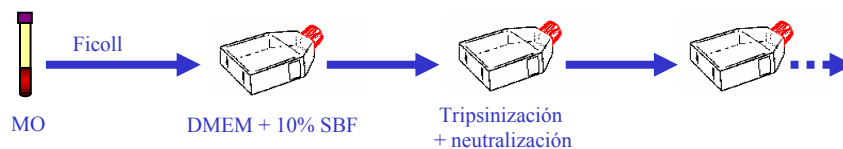


Figura 3: Esquema del aislamiento y expansión de las MSC de MO.

La selección de la población mesenquimal se realizó a través de sucesivos pases, y su pureza se analizó mediante citometría de flujo independientemente del pase en el que se encontraran las MSC previo a su utilización en los diferentes

experimentos. En la fig. 4 podemos observar los sucesivos pases que se realizaron al cultivo, dependiendo del número de células mononucleadas en la muestra inicial.

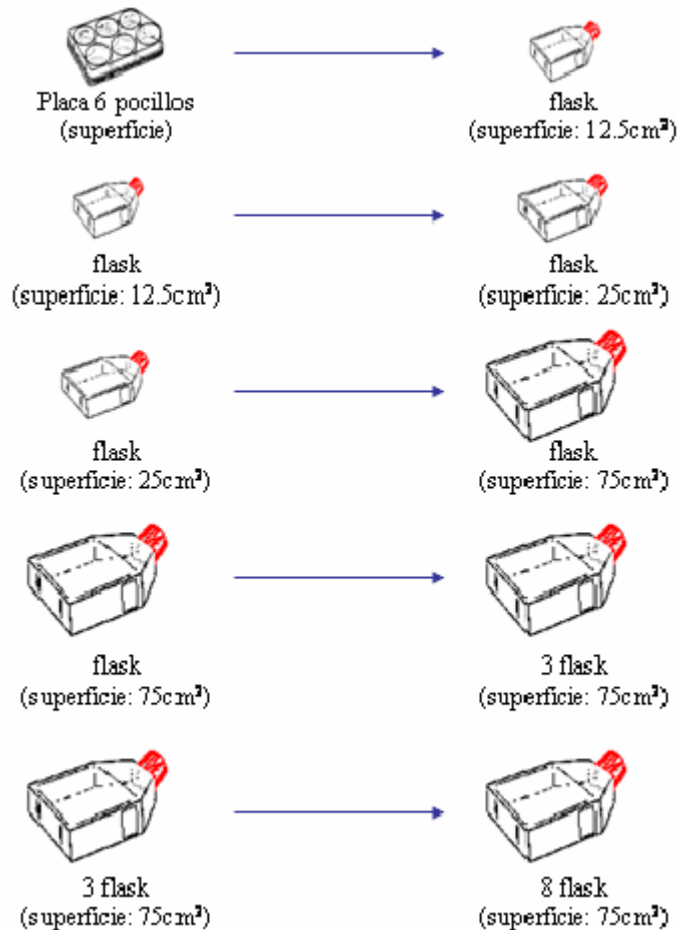


Figura 4: Protocolo de expansión de las células mesenquimales, dependiendo de la concentración celular.

4.2.4.2. Estudio morfológico e inmunofenotípico

La morfología de las células se valoró cada 4-5 días con microscopio invertido de contraste de fases (Olympus CK30).

Las MSC se caracterizaron de acuerdo con el panel de anticuerpos monoclonales recomendado por la ISCT ³⁶, a los que se añadieron otros marcadores de interés para el estudio. Así, los anticuerpos monoclonales empleados fueron: anti-CD34-APC, -CD19-APC, -CD45-PerCPCy5.5, -HLA-DR-PerCPCyC5.5, -CD14-

FITC, -CD56-PE, -CD62L-PE, -CD49A-PE, -CD117-PE (Becton-Dickinson Biosciences, San José, CA, USA), anti-CD90-FITC, -CD73-PE, -CD166-PE, -CD106-PE, -CD104-PE, -CD49B-FITC (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA, USA), anti-CD54-FITC (Serotec), anti-CD133-PE (Miltenyi Biotec), anti-CD105-FITC (ImmunoStep, Salamanca, Spain).

Previo al marcaje, las MSC se tripsinizaron, se centrifugaron y lavaron con PBS (BD FACSCFlow, BD Biosciences). Las MSC se resuspendieron en 100µl de PBS para proceder a su estudio mediante técnica de inmunofluorescencia directa con los anticuerpos monoclonales arriba indicados en combinaciones de cuatro colores (FITC/PE/PerCPCy5.5/APC). Tras 15 minutos de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, las células se lavaron durante 5 minutos a 2000 rpm con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo libre y, tras la eliminación del sobrenadante, se resuspendieron en 0,5ml de PBS para proceder a su adquisición en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) mediante el programa CellQuest (Becton Dickinson Biosciences). Se adquirieron un total de 50.000 células totales para proceder a su posterior análisis con el programa Paint-A-Gate (Becton Dickinson Biosciences)⁸⁹.

Debido a la autofluorescencia basal de la MSC se incluyó en cada caso el control isotópico correspondiente. Para comparar el nivel de expresión de cada antígeno, el canal medio de fluorescencia se valoró según el canal medio del control isotópico en esa fluorescencia.

4.2.4.3. Estudios de diferenciación

Para completar los requerimientos de la ISCT se indujo la diferenciación de las MSC hacia tejido óseo, adiposo y cartilaginoso.

Para la diferenciación hacia osteoblasto se tripsinizaron las MSC, plantándolas en cámara sobre porta (Chamber slide system, SlideFlask, Nunc, Roskilde, Denmark). Cuando las células alcanzaron confluencia superior al 80%, el medio de cultivo convencional se cambió por medio de diferenciación. El medio de diferenciación para osteoblasto estaba compuesto por DMEM, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina y 10mM of β -glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich Inc, USA). Se mantuvo el cultivo en estufa a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad, cambiando el medio cada 3-4 días hasta el día 14 en que se realizó la valoración final mediante inmunohistoquímica tiñendo las células con fosfatasa alcalina por un método comercial (Super-SensitiveTM/HC Detection Systems, BioGenex, The Netherlands) que utiliza DAB (3,3-diaminobenzidina) como cromógeno colorimétrico ⁸⁴.

Para la diferenciación hacia adipocito, se tripsinizaron las células y se plantaron también en cámara sobre porta. De igual modo, al confluir las células se cambió el medio convencional por medio de diferenciación (medio de cultivo a largo plazo) compuesto por “Iscove’s modified Dulbecco’s Médium” (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 10% de suero de caballo, 1% de penicilina-estreptomicina e insulina (Sigma-Aldrich Co) a una concentración final de 100ng/ml. Las células se incubaron y los cambios de medio se realizaron de modo similar al realizado en la diferenciación a osteoblasto. A los 14 días se realizó la tinción con Oil-red-O (Merk KGaA) para la valoración final ⁸⁴.

Para realizar la diferenciación a condrocito, tras tripsinizar las MSC se separaron 1×10^6 células, se centrifugaron 10 minutos a 1200 rpm en tubos cónicos de polipropileno. El botón celular se incubó con 0,5ml del medio comercial de diferenciación (ChondroDiff, Miltenyi). Este medio se cambió cada 4 días hasta el

día 21³³. En ese momento el botón celular se microseccionó y se realizó tinción con Tricrómico de Masson y tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo II.

El análisis de las tinciones con fosfatasa alcalina, Oil-red-O y tricrómico de Masson se realizó en el microscopio óptico Olympus BX41 y la tinción inmunohistoquímica para colágeno tipo II con el microscopio de fluorescencia Leica DMI-6000-B (Wetzlar-Germany).

4.2.4.4. Ciclo celular

Para estudiar el porcentaje de MSC que se encontraba en las distintas fases del ciclo celular, se analizó el contenido de DNA por citometría. Para ello, las MSC tripsinizadas primero se lavaron con PBS, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente con ribonucleasa (40U/ml) (Sigma Diagnostics Inc) durante 10 minutos y a continuación con yoduro de propidio 1µg/ml (Sigma Diagnostics) durante 15 minutos más. La adquisición de las células se realizó en el citómetro FACSCalibur, analizando la fluorescencia del yoduro de propidio con el programa Paint-A-Gate³².

4.2.4.5. Apoptosis

Para determinar el porcentaje de células que se encontraban en apoptosis en el cultivo, se realizó el estudio marcando las células con el kit comercial AnexinaV-PE y 7-ActinomicinaD-PerCPCy5.5 (BD Pharmingen, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) siguiéndolas recomendaciones del fabricante. La adquisición y el análisis se realizaron nuevamente en el citómetro FACSCalibur y Paint-A-Gate respectivamente⁹⁰.

4.2.4.6. Estudio de las MSC mediante FISH con sondas comerciales

Para realizar FISH en interfase en MSC cultivadas se retiró el sobrenadante del frasco de cultivo. Se lavó con PBS. Se preparó el choque osmótico con la solución siguiente: 3,0g KCl, 4,8g HEPES, 0,2g EGTA todo ello diluido en 1L de agua destilada con pH 7,4. Se añadió esta solución a los frascos de cultivo y se incubó durante 1h en estufa a 37°C. Posteriormente se fijaron las células con metanol/acético (3/1), se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm y se depositaron en un porta pretratado mediante cito-centrifugación de 3 minutos a 500 rpm.

Las MSC de pacientes con delección 5q en sus células hematopoyéticas, fueron hibridadas con sonda para ERG1 (5q31) en combinación con una sonda control para D5S23 (5p15.2) y las MSC correspondientes a pacientes con trisomía 8 en sus células hematopoyéticas fueron hibridadas con CEP8, según protocolo Vysis (Vysis, Downers Grove, IL) ⁹¹.

Las células fueron observadas con el microscopio de fluorescencia Leica DMI-6000-B (Wetzlar-Germany) con los filtros correspondientes a la sonda utilizada.

4.2.4.7. CGH arrays de las MSC cultivadas

El análisis de ganancias y pérdidas de DNA se realizó mediante CGH arrays.

Preparación de los arrays

Los portas conteniendo 3032 BACs se prepararon en el Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca. Los BACs y PACs

necesarios para preparar los portas son distribuidos por el Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, United Kingdom) y contienen la totalidad del genoma humano separado en fragmentos, o clones, de aproximadamente 1 megabase. Incluye también un conjunto de secuencias subteloméricas de ambos brazos de cada cromosoma y varias sondas extra seleccionadas por su implicación en carcinogénesis. El contenido de cada clon se encuentra disponible en la web “Cytoview” del Sanger Institute (Ensemb, <http://www.ensembl.org/>). Para aislar los clones del cultivo de bacterias, se trataron con antibiótico y se extrajo el DNA con el protocolo estándar del Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK). Con 10 ng del DNA extraído de los BACs y los PACs se realiza una PCR para amplificar el clon (DOP-PC) ^{92;93}. Los productos de PCR se precipitaron con etanol y se disolvieron en agua destilada. Sobre cada porta (*Ultragaps Coated Slides*, Corning) se depositó por triplicado cada clon, para ello se utilizó el robot *Microgrid II* (Biorobotics), utilizando dimetilsulfóxido como fijador ^{92;93}.

Aislamiento del DNA, marcaje e hibridación

Se extrajo el DNA de los cultivos de MSC, utilizando el método de tiocinato-fenol-cloroformo ⁹⁴. Para marcar se empleó 1µg de DNA genómico sin amplificar. Tanto el DNA test (DNA de los cultivos de MSC) como el DNA de referencia se digirieron por separado con la enzima de restricción DpnII (New England Biolabs, Beverly, MA). Para la hibridación, el DNA digerido se marcó utilizando cebadores consenso (Bioprimer labelling kit, Invitrogen) con los marcadores fluorescentes Cy3 (colorante fluorescente de Cyanina-3 color verde DNA control) y Cy5 (colorante fluorescente de Cyanina-5 color rojo DNA problema) (Amersham Biosciences). La incorporación del nucleótido marcado se cuantificó empleando el espectrofotómetro

Nanodrop. Se mezclaron equitativamente el DNA control marcado y el DNA problema marcado. Se precipitaron en presencia de Cot-1 (Roche, Indianápolis, IN) con etanol, se lavaron y resuspendieron en solución para la hibridación (50% formamida, 10% dextran-sulfato, 2X citrato salino estándar, 10mM Tris pH 7.6, 2,7% de sodio dodecyl sulfato y 10 µg/ µl de tRNA de levaduras). La mezcla de los DNA se hibridó sobre los portas en la estación TECAN HS4800 Pro, donde también se realizaron los lavados post-hibridación, siguiendo el protocolo del fabricante. Las imágenes y las intensidades de señal se adquirieron utilizando el láser escáner dual GenePix4000B (Axon Instruments, Burlingame, CA) combinado con el software de imágenes GenePixPro4.0 (Axon Instruments)⁹⁵. Fig. 5

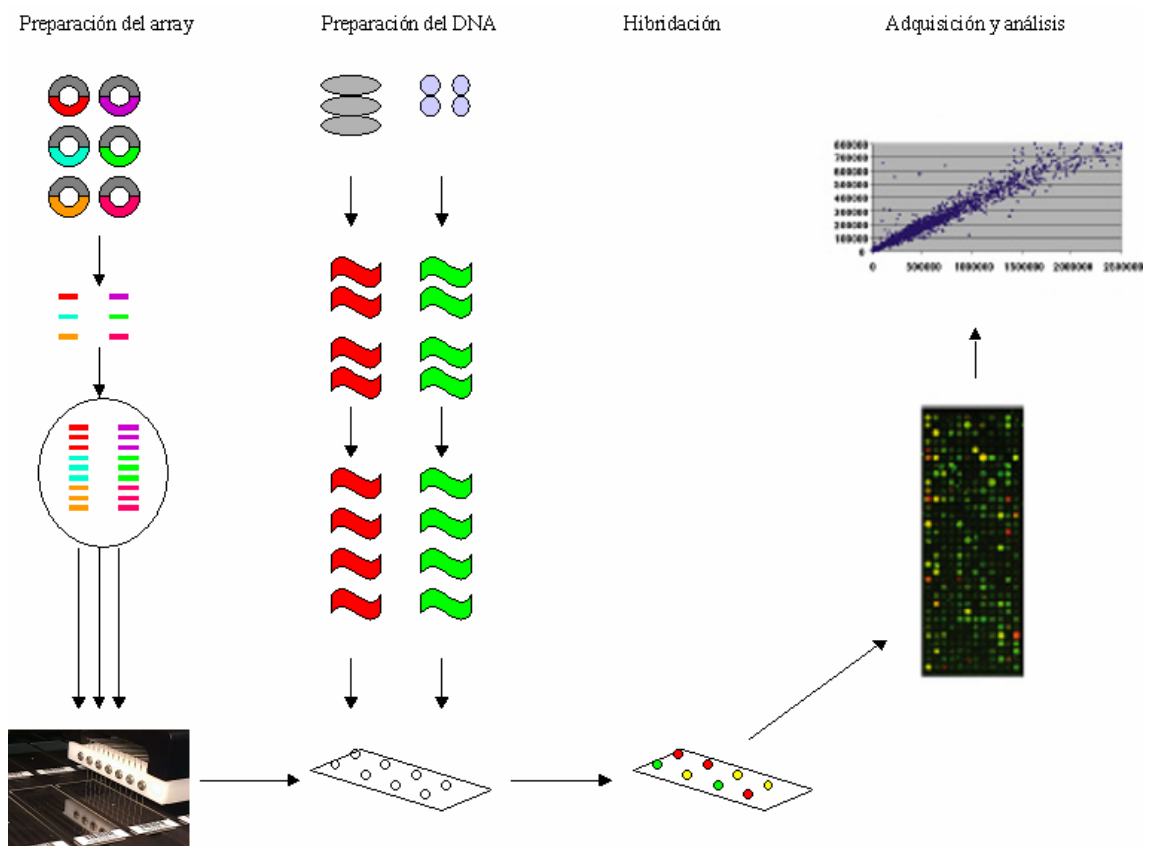


Figura 5. Esquema del método de realización de CGH arrays.

Análisis de datos

1) Análisis de imágenes y procesamiento de datos

Las intensidades de cada punto de hibridación se analizaron también con el software GenePix Pro 4.1 (Axon Instruments, Wetsbur Bv, Leuden, The Netherland). Se calculó la media de cada intensidad y la intensidad basal. Para cada punto se determinó la intensidad definitiva restando a la intensidad medida la correspondiente a la intensidad basal. En el análisis sólo se incluyeron los puntos con una intensidad real tres veces superior a la intensidad basal. Para normalizar los datos también se tuvo en cuenta la mediana de todos los puntos. Para cada punto se calculó el valor del log₂ de la media de los ratios normalizados. Además, los ratios de fluorescencia se normalizaron para cada array empleando el método “print-tip loes” y la intensidad basal se sustrajo empleando el “Diagnosis and Normalization Array Data tool”⁹⁶. El nivel de corte se determinó para cada experimento individualizado después de realizar la media de los ratios de las hibridaciones en los 2 colores. Así se calcularon la media y la desviación estándar para tener en cuenta los casos con ganancias o pérdidas superiores al punto de corte más dos veces la desviación estándar. Los clones que presentaban posibles cambios se consultaron en las bases “Database of Genomics Variants” (<http://projects.tcag.ca/variation/>) y “Ensembl” (DECIPHER: <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>).

2) Análisis no supervisado

El ratio relativo de cada BAC se transformó en una puntuación de 1 (ganancia/amplificación), 0 (sin cambios) ó -1 (pérdidas) basado en el punto de corte más/menos 2 desviaciones estándar descrito previamente y analizado con el software

Cluster y Tree View ⁹⁷ que se basa en la comparación de medias con la correlación de Pearson.

3) Análisis supervisado

El análisis SAM (análisis de significación de microarrays) se empleó para identificar los BACs que separaban diferentes subgrupos de MSC (<http://www-stat.stanford.edu/tibs/SAM>) ⁹⁸. Los BACs con una desviación de cero se eliminaron del análisis.

Los datos de los CGH arrays del presente trabajo se han depositado en la base de datos “Gene Expression Omnibus”. El número de acceso es GSE10822.

4.2.4.8. Aislamiento de MSC no expandidas

El aislamiento de las MSC directamente de la MO sin necesidad de expansión, se realizó empleando el citómetro de flujo con separador celular FACS Aria (Becton Dickinson Biosciences-BDB, San Jose, CA) equipado con el software FACSDiva (BDB). Antes de proceder a la separación, se realizó la lisis de los hematíes de la MO para seguir con el marcaje con anticuerpos monoclonales en la combinación de cuatro colores: anti-CD45-FITC (Miltenyi Biotec) / anti-CD73-PE (BD Biosciences Pharmingen, San José, CA, USA) / anti-CD34-PeCy5 (Immunotech Coulter Company, Marseille, France) / anti-CD271-APC (Miltenyi Biotec) ⁹⁹. La población seleccionada se caracterizaba por ser negativa tanto para CD45 como para CD34 y presentar una positividad fuerte para CD73 y CD271 ³⁷. Debido a la baja proporción de células con las características fenotípicas buscadas, la adquisición en el citómetro-separador se realizó en 2 pasos consecutivos para

incrementar así la sensibilidad del análisis. Primero se adquirieron un total de 5×10^4 eventos correspondientes al total de las células nucleadas presentes en la muestra. En un segundo paso, se realizó la adquisición en el “gate” situado en la región $CD73^+/CD271^+$ en la que se localizan las MSC. Al finalizar la separación se evaluó la pureza de la población seleccionada, para ello se adquirieron 3×10^3 células con el citómetro de flujo (FACSAria)⁹⁹.

4.2.4.9. CGH arrays de las MSC seleccionadas en el separador celular

Después de la separación celular, se extrajo el DNA mediante, primero, digestión con proteinasa K seguida de extracción con el método de tiocianato-fenol-cloroformo y resuspensión en buffer TE pH 7,5. La concentración de las muestras se midió mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-100 spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Roeland, DE).

Se utilizó el kit de amplificación de DNA GenomiPhi siguiendo las instrucciones del fabricante: se mezcló 1 μ l de muestra con 9 μ l del buffer. La mezcla se desnaturalizó a 95°C durante 3 minutos seguido de un enfriamiento inmediato a 4°C durante un mínimo de 10 minutos. Se añadió la mezcla de 9 μ l del buffer de reacción y 1 μ l del enzima y se incubó a 30°C durante 16 horas. El enzima se inactivó calentando la muestra durante 10 minutos a 65°C y enfriándola a continuación a 4°C. El botón celular obtenido tras la amplificación se precipitó en sodioacetato/EDTA. Puesto que los controles negativos de la amplificación (pf Phi29) también mostraron un rastro en el gel de agarosa, se comprobó si el producto amplificado contenía DNA realizando una PCR utilizando cebadores específicos.

Los CGH arrays se realizaron siguiendo el protocolo que se ha descrito para las MSC expandidas, con modificaciones menores. Para optimizar resultados, tanto

el DNA de referencia como el DNA problema se amplificaron empleando la misma cantidad inicial de DNA.

4.2.4.10. Estudio por FISH con sondas procedentes de BAC de las MSC

Para confirmar los estudios de CGH arrays, se realizó análisis por FISH empleando la sonda de los BACs RPCI11-440G22 (1q31.12), y RP11-132L11 (7p13). Las sondas del DNA se marcaron con biotina-11-dUTP o digoxigenina11-dUTP mediante reacción “standard nick translation”. La hibridación se realizó según protocolos ya descritos ¹⁰⁰. De modo resumido: las sondas se desnaturalizaron e incubaron con DNA Cot-1 y se hibridaron durante 16 horas sobre portas pretratados con los cromosomas problema desnaturalizados. Después del lavado, las sondas marcadas con biotina se detectaron con 2 capas de avidina-FITC.

Las células fueron observadas con el microscopio de fluorescencia Leica DMI-6000-B (Wetzlar-Germany).

4.2.4.11. Estudios de PCR cuantitativa en MSC

Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de ARN se realizó a partir de cultivos de MSC en segundo o tercer pase, utilizando el método de tiocianato-fenol-cloroformo ⁹⁴. La transcripción inversa fue realizada utilizando el kit comercial High Capacity cDNA “Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA) a partir de 1 µg de RNA total. Se incubó a 37°C durante 2 horas, seguido de 5 segundos a 85°C y 30 minutos a 15°C. El cDNA fue almacenado a -20°C y las alícuotas sobrantes de ARN a -80°C para posteriores análisis.

RQ-PCR para el análisis de expresión génica

La expresión de los genes descritos en la tabla 5 fue realizada en el equipo “Step One Plus Real-Time PCR System” utilizando los ensayos comerciales TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). El número de identificación de cada ensayo se indica en la tabla 5. En resumen, 2 µL (40 ng) de cDNA se agregaron a una mezcla conteniendo 5 µL de TaqMan® Fast Master Mix, 0.5 µL del ensayo de expresión comercial en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de termociclado fueron: 50 ciclos de (95°C-1seg; 60°C-20seg). El ciclo en el cual la reacción superaba un umbral determinado (Ct) sirvió para cuantificar la expresión del gen en estudio respecto a un gen control (*ABL1*), por medio de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta Ct = Ct_{gen\ en\ estudio} - Ct_{ABL1}$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Paciente} - \Delta Ct_{MO\ sana\ (mediana)}$ ^{101;102}.

Tabla 5: Descripción de los genes estudiados por RQ-PCR

Número de catálogo	Descripción
Hs00173564_m1	<i>FGF4</i>
Hs00992441_m1	<i>IL32</i>
Hs99999043_m1	<i>TNFα</i>
Hs00964430_m1	<i>PDGFα</i>
Hs03986124_s1	<i>GDF15</i>
Hs01562405_m1	<i>EIF2AK1</i>
Hs99999002_m1	<i>ABL1</i>

4.2.4.12. Estudios por Microarrays de expresión de MSC de pacientes con SMD

Las muestras de MSC fueron hibridadas con el GeneChip Human Gene 1.0 ST (Affymetrix ®) que contiene 764885 sondas correspondientes a 28869 genes. Para ello se utilizó el siguiente protocolo.

Aislamiento del RNA, marcaje e hibridación

El RNA total se extrajo empleando el método de fenol-tiazol-cloroformo⁹⁴, y su integridad se confirmó con el Bioanalizador 2100 mediante el Nano kit RNA6000 (Agilent Technologies, Inc).

Se partió de 100 ng de RNA total para realizar el proceso. Las muestras se retrotranscribieron, amplificaron, fragmentaron y marcaron con los kits “WT cDNA síntesis and amplificaton kit” y “GeneChip WT sense target labeling and control reagent” de Affymetrix siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Las muestras marcadas se hibridaron sobre los GeneChip siguiendo también las instrucciones del fabricante⁸⁶, en un horno de hibridación de Affymetrix, modelo 640.

Los arrays se procesaron en una estación fluidica de Affymetrix, modelo 450. Después de la hibridación, se realizó la tinción con estreptavidina-ficoeritrina y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados. Tras las tinciones y lavados, los chips se escanearon con el GeneChip Scanner 7G Plus (Affymetrix).

Análisis de datos

1) Procesamiento de datos

Tras confirmar que los chips se habían hibridado correctamente, pasando todos los controles de calidad en puntos críticos, se realizó la normalización de los datos obtenidos con el programa RMA (Robust Multichip Average).

Los niveles de expresión se transcribieron en escala lineal y se calcularon las diferencias de dicha expresión (Fold Change) de los valores medios de todos los casos, entre los diferentes grupos. Se ha considerado significativa una variación superior a 1.5.

2) Análisis no supervisado y representación del cluster jerárquico

Se realizaron utilizando el criterio de Ward ¹⁰³ y el valor medio como función de ordenamiento. Para realizar el agrupamiento jerárquico se empleó el programa SPOTFIRE 9.1 (TIBCO Software Inc) ⁸⁶.

3) Análisis supervisado

Para la identificación de los genes y el análisis supervisado se emplearon el programa SAM y también el SPOTFIRE 9.1.

4) Análisis de vías de señalización

Se empleó el programa Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems Inc.) ¹⁰⁴, analizando las vías que diferenciaban las MSC de los SMD tipo 5q- de las MSC de otros subtipos de SMD.

4.2.5. ESTUDIOS EN TRANSWELL

4.2.5.1 Preparación de las muestras

Para determinar el efecto “humoral”, entendido como aquel independiente del contacto directo célula-célula, de las células hematopoyéticas de SMD sobre las MSC sanas, se realizó el estudio sobre placas de transwell ^{105;106} de 44cm² (Corning, NY, USA). Estas placas contienen en su interior una membrana con un poro de 3.0µm, que impide el contacto celular directo ¹⁰⁷.



Figura 6: Placa transwell, se observa la membrana que divide el interior de la placa.

Se plantaron en el fondo del transwell las MSC de un donante sano, a una concentración de 3×10^3 células/cm². Cuando alcanzaron una confluencia en torno al 80-90% se añadieron, sobre la membrana, las células mononucleadas de la médula ósea de los pacientes con SMD, a una concentración de 6×10^3 células/cm². Se cambió el medio de cultivo estándar por medio de cultivo a largo plazo ⁸, para el correcto mantenimiento de las células hematopoyéticas y para no favorecer su desaparición con el medio estándar de mesenquimales. Se mantuvieron durante 96 horas, momento en que se tripsinizaron las MSC para su análisis. Como control se emplearon MSC también de donante sano sobre las que se plantaron células mononucleadas de MO de otro donante sano. Fig. 7.

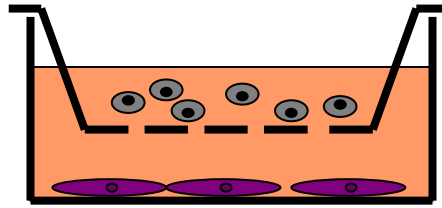


Figura 7: Esquema del estudio en transwell. Inicialmente se plantan las CSM de control (en morado). Cuando alcanzan confluencia se añaden las células hematopoyéticas (en gris).

4.2.5.2. Estudio del perfil de expresión génica mediante “microarrays”.

El RNA de las muestras de MSC que habían sido co-cultivadas se hibridó con el GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetix®) que contiene aproximadamente 55000 sondas que identifican 38500 genes. Para ello se utilizó el siguiente protocolo.

Aislamiento del RNA, marcaje e hibridación de los microarrays.

El RNA total de las MSC se aisló mediante el reactivo Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) y se purificó mediante las columnas “Rneasy® Mini” (Quiagen, P/N 74104, Valencia, CA, USA) ¹⁰⁴.

Se midió la concentración y se confirmó la integridad del RNA con el “RNA 6000 Nano LabChip” utilizando el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

A partir de 1µg de RNA total se sintetizó, en primer lugar, cDNA de doble cadena y posteriormente cRNA marcado con biotina mediante el “GeneChip one cycle cDNA Synthesis kit” y el “GeneChip IVT labeling kit” respectivamente (Affymetix Inc., Santa Clara, CA, USA). El cRNA marcado se fragmentó y se hibridó (15µg de cada muestra) sobre el GeneChip siguiendo los protocolos de Affymetrix.

Después de la hibridación, se realizó la tinción con estreptavidina-ficoeritrina

y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados. Tras las tinciones y lavados, los chips se escanearon con el GeneChip Scanner (Affymetrix) ^{108;109}.

Análisis de datos

1) Procesamiento de datos

Tras revisar que los chips cumplen criterios de hibridación de buena calidad (*Scaling factor* (SF) menor de tres veces, es decir, el SF más elevado no supera en 3 veces al más bajo; proporción entre la señal del extremo 3' de GAPDH y el extremo 5' inferior a 2,5 y número de sondas presentes en el chip superior al 40%), se realizó la normalización de los datos. Para ello se empleó el algoritmo RMA (Robust Multichip Average) que se encuentra integrado en el programa RMAExpress que se puede obtener de manera gratuita en la dirección <http://rmaexpress.bmbolstad.com>.

El siguiente paso del procesamiento de datos fue el filtrado. Se eliminaron todas aquellas sondas de baja intensidad (sondas para las que el 100% de las muestras tuvieron una intensidad menor de 100). Se eliminaron también las sondas que apenas presentaron variación entre los arrays, es decir, que la diferencia entre la sonda que presenta mayor intensidad y la que presenta menor intensidad es muy pequeña.

Finalmente los niveles de expresión se transformaron en logaritmos en base 2.

2) Análisis no supervisado

El algoritmo usado en los análisis no supervisados fue el agrupamiento jerárquico (“Hierarchical clustering”) que se aplicó con el programa “Cluster & TreeView”, programa de acceso libre (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). El resultado de este análisis se ha representado en forma de dendogramas.

3) Análisis supervisado

Para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas se usó el algoritmo SAM tanto de datos no apareados como de datos apareados. Este algoritmo se ha usado desde el programa de acceso libre de la dirección <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>. Sólo se consideraron significativas aquellas sondas seleccionadas con un FDR (“false discovery rate”) inferior a 2%, es decir, con la condición de que la proporción de falsos positivos entre todas las sondas consideradas significativas fuera inferior al 2% ^{104;108;110}.

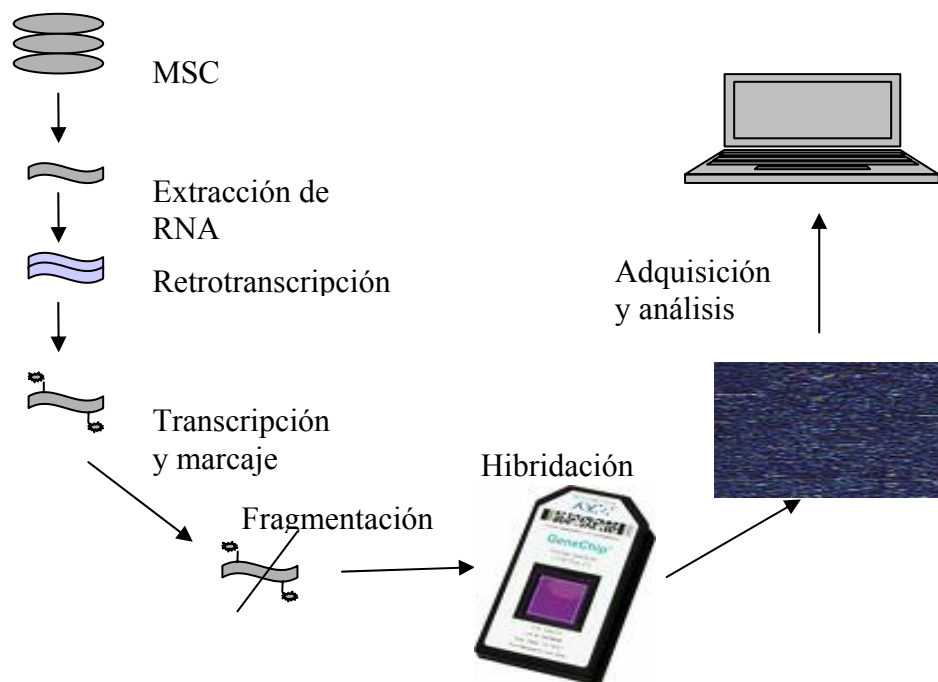


Figura 8: Esquema de la realización de los microarrays de expresión

4.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó el programa estadístico SPSS 15.0 (Chicago, IL). Las medidas de tendencia central se expresaron como mediana y la dispersión alrededor de la mediana se expresó como el rango. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student, salvo para el estudio de PCR cuantitativa en el que se empleó el test no paramétrico U de Mann–Whitney. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

5.1. ESTUDIOS DE EXPANSIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MSC DE PACIENTES CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

Para los estudios de expansión, citometría y diferenciación se emplearon muestras de 36 casos descritos en la tabla 6.

Tabla 6: Características clínicas y citogenéticas de los pacientes incluidos en los estudios de caracterización

Caso	Diagnóstico OMS	Edad	Sexo	Citogenética Convencional	Marcadores FISH
1	AR	60	F	No mitosis	5q- (4%)
2	AR	72	M	46, XY [20]	No aplicable
3	AR	64	F	46, XX [4] 46,XX,t(6;11)(q22; q14) [16]	No realizada
4	ARSA	40	F	46, XX [20]	No realizada
5	ARSA	81	M	46,XY [4] 45,X,-Y [16]	No realizada
6	ARSA	68	F	46, XX [20]	No aplicable
7	ARSA	68	F	46, XX [20]	No aplicable
8	ARSA	72	M	46,XY [3] 46,XY,-Y,+8 [17]	+ 8 (51%)
9	ARSA	77	M	No mitosis	7q- (8%)
10	CRDM-SA	80	M	No mitosis	No aplicable
11	AREB-1	55	F	46, XX [10] 46, XX, del (5)(q13q31)[8]	5q- (56%)
12	AREB -1	87	F	No mitosis	5q- (48%)
13	AREB -1	77	M	46, XY [20]	No aplicable
14	AREB -1	62	M	46, XY [20]	No aplicable
15	AREB -2	55	M	46, XY [21]	No aplicable
16	AREB -2	72	M	46, XY [20]	No aplicable
17	AREB -2	89	F	46, XX [20]	No realizada
18	AREB -2	79	M	46,XY [11] 47,XY,+8 [6] 46,XY,del(9)(q31) [2]	+ 8 (13%)
19	AREB -2	40	F	46,XX [20]	No aplicable

20	AREB -2	70	M	46,XY [12] 47,XY,+8 [8]	+ 8 (55%)
21	Síndrome 5q-	52	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [17]	5q- (41%)
22	Síndrome 5q-	79	F	5q 46,XX [6] 46,XX,del(5)(q13q31) [14]	5q- (46%)
23	Síndrome 5q-	34	F	No mitosis	5q- (20%)
24	Síndrome 5q-	62	F	46, XX [3] 46, XX, del (5) (q14q34) [16] 53, XX, +1, +2, +11, +11, +14, +21, +22 [6]	5q- (27%)
25	Síndrome 5q-	62	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [15]	-5q- (66%)
26	Síndrome 5q-	63	F	46,XX [6] 46,XX,del(5)(q13q31) [14]	5q- (49%)
27	Síndrome 5q-	75	M	No mitosis	5q- (40%)
28	SMDu	34	F	No mitosis	No aplicable
29	SMDu	69	M	46,XY [12] 47,XY,+8 [8]	+ 8 (55%)
30	SMDu	79	M	46, XY [20]	No realizada
31	SMDu	62	F	46,XX [20]	No aplicable
32	SMDu	83	M	No mitosis	No aplicable
33	ARSA	71	M	46,XY [6] 46,XY,+8 [14]	No realizada
34	Síndrome 5q-	81	F	No mitosis	5q- (48%)
35	Síndrome 5q-	48	M	No mitosis	5q- (37%)
36	Síndrome 5q-	73	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [15]	No realizada

Sexo: F-femenino, M-masculino. No aplicable- FISH normal para 5q, 7q y 8.

5.1.1 Cultivo de MSC

Se obtuvieron MSC de todos los donantes sanos, realizándose una mediana de 5 pases (rango 2-7). El tiempo hasta alcanzar confluencia fue de 15,5 días (11.6-30).

Cuando se expandieron las MSC procedentes de pacientes con SMD, el tiempo necesario hasta alcanzar confluencia fue mayor, 23,5 días (12-90), ($p < 0,05$) (Fig. 9) y las células únicamente fueron capaces de mantenerse en cultivo hasta el tercer pase (0-5). Es más, en seis casos de SMD, las células no llegaron a alcanzar confluencia en el cultivo inicial por lo que no se pudieron expandir (Casos 11, 20, 26, 27, 29 y 30).

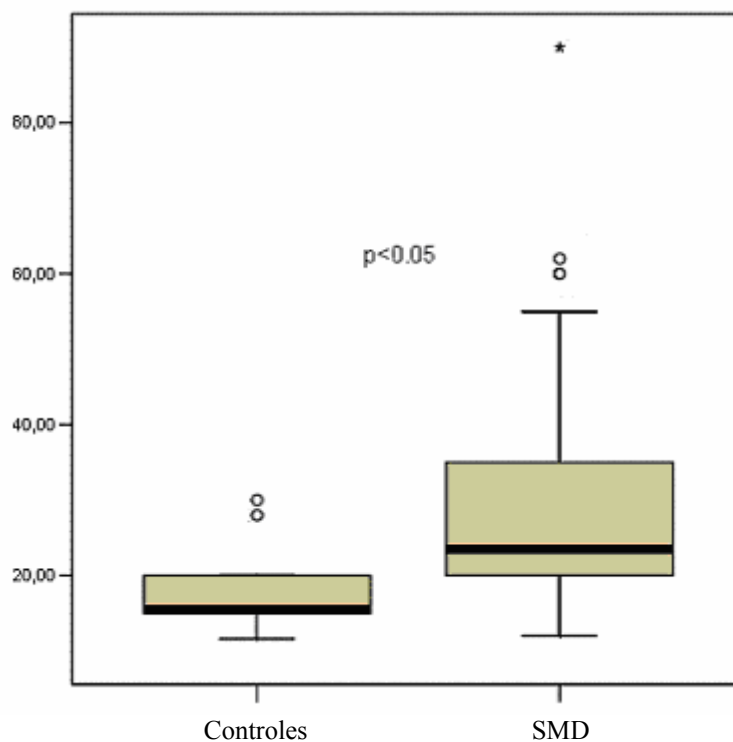


Figura 9: Diferencias en el tiempo hasta la confluencia. Mediana de tiempo (días) para alcanzar confluencia entre las MSC de los controles y de los SMD.

La morfología de las CSM de los donantes y de los pacientes era claramente diferente. Así, como se indica en la fig. 10, las células de los donantes tenían el característico aspecto fibroblástico, mientras que las MSC de los SMD parecían más “poligonales y granulares”.

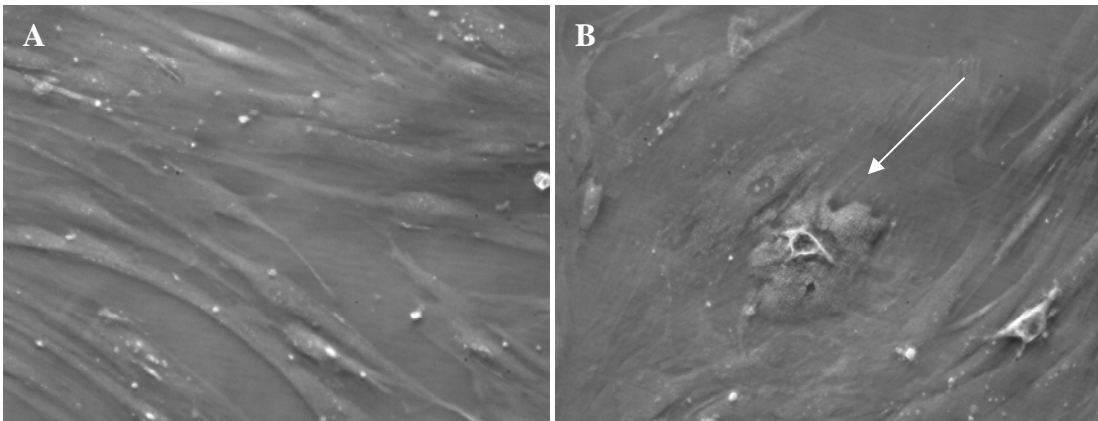


Figura 10: Diferencias morfológicas bajo el microscopio de contraste de fase con un aumento de 10x. **A:** aspecto de las MSC de controles **B:** aspecto de las MSC de SMD. En la capa de MSC de SMD se evidencia la presencia de células más poligonales y granulares (flecha).

5.1.2. Análisis fenotípico de las MSC

En todos los casos se alcanzó pureza de las MSC superior al 98.5% . En la fig. 11 se muestra un ejemplo del análisis de la pureza llevado a cabo por citometría de flujo.

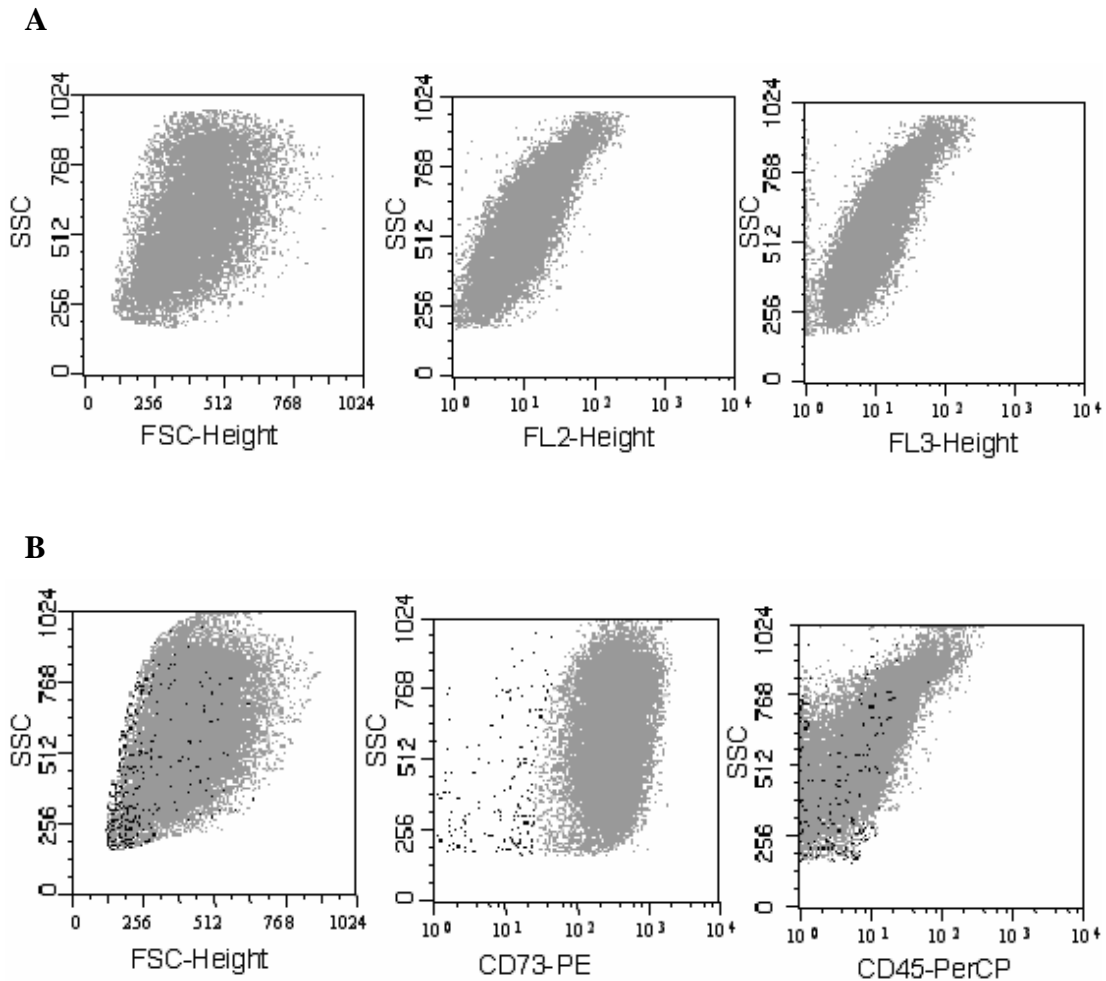


Figura 11: Pureza determinada por citometría de flujo de las MSC. **A:** control isotópico. **B:** las MSC están indicadas en gris, mientras que los eventos contaminantes se encuentran en negro. La pureza de esta muestra es >99%.

En ningún caso las células de los cultivos presentaron contaminación con CH, siendo negativas para los antígenos hematopoyéticos: CD45, CD34, CD117, CD14, CD19, HLA-DR, CD133 y CD62L.

Además, las MSC fueron positivas para los antígenos CD73, CD90, CD166, CD105, CD106, CD54 y presentaron una positividad más débil para CD104, CD49A, CD49B y CD56.

Al comparar la intensidad de fluorescencia de los antígenos de las MSC de los pacientes con SMD y los 15 controles empleados en el estudio de citometría, se observó menor expresión de CD105 y CD104 en los primeros (Fig. 12, $p < 0,05$). La

expresión de CD90 también era menor pero la diferencia no alcanzó significación estadística.

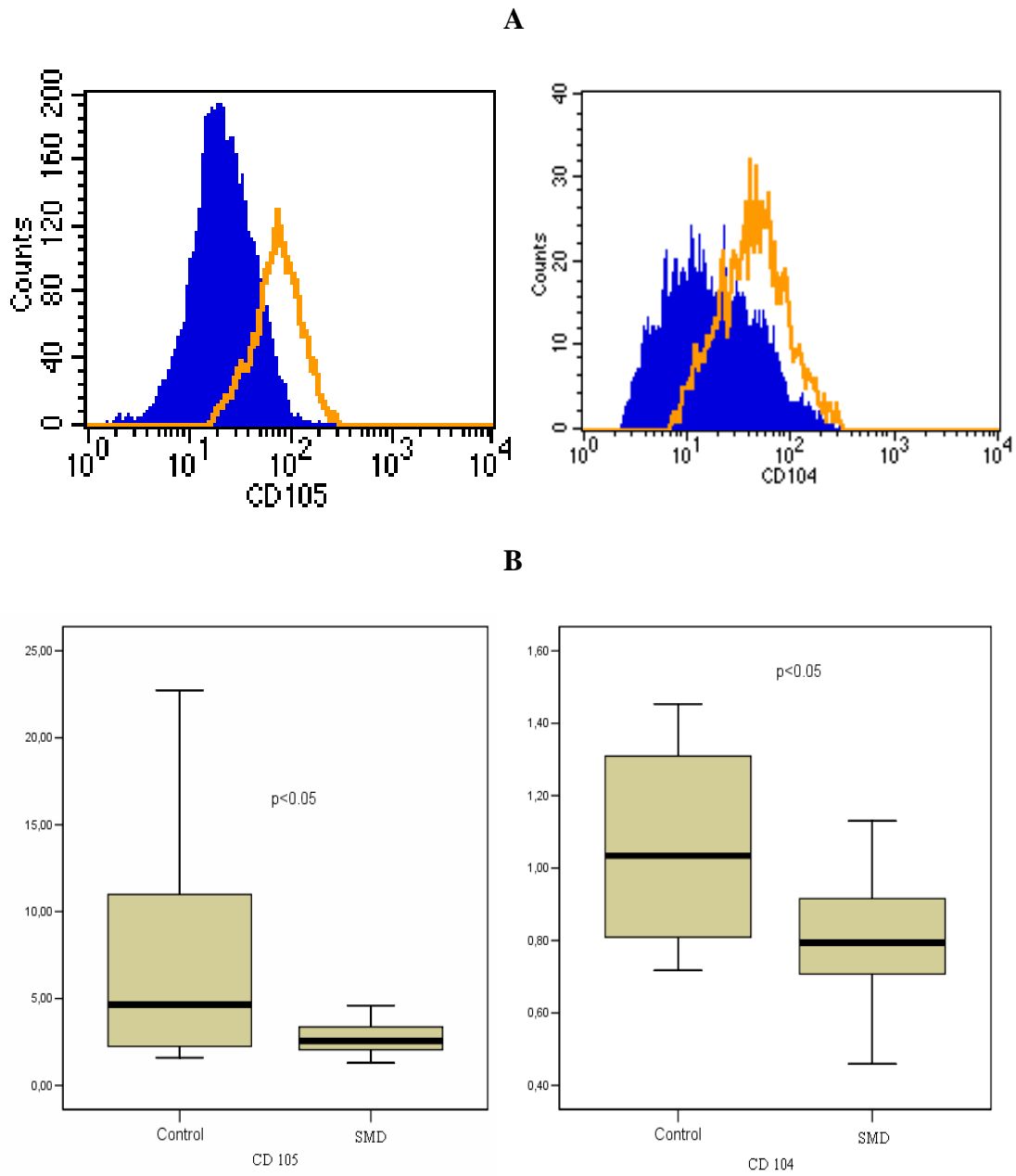


Figura 12: Diferencias en la expresión por citometría de flujo entre las MSC de pacientes y controles. **A:** diferencia en la expresión de CD105 y CD104 entre las MSC del caso 13 (azul) y control (naranja). **B:** diferencias en el canal medio de fluorescencias tanto en CD105 como en CD104 entre los controles y los MDS. Resultados expresados en media \pm desviación estándar del canal medio de fluorescencia.

5.1.3. Diferenciación

Para continuar con la caracterización de las MSC de los SMD se realizó la diferenciación a adipocito, osteoblasto y condrocito recomendada por ISCT³⁶. Los ensayos de diferenciación a adipocito y osteoblasto y condrocito se realizaron en 5 y 3 casos respectivamente.

La diferenciación a osteoblasto y a adipocito se consiguió en todos los casos de SMD con una eficiencia similar a la obtenida en los casos de MSC de controles. (Fig. 13)

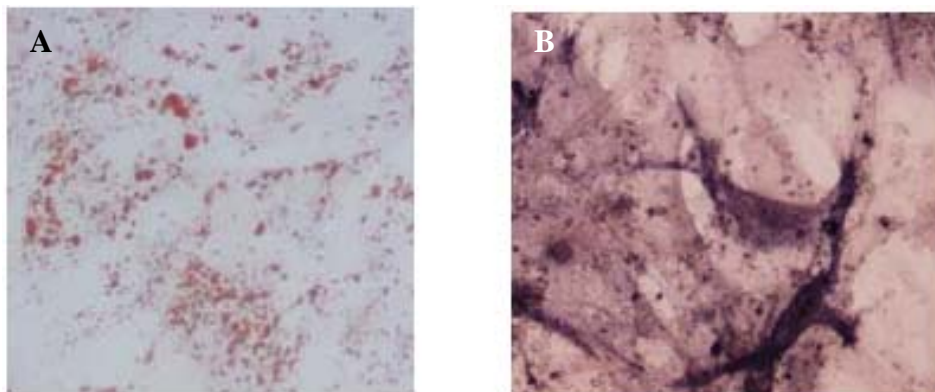


Figura 13: Diferenciación de las MSC de MDS, observadas con un aumento de 10x. **A:** diferenciación a adipocito, teñido con Oil-Red-O. **B:** diferenciación a osteoblasto, teñido con fosfatasa alcalina.

Sin embargo, al analizar la diferenciación hacia condrocito de las MSC de SMD se observó que dicha diferenciación estaba alterada ya que la disposición de las células positivas para colágeno II en los casos de SMD difería de los casos de donantes sanos (Fig. 14).

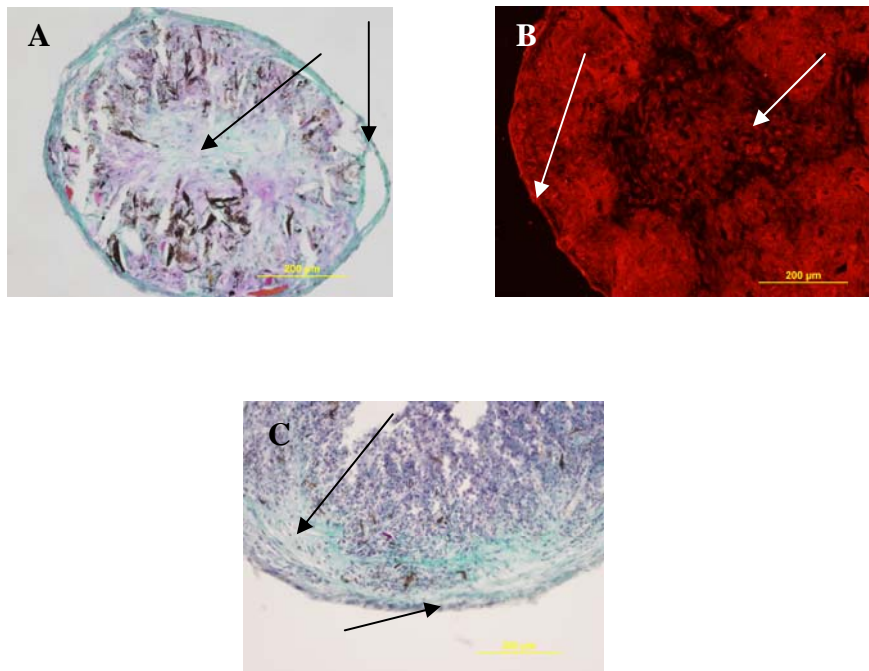


Figura 14: Diferenciación a condrocito de las MSC, observado al microscopio 10x. **A:** MSC de SMD, tinción con tricrómico de Masson y **B:** MSC de SMD, tinción de colágeno tipo II. Las células positivas en las MSC de SMD (flecha) se localizan en la superficie y en el centro del corte. **C:** MSC de control sano, las células positivas se localizan en periferia y superficie.

5.1.4. Ciclo celular y Apoptosis.

El primer análisis, ciclo celular, se realizó en 5 casos y se comparó con el ciclo celular de las MSC de 8 donantes sanos. La mayoría de las MSC de los SMD estaban en fase G0-G1 [mediana 96,54% (95,5-97,6%)] con un porcentaje muy bajo de células en fase S [mediana 0,63% (0,2-0,6%)]. No se observaron diferencias significativas respecto a las MSC de los donantes [fase G0-G1 97,7 (96,2-98,25), fase S 0,45 (0,1-1,5)].

La proporción de las MSC en apoptosis también se analizó en los mismos 5 casos, siendo discretamente más alta en los pacientes (23,3 vs 20,6) pero sin alcanzar significación estadística.

5.2. ANÁLISIS DE CLONALIDAD DE MSC EN PACIENTES CON SMD

Con el fin de comprobar si las MSC pertenecían al clon patológico se analizaron 14 pacientes con SMD. Sus características se muestran en la tabla 7. Para ello se incluyeron en este estudio únicamente los casos en los que la alteración pudiese estudiarse mediante FISH en el análisis de rutina llevado a cabo en el laboratorio de citogenética para el estudio de las CH y así, utilizar las mismas sondas en el estudio de las MSC. Se utilizaron sondas para el análisis de deleciones del brazo largo del cromosoma 5 o trisomías del cromosoma 8.

Tabla 7: Características clínicas y citogenéticas de los pacientes incluidos en el estudio mediante FISH.

Caso	Diagnóstico OMS	Edad	Sexo	Citogenética Convencional Células hematopoyéticas	Marcadores FISH Células hematopoyéticas
37	Síndrome 5q-	62	M	46, XY [5] 46, XY, del(5)(q13q31)[15]	5q- (70%)
38	Síndrome 5q-	61	M	No mitosis	5q- (77%)
39	Síndrome 5q-	65	F	46, XX [12] 46, XX, del(5)(q13q31)[8]	5q- (49%)
40	Síndrome 5q-	70	F	No mitosis	5q- (44%)
41	Síndrome 5q-	72	F	46, XX [15] 46, XX, del(5)(q13q31)[5]	5q- (64%)
42	AREB -1	87	F	46, XX [2] 46, XX, del(5)(q13q31)[18]	5q- (48%)
43	ARERB -2	62	M	47, XY, del(5)(q13q31), +8, ins(13)(q13q22), add(19)(p13) [20]	5q- (62%) +8 (53%)
44	AREB -2	80	M	No mitosis	5q- (30%)
45	AR	54	F	No mitosis	+8 (5%)

46	ARSA	72	M	46, XY [4] 47, XY, +8 [10] 48, XY, +8, +17 [6]	+8 (81%)
47	ARSA	74	M	No mitosis	+8 (60%)
48	AREB -2	79	M	46, XY [11] 46, XY, del(9)(q31) [2] 47, XY, +8 [7]	+8 (13%)
49	AREB -2	76	F	46, XX [7] 46, XX, del(3)(p13p23) [11] 48, XX, +8, +21 [2]	+8 (8%)
50	AREB -2	73	M	46, XY [11] 47, XY, +8[9]	+8 (28%)

El análisis se realizó tras el 2º ó 3º pase y se comprobó la pureza de la población obtenida mediante citometría de flujo, siendo ésta superior al 99% en todos los casos. Se realizó un conteo sobre una mediana de 80 células mesenquimales (rango 40-120).

En las fig. 15 y 16 se muestran dos ejemplos de FISH de dos de los casos estudiados y en la tabla 6 los resultados de todos los pacientes.

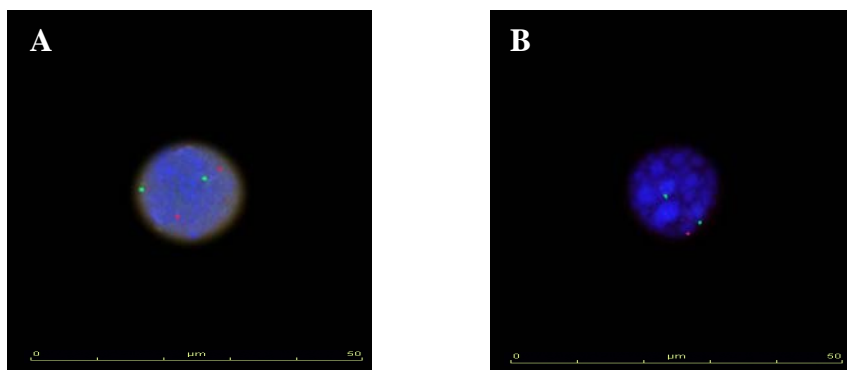


Figura 15: FISH correspondiente al caso 40, observado con el microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión 63x y 1,6 de magnitud. En verde se observa la señal correspondiente a 5p15 y en rojo la señal de 5q31. **A:** se observa una célula normal. **B:** se observa una célula con 5q-.



Figura 16: FISH correspondiente al caso 46, observado con el microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión 63x y 1,6 de magnitud. En rojo se observa la señal correspondiente a la sonda CEP8. **A:** se observa una célula normal. **B:** se observa una célula con trisomía del cromosoma 8.

En la Tabla 8 se encuentra el resumen del porcentaje anormal de células encontradas al realizar la FISH en las MSC.

Tabla 8: Estudio de clonalidad mediante FISH en las MSC y su comparación con células hematopoyéticas.

Caso	Diagnóstico OMS	Marcadores FISH Células hematopoyéticas	Marcadores FISH Células Mesenquimales
37	Síndrome 5q-	5q- (70%)	5q- (4%)
38	Síndrome 5q-	5q- (77%)	5q- (6%)
39	Síndrome 5q-	5q- (49%)	5q- (20%)
40	Síndrome 5q-	5q- (44%)	5q- (17%)
41	Síndrome 5q-	5q- (64%)	5q- (10%)
42	AREB -1	5q- (48%)	5q- (20%)
43	ARERB -2	5q- (62%) +8 (53%)	5q- (4%)
44	AREB -2	5q- (30%)	5q- (0%)
45	AR	+8 (5%)	+8 (21%)
46	ARSA	+8 (81%)	+8 (11%)
47	ARSA	+8 (60%)	+8 (5%)
48	AREB -2	+8 (13%)	+8 (17%)
49	AREB -2	+8 (8%)	+8 (26%)
50	AREB -2	+8 (28%)	+8 (13%)

Como se puede observar, en 9 de los casos el porcentaje de MSC que presentaban la alteración clonal oscilaba entre 11 y 26%. En 4 de los casos el porcentaje de células con la alteración se encontraba próximo al límite de detección de la técnica por lo que no se consideraron valorables (entre 4-6%), y en uno de los casos (nº 44) no se encontró ninguna célula con la alteración clonal.

5.3. ANÁLISIS MEDIANTE CGH ARRAYS

El estudio se realizó en 17 pacientes que se muestran en la tabla 9. En 13 de ellos se llevó a cabo tras la expansión y en otros 4 casos se realizó el estudio en paralelo, tras realizar separación mediante citometría de flujo (“sorting”) de las MSC sin cultivar y posteriormente en las MSC cultivadas tras 2 pases.

Tabla 9: Características clínicas y citogenéticas de los pacientes incluidos en el estudio de CGH arrays

Caso	Diagnóstico OMS	Edad	Sexo	Citogenética Convencional	Marcadores FISH
1	AR	60	F	No mitosis	5q- (4%)
8	ARSA	72	M	46,XY [3] 46,XY,-Y,+8 [17]	+ 8 (51%)
10	CRDM-SA	80	M	No mitosis	No aplicable
12	AREB -1	87	F	No mitosis	5q- (48%)
16	AREB -2	72	M	46, XY [20]	No aplicable
17	AREB -2	89	F	46, XX [20]	No realizada
18	AREB -2	79	M	46,XY [11] 47,XY,+8 [6] 46,XY,del(9)(q31) [2]	+ 8 (13%)
21	Síndrome 5q-	52	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [17]	5q- (41%)
22	Síndrome 5q-	79	F	5q 46,XX [6] 46,XX,del(5)(q13q31) [14]	5q- (46%)
24	Síndrome 5q-	62	F	46, XX [3] 46, XX, del (5) (q14q34) [16] 53, XX, +1, +2, +11, +11, +14, +21, +22 [6]	5q- (27%)
26	Síndrome 5q-	63	F	46,XX [6] 46,XX,del(5)(q13q31) [14]	5q- (49%)
27	Síndrome 5q-	75	M	No mitosis	5q- (40%)
30	SMDu	79	M	46, XY [20]	No realizada
33	ARSA	71	M	46,XY [6] 46,XY,+8 [14]	No realizada

34	Síndrome 5q-	81	F	No mitosis	5q- (48%)
35	Síndrome 5q-	48	M	No mitosis	5q- (37%)
36	Síndrome 5q-	73	M	46,XY [5] 46,XY,del(5)(q13q31) [15]	No realizada

Sexo: F-femenino, M-masculino. No aplicable- FISH normal para 5q, 7q y 8.

Las MSC de todos los casos incluidos en el estudio de CGH arrays mostraron alteraciones genómicas. Las ganancias fueron más frecuentes que las pérdidas. Analizando las alteraciones observadas para descartar la presencia de polimorfismos a ese nivel, observamos que ninguno de los clones que presentaban modificaciones se ha descrito como asociado a variaciones polimórficas excepto el clon RP11-153P4 localizado en 9q34.2.

Para valorar si los cambios estaban presentes en las células hematopoyética o eran alteraciones constitucionales, en 3 casos se realizó estudio de CGH arrays tanto en las MSC expandidas como en células mononucleadas procedentes de sangre periférica; las alteraciones presentes en las MSC no se encontraron en las CH del mismo paciente.

Las regiones mínimas ganadas más frecuentemente (con más de un clon consecutivo ganado) se muestran en la tabla 10, y se localizan en 19p13.3, 11q13.1 y 20q13.33.

Tabla 10: Regiones comunmente ganadas de cambios en el número de copias identificadas en MSC de pacientes con SMD detectadas por CGH arrays.

Clon (inicial-final)	Locus	Frecuencia (%)
RP11-268°21- CTC-482H14	19p13.3	38
RP11-424°11- RP11-147G6	11q13.1	31
RP5-1107C24- RP4-563E14	20q13.33	31
RP11-440G22- RP11-142L4	1q31.2	23
RP11-12A13- RP11-12J13	3q11.2	23
RP11-11N6- RP11-9B6	4q22.1	23
RP11-510K8- RP4-607J2	7p22	23
RP4-560O14- RP11-575G1	7q21.11	23
RP11-478P5- RP11-196E5	17q25.1	23
CTD-3149D2- CTC-251H24	19p13.11	23
CTD-2545M3 -RP11-10I11	19q13.33	23
RP11-113F1- RP11-351D2	21q22.3	23

En la siguiente tabla, tabla 11, se muestran todas las ganancias y pérdidas en las diferentes regiones cromosómicas.

Tabla 11: Ganancias y pérdidas en las diferentes regiones cromosómicas

	Clon	Locus	Cluster I (n=7)		Cluster II (n=6)		Total (n=13)	
			N	%	N	%	N	%
Ganacias	RP11-440G22	1q31.2	3	43			3	23
	RP11-142L4	1q31.2	3	43			3	23
	RP11-21L17	2q23.2	3	43			3	23
	RP11-266L10	2q24.1	3	43			3	23
	RP11-12A13	3q11.2	4	57	2	33	6	46
	RP11-12J13	3q11.2	3	43			3	23
	RP11-11N6	4q22.1	4	57	2	33	6	46
	RP11-9B6	4q22.2	3	43			3	23
	RP3-470B24	6q27	1	14	2	33	3	23

CTB-57H24	6q27			3	50	3	23
RP11-449P15	7p22	2	29	3	50	5	38
RP11-510K8	7p22.3			3	50	3	23
RP4-607J2	7p22.3			6	100	6	46
RP11-3P22	7q11.22	2	29	1	16	3	23
RP4-715F13	7q11.22			3	50	3	23
RP4-560O14	7q21.11	2	29	2	33	4	31
RP11-575G1	7q21.11	2	29	2	33	4	31
RP11-153P4	9q34.21	1	14	3	50	4	31
RP11-399H11	9q34.3			3	50	3	23
RP11-424°11	11q13.1	2	29	4	67	6	46
RP11-147G6	11q13.1			4	67	4	31
CTC-221K18	12q24.33			3	50	3	23
RP11-495K9	12q24.33			3	50	3	23
RP11-46H11	12q24.33			3	50	3	23
RP11-21B21	16q24.2			3	50	3	23
RP4-597G12	16q24.2			3	50	5	38
RP11-524F11	17p11.2	1	14	6	100	7	54
RP11-189D22	17p11.2	2	29	2	33	4	31
RP11-478P5	17q25.1			4	67	4	31
RP11-196E5	17q25.1			4	67	4	31
RP11-563B11	18q23			3	50	3	23
RP11-315M18	18q23			3	50	3	23
RP11-268°21	19p13.3			5	83	5	38
RP11-500M22	19p13.3	2	29	5	83	<u>7</u>	54
CTC-482H14	19p13.3			3	50	3	23
RP5-859H16	19p13.3			3	50	3	23
RP11-565J3	19p13.3			4	55	4	31
CTD-3149D2	19p13.11			5	83	5	38
CTC-251H24	19p13.11			3	50	3	23
RP11-521I20	19q13.33			3	50	3	23
CTD-2545M3	19q13.33	1	14	3	50	4	31
RP11-10I11	19q13,41			4	66	4	31

	RP5-1107C24	20q13.33	2	29	4	66	6	46
	RP4-563E14	20q13.33	1	14	3	50	4	31
	RP11-113F1	21q22.2	1	14	3	50	4	31
	RP11-351D2	21q22.3	1	14	5	83	6	46
Pérdidas	RP11-450O3	7q11.23	1	14	2	33	3	23
	RP11-449P15	7p22	1	14			1	8
	RP11-510K8	7p22.3	1	14			1	8
	RP4-607J2	7p22.3	1	14			1	8
	RP11-153P4	9q34.21			1	16	1	8
	RP11-500M22	19p13.3	2	29			2	16
	CTC-482H14	19p13.3	1	14			1	8
	RP11-565J3	19p13.3	1	14			1	8
	CTD-3149D2	19p13.11	1	14			1	8
	CTC-251H24	19p13.11	3	43	1	16	4	31
	CTD-2545M3	19q13.33	1	14			1	8

Al realizar un análisis no supervisado de los CGH arrays, las muestras se separaron en 2 grupos por sus alteraciones genómicas: 7 muestras se agruparon en el Cluster I y 6 muestras en el Cluster II (Fig. 17).

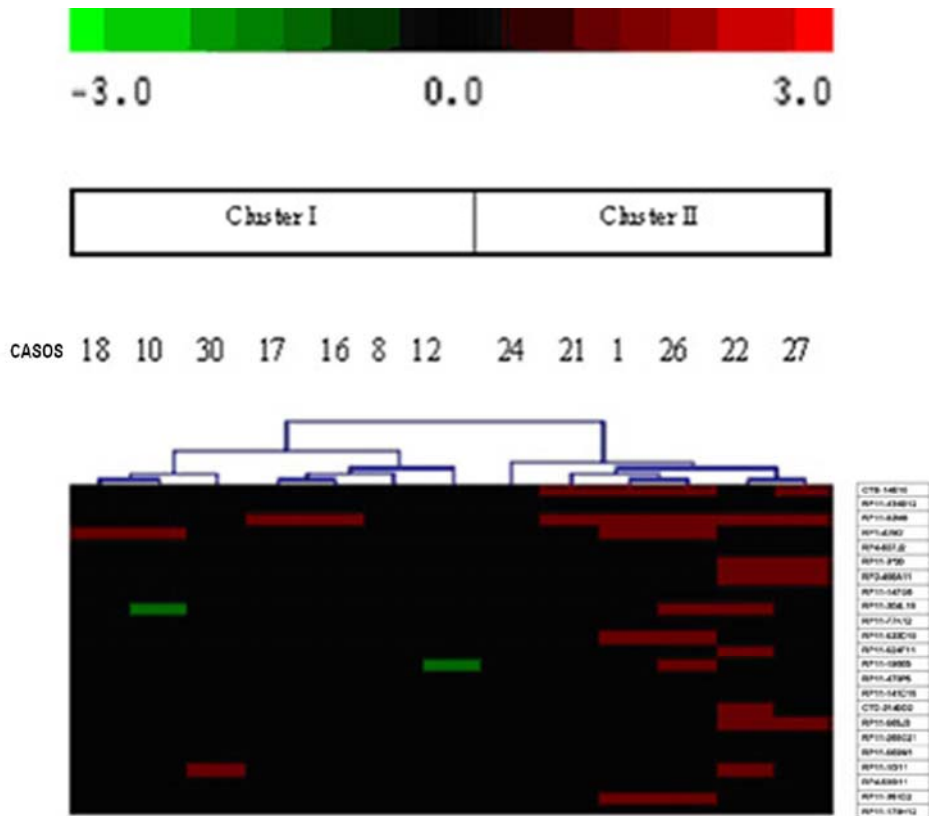


Figura 17: Análisis no supervisado por CGH arrays. Cada columna representa un caso y cada fila un BAC. Las pérdidas se indican en verde y las ganancias en rojo.

De los 6 pacientes incluidos en el cluster II, 5 correspondían a SMD tipo síndrome 5q- (casos 21, 22, 24, 26 y 27). El otro paciente (caso 1) incluido en este cluster había sido diagnosticado como AR, pero al revisar el diagnóstico se detectó que por FISH había un 4% de células con 5q- y por morfología un 8% de los megacariocitos eran mononucleados y la eritropoyesis era hipoplásica.

En el cluster I se agrupaban el resto de los casos y no incluía ningún síndrome 5q-. Sólo un paciente mostraba esta delección pero se trataba de un caso de AREB-1 (caso 12).

Se realizó el análisis SAM que indicó que las diferencias entre estos 2 cluster tenían lugar tan solo en 26 BAC. Al revisar estos BAC y teniendo en cuenta sólo las regiones con al menos 2 BAC consecutivos alterados se vio que las regiones 11q13, 17q25, 19q13, 20q13 y 22q13.2 estaban ganadas en el 100% o en el 80% de los casos

del cluster II, lo que contrastaba con un número normal de copias o incluso deleciones en el cluster I. (Tabla 12)

Tabla 12: Regiones que diferían entre cluster I y II.

Clon	Locus	Cr.	Cluster I							Cluster II					
			Ca. 18	Ca. 10	Ca.30	Ca.17	Ca.16	Ca.8	Ca.12	Ca.24	Ca.21	Ca.1	Ca.26	Ca.22	Ca.27
CTB-14E10	1p36.33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
RP11-434B12	2p25.1	2	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
RP11-83M8	2p25.1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
RP1-42M2	7p22.1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
RP4-607J2	7p22.3	7	0	-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
RP11-3°20	8q24.21	8	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
RP3-466A11	11q12.2	11	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
RP11-147G6	11q13.1	11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
RP11-304L19	16p13.3	16	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
RP11-77K12	16q23.1	16	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
RP11-533D19	16q24.3	16	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
RP11-524F11	17p11.2	17	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
RP11-196E5	17q25.1	17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
RP11-478P5	17q25.1	17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
RP11-141D15	17q25.3	17	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
CTD-3149D2	19p13.11	19	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	1	1	1	1
RP11-565J3	19p13.3	19	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	1	1	1	0
RP11-268O21	19p13.3	19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
RP11-569M1	19q13.2	19	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	1	1	1	1
RP11-10I11	19q13.41	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
RP4-599I11	20p13	20	0	0	-1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
RP11-351D2	21q22.3	21	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
RP11-178H12	21q22.3	21	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
XX-461k10	22q11.21	22	0	0	-1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
RP5-925J7	22q13.32	22	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
CTA-799F10	22q13.33	22	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1

.Cr-Cromosoma. Ca-Caso. 1-ganancia de la región. -1-pérdida de la región. 0-número normal de copias.

Para confirmar las ganancias genómicas detectadas por CGH arrays, se realizó una análisis mediante FISH empleando la sonda de DNA extraída del BAC RPC111-440G22 (1q31.32) confirmándose la ganancia del material genómico. (Fig. 18)

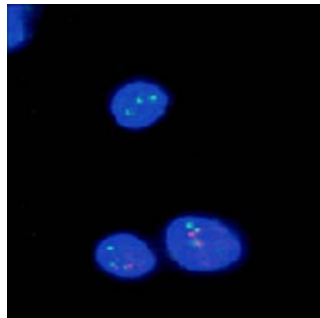


Figura 18: FISH realizada con la sonda del BAC RPC111-440G22 en las MSC. Las 3 señales verdes indican la ganancia en 1q31.12 en el paciente número 26.

Para confirmar que estas alteraciones realmente se encontraban en las MSC, y no eran producto de la expansión, en 4 pacientes se realizó estudio tanto en MSC obtenidas mediante “sorting” como en MSC expandidas y se realizó en paralelo un estudio de CGH arrays en los linfocitos T. Comprobamos que en ninguno de estos casos los linfocitos T presentaban las alteraciones genéticas que se observaban en las MSC (fig.19).

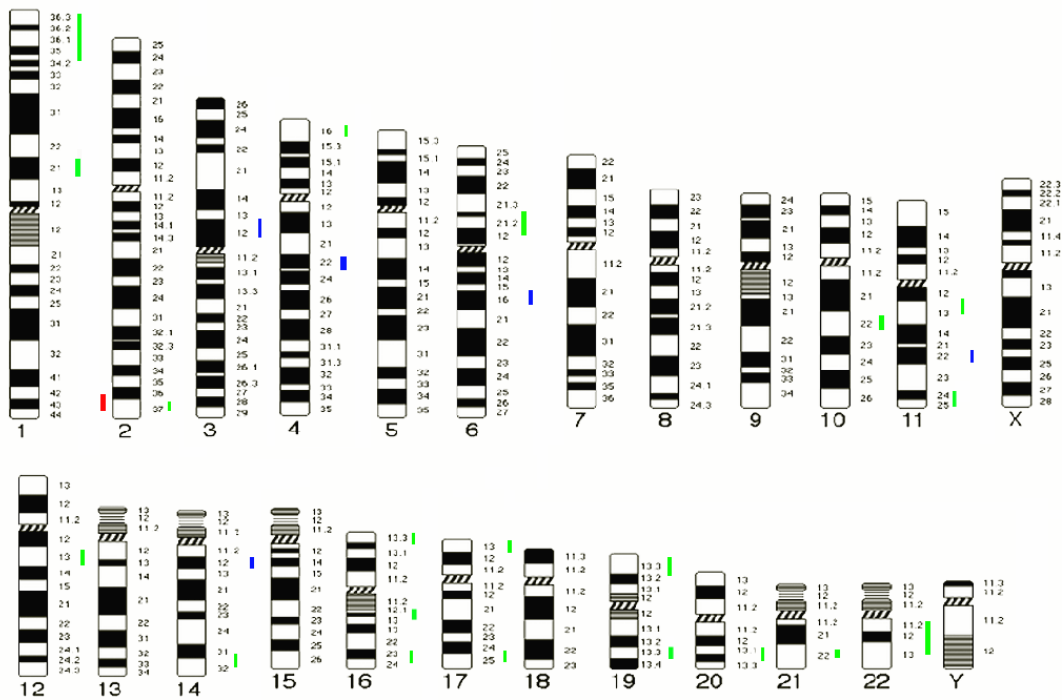


Figura 19: Cambios genómicos detectados por CGH arrays en las MSC y en las células mononucleadas de sangre periférica (caso 22). Las barras a la derecha del ideograma indican ganancias de material cromosómico mientras que las barras a la izquierda del ideograma indican pérdida de material cromosómico. El color verde indica ganancias en MSC y el color azul ganancias en células mononucleadas de sangre periférica; las pérdidas en las MSC se han indicado en rojo.

Cuando se analizaron las MSC tras “sorting” y sin haber sido expandidas también se evidenciaron cambios genómicos. Las regiones ganadas más frecuentemente en los casos analizados fueron: 1q31, 10q26 y 20q13. Es necesario tener en cuenta que la pureza de las MSC obtenidas por sorting era superior al 99% (fig. 20).

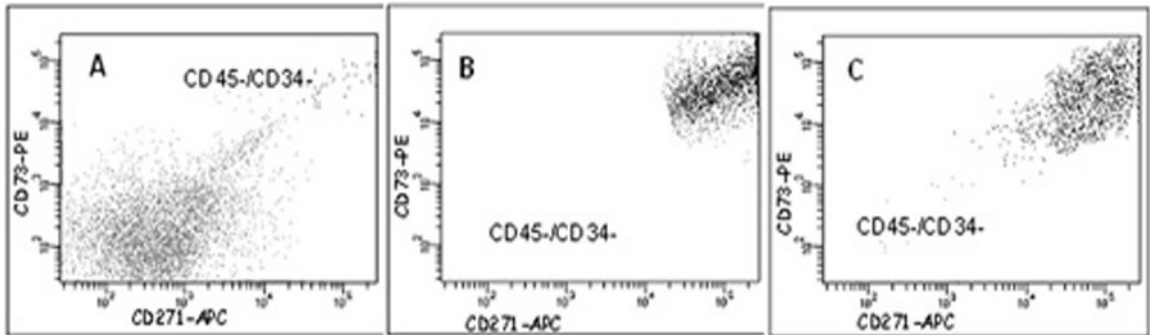


Figura 20: Aislamiento de MSC de la MO mediante separación celular por citometría de flujo “sorting”, en negro se indica la población de MSC y en gris los eventos contaminantes. **A:** localización del “gate” para CD73⁺/CD271⁺. **B:** células obtenidas. **C:** comprobación de la pureza de MSC: superior al 99%,

Para confirmar estas ganancias genómicas se realizó nuevamente análisis mediante FISH. Para ello se empleó la sonda del BAC de 7p13 ya que en el caso 34 presentaba una ganancia alta. La FISH se realizó en las MSC expandidas de ese paciente. Como se observa en la fig. 21, en la FISH se detectaron varias señales confirmando que la ganancia genómica era la misma que la observada en las MSC previa a su expansión.

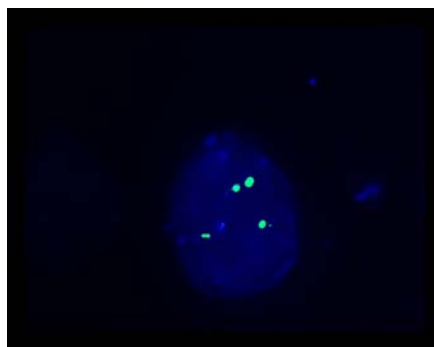


Figura 21: Estudio por FISH de las alteraciones genómicas encontradas por CGH arrays en el caso 34. Sonda de RP11-132L11 en las MSC, las 4 señales verdes indican ganancia en 7p13.

5.4. ESTUDIO DE LAS MSC MEDIANTE PCR TRAS CGH ARRAYS

Puesto que en el estudio mediante CGH arrays en MSC habíamos observado que los pacientes se agrupaban en 2 clusters dependiendo de los cambios genómicos de sus MSC, quisimos analizar si alguno de los genes afectados podría tener un papel en la fisiopatología de la enfermedad. Para ello identificamos y cuantificamos mediante PCR cuantitativa aquellos genes dentro de las zonas ganadas y que “a priori” pudieran estar relacionados con la fisiopatología de la enfermedad.

En la tabla 13 se muestra la lista de BAC implicados en la separación de los clusters, la localización cromosómica así como los genes que consideramos interesantes para su análisis específico.

Tabla 13: BAC que diferencian cluster I y cluster II

BAC	Cromosoma-Región	Genes
CTB-14E10	1p36.33	<i>TNFRSF18;TNFRSF4</i>
RP11-434B12	2p25.1	<i>ID2</i>
RP11-83M8	2p25.1	
RP1-42M2	7p22.1	<i>PDGFα; EIF2AK1</i>
RP4-607J2	7p22.3	<i>NUDT1</i>
RP11-3020	8q24.21	
RP3-466A11	11q12.2	<i>MS4A3</i>
RP11-147G6	11q13.1	<i>FGF4; PRDX5</i>
RP11-304L19	16p13.3	<i>IL-32; TRAF7</i>
RP11-77K12	16q23.1	
RP11-533D19	16q24.3	
RP11-524F11	17p11.2	<i>RASD1</i>
RP11-196E5	17q25.1	
RP11-478P5	17q25.1	<i>CD300A</i>
RP11-141D15	17q25.3	<i>EPR1; BIRC5</i>
CTD-3149D2	19p13.11	<i>GDF15</i>
RP11-565J3	19p13.3	
RP11-268 ^o 21	19p13.3	
RP11-569M1	19q13.2	
RP11-10I11	19q13.41	<i>KLK6-14</i>
RP4-599I11	20q13	<i>RASSF2A</i>
RP11-351D2	21q22.3	
RP11-178H12	21q22.3	

En la tabla destaca la localización de genes implicados en regulación de la síntesis de la Hb (*EIF2AK1* y *GDF15*, indicados en rojo); genes implicados en megacariopoyesis (*FGF4*, indicado en verde), genes implicados angiogénesis (*PDGF α* , indicado en morado) y genes implicados en mecanismos de apoptosis (*IL32*, indicado en azul).

Para realizar este estudio se incluyeron 7 pacientes diagnosticados de síndrome 5q-, 22 pacientes diagnosticados de otros subtipos de SMD y 6 controles sanos. En la tabla 14 se encuentra el resumen de las características clínicas y citogenéticas de los pacientes. En todos los casos se expandieron MSC hasta 2°-3° pase en el que se realizó el estudio de PCR.

Tabla 14: Características clínicas y citogenéticas de los pacientes incluidos en el estudio de biología molecular.

Caso	Diagnóstico OMS	Edad	Sexo	Citogenética Convencional Células hematopoyéticas	Marcadores FISH Células hematopoyéticas
40	Síndrome 5q-	70	F	No mitosis	5q- (44%)
41	Síndrome 5q-	72	F	46,XX [15] 46, XX, del(5)(q13q31)[5]	5q- (64%)
43	ARERB -2	62	M	47, XY, del(5)(q13q31), +8, ins(13)(q13q22), add(19)(p13) [20]	5q- (62%) +8 (53%)
45	AR	54	F	No mitosis	+8 (5%)
47	ARSA	74	M	No mitosis	+8 (60%)
49	AREB -2	76	F	46, XX [7] 46, XX, del(3)(p13p23) [11] 48, XX, +8, +21 [2]	+8 (8%)
50	AREB -2	73	M	46, XY [11] 47, XY, +8[9]	+8 (55%)
51	Síndrome 5q-	60	F	No mitosis	5q- (40%)
52	Síndrome 5q-	59	M	46, XY [14] 46, XY, del(5)(q13q31)[6]	No realizada
53	Síndrome 5q-	69	M	46, XY [20]	5q- (30%)
54	Síndrome 5q-	88	M	46, XY, del(5)(q13q31)[20]	5q- (91%)
55	Síndrome 5q-	68	F	No mitosis	5q- (10%)
56	AR	65	F	46, XX [20]	No realizada
57	AR	76	M	46, XY [11] 46, XY, +8[9]	No realizada
58	ARSA	84	M	46, XY [5] 45, X, -Y [15]	No realizada

59	ARSA	81	M	46, XY [20]	No realizada
60	ARSA	67	F	46, XX [20]	No realizada
61	ARSA	72	F	46, XX [20]	No aplicable
62	CRDM	55	F	46, XX [18] 46, XX, t(2;13)(p23;q14)[2]	L13 (40%)
63	CRDM	79	M	46, XY [20]	No realizada
64	CRDM	92	F	46, XX [20]	No realizada
65	CRDM	84	F	46, XX [20]	No marcadores
66	CRDM	81	M	46, XY [21]	No marcadores
67	CRDM	77	F	46, XX [20]	No realizada
68	CRDM-SA	91	F	46, XX [20]	No aplicable
69	AREB-1	87	M	46, XY [20]	5q- (15%) 7q (17%)
70	AREB-2	62	M	47, XY, del(5)(q13q31), +8, ins13(q13q22), add(19)(p13) [20]	5q- (62%) +8 (53%)
71	SMDu	63	F	No mitosis	No aplicable
72	SMDu	79	F	No mitosis	No aplicable

El análisis de PCR cuantitativa se llevó a cabo para el estudio de los siguientes genes: *FGF4*, *IL32*, *EIF2AK1*, *GDF15*, *PDF α* y se utilizó *ABL1* como control. También se estudió el gen de *TNF α* .

En las fig. 22-26 se muestran los resultados de los diferentes genes analizados.

Comprobamos que el gen que codifica para *FGF4* estaba sobreexpresado en las MSC de los pacientes con síndrome 5q- respecto a las MSC de otros SMD, y las diferencias eran estadísticamente significativas ($p=0,032$), mientras que, aunque sobreexpresado respecto a las MSC de los controles, esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p>0.05$). (Fig. 22).

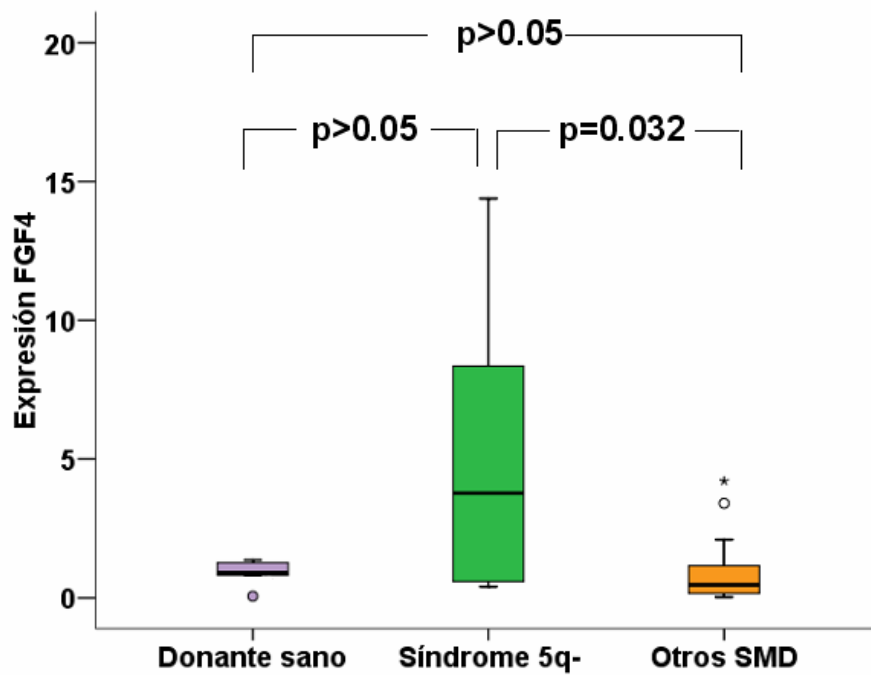


Figura 22: expresión de *FGF4* en las MSC de donantes sanos, síndrome 5q- y otros SMD.

En relación a la *IL32* observamos que también se encontraba sobreexpresada en las MSC de los pacientes con síndromes 5q-, siendo esta sobreexpresión estadísticamente significativa tanto al compararla con la expresión de la MSC de otros SMD ($p=0,01$) como al compararla con la expresión de los controles ($p=0,01$). (Fig.23)

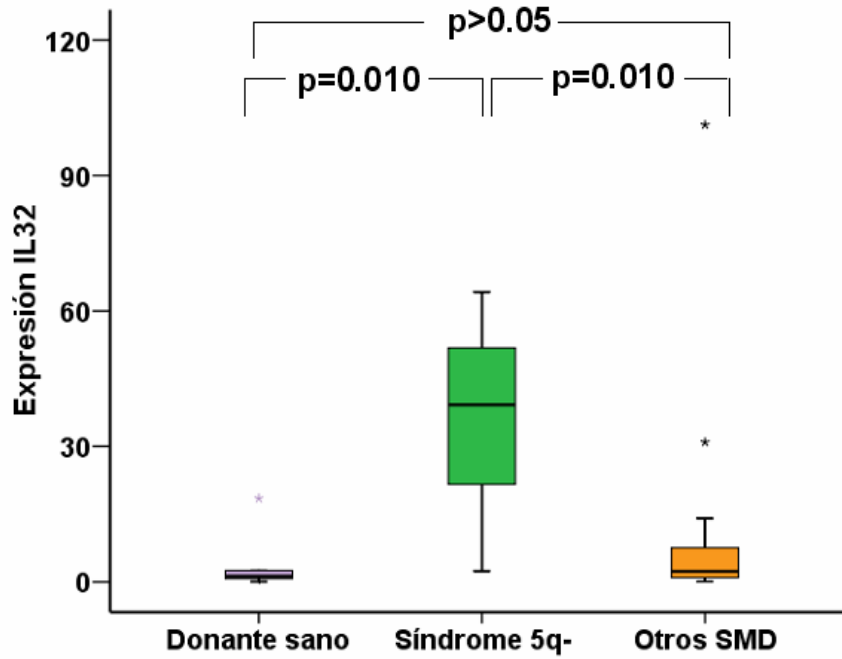


Figura 23: expresión de *IL32* en las MSC de donantes sanos, síndrome 5q- y otros SMD.

Puesto que *IL32* está relacionada con apoptosis a través de $TNF\alpha$, analizamos también éste y comprobamos que estaba sobreexpresado en todos los SMD respecto a los controles, pero la sobreexpresión era mayor en las MSC de los síndrome 5q-. La diferencia resultó estadísticamente significativa entre los donantes y los síndromes 5q- ($p=0,007$) y entre los donantes y otros SMD ($p=0,012$). (Fig. 24A).

Ya que, como comentábamos previamente, ambas citocinas actúan mediando apoptosis por la misma vía, realizamos un análisis de correlación entre ambos que resultó altamente significativa ($p<0.001$). (Fig. 24B)

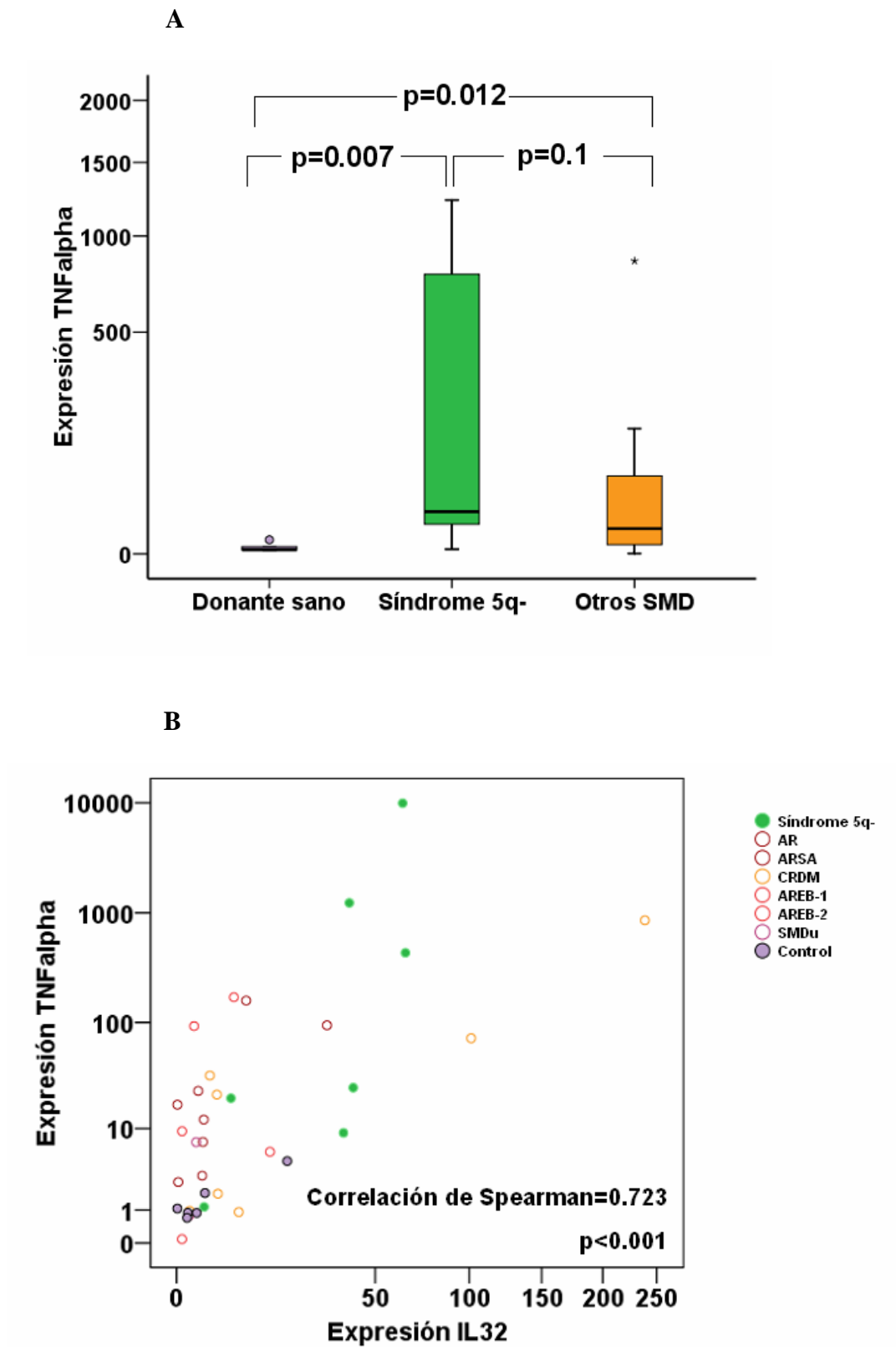


Figura 24: A: expresión de *TNF α* en las MSC de donantes sanos, síndrome 5q- y otros SMD. B: correlación entre *IL32* y *TNF α* .

Cuando analizamos *PDGF α* comprobamos que se encontraba sobreexpresado en todos los SMD. La expresión era discretamente superior en los casos de 5q- pero no había diferencias significativas entre este grupo y los otros casos de SMD. (Fig. 25), siendo en ambos grupos de pacientes superior al de las MSC procedentes de sujetos sanos.

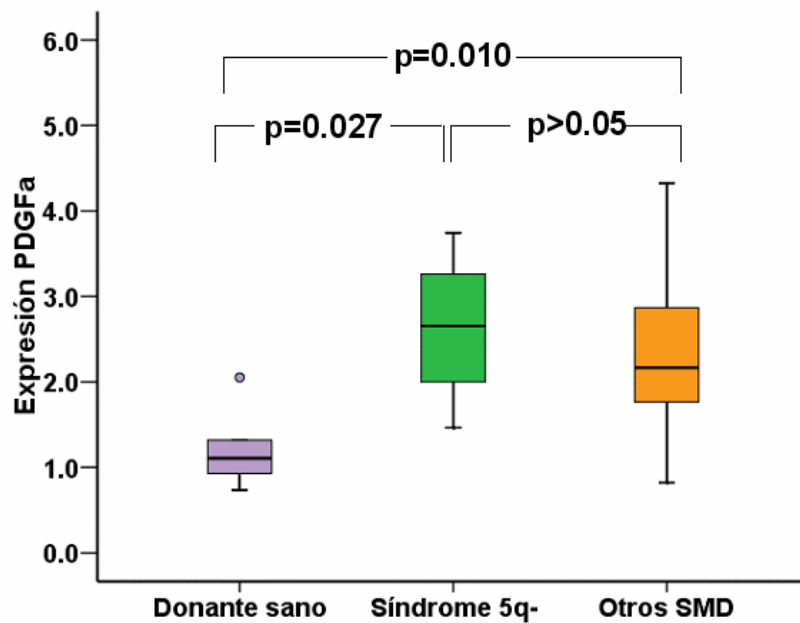


Figura 25: expresión de *PDGF α* en las MSC de donantes sanos, síndrome 5q- y otros SMD.

Con relación a los genes implicados en las síntesis de Hb, *GDF15* y *EIF2AK1* (fig. 26): los niveles de expresión eran muy similares entre las MSC de los controles y las de los SMD no encontrándose diferencias entre 5q-, otros SMD y células sanas ($p>0.05$).

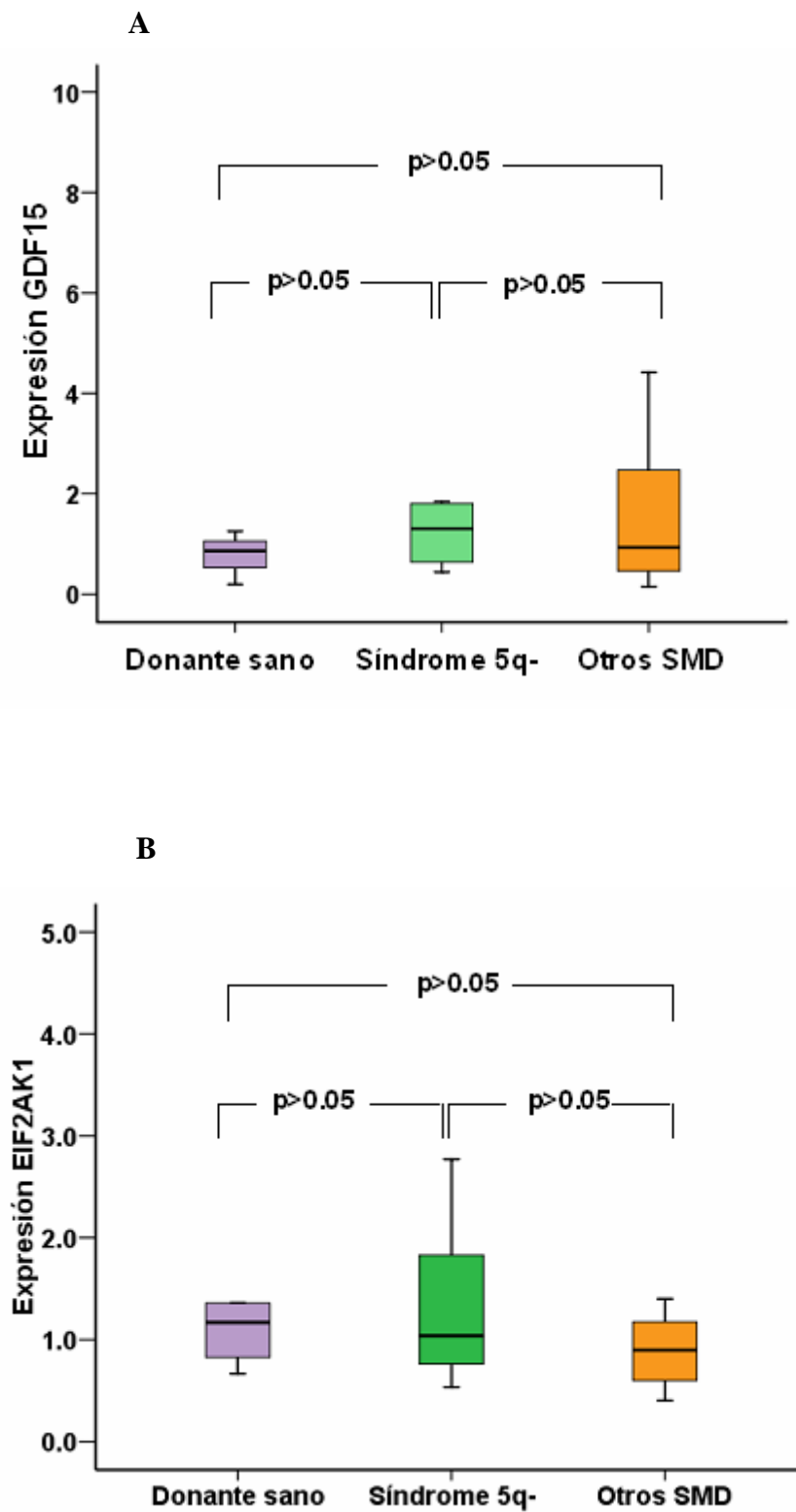


Figura 26: **A:** expresión de *GDF15* en las MSC de donantes sanos, síndrome 5q- y otros SMD. **B:** expresión de *EIF2AK1* en las MSC de donantes sanos, síndrome 5q- y otros SMD.

5.5. ESTUDIOS MEDIANTE MICROARRAYS DE EXPRESIÓN

Para realizar este estudio se emplearon MSC de pacientes con SMD: 3 casos con síndrome 5q-, y 8 casos con otros subtipos de SMD que se pueden considerar de bajo grado (Tabla 15).

Tabla 15: Características clínicas y citogenéticas de los pacientes incluidos en el estudio de microarrays de expresión.

Caso	Diagnóstico OMS	Edad	Sexo	Citogenética convencional Células hematopoyéticas	Marcadores FISH Células hematopoyéticas
45	AR	54	F	No mitosis	+8 (5%)
47	ARSA	74	M	No mitosis	+8 (60%)
51	Síndrome 5q-	60	F	No mitosis	5q- (40%)
55	Síndrome 5q-	68	F	No mitosis	5q- (10%)
56	AR	65	F	46, XX [20]	No realizada
60	ARSA	67	F	46, XX [20]	No realizada
65	CRDM	84	F	46, XX [20]	No marcadores
73	Síndrome 5q-	71	M	46, XY [18] 46, XY, del(5)(q13q31)[2]	5q- (17%)
74	CRDM	84	M	46, XY [18] 46, XY, del(5)(q13q31)[2]	5q- (62%)
75	SMDu	87	M	46, XY, del(5)(q13q31)[20]	5q- (91%)
76	AR	73	F	No mitosis	No aplicable

Al realizar el análisis no supervisado, las muestras se agruparon nuevamente en dos cluster. Las MSC de los 3 casos de síndrome 5q- quedaron incluidas en el segundo cluster, mientras que en el primero se agruparon el resto de los subtipos de SMD, incluyendo los 2 casos que tenían otros subtipos de SMD con alteración del cromosoma 5. (Fig.27)

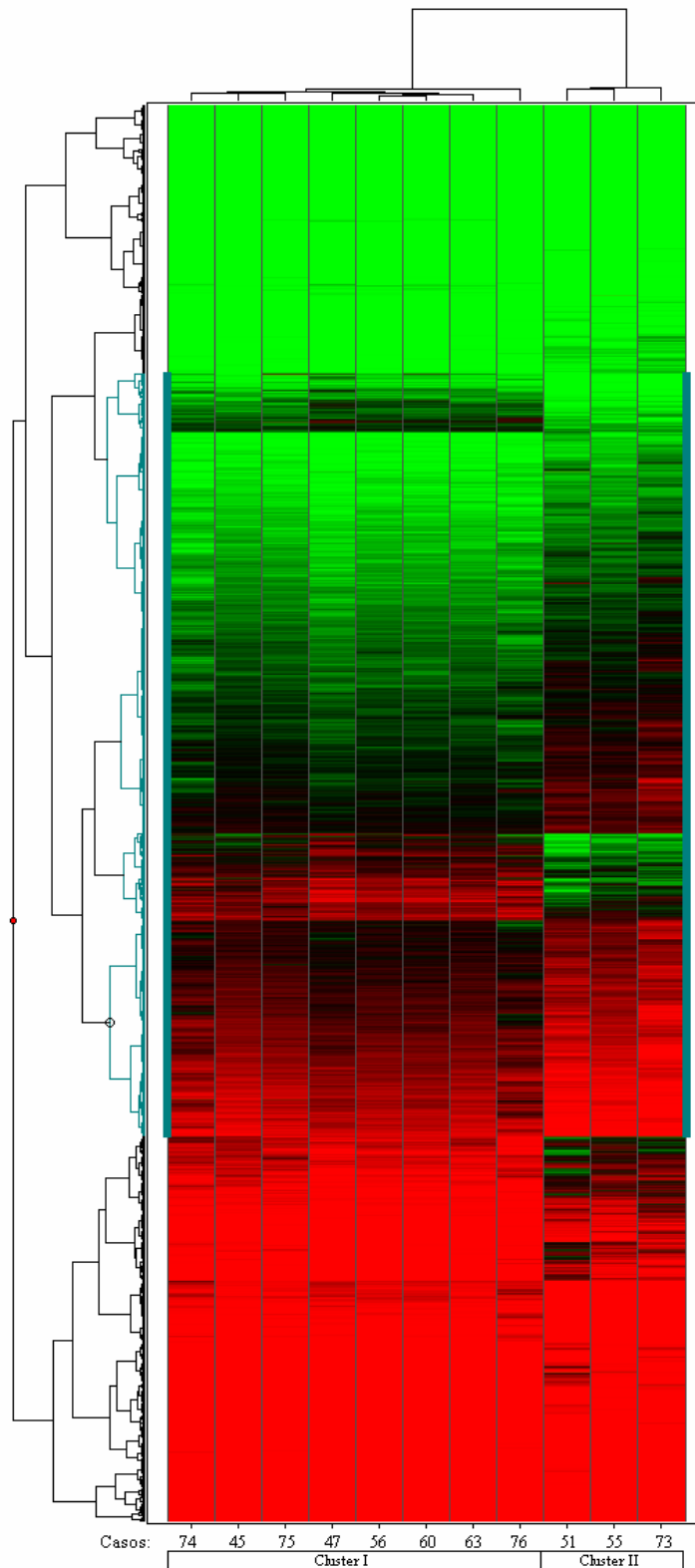


Figura 27: Resultado del análisis de micro arrays de expresión en las MSC. En el cluster II se agrupan las MSC de los 3 casos de síndrome 5q-, mientras que en el cluster I se agrupan las MSC de otros subtipos de SMD. En verde se indican los genes infraexpresados y en rojo los sobreexpresados. Los genes procedentes de los clusters centrales del análisis se encuentran marcados con azul.

En este análisis, no supervisado, se observó que 10977 genes se encontraban expresados diferencialmente cuando se comparaban las MSC de pacientes afectos de síndrome 5q- con las MSC de otros pacientes afectos de SMD de bajo riesgo. Se seleccionaron los 5915 genes procedentes de los clusters centrales del análisis y se valoraron qué vías de señalización estaban implicadas de forma significativa en las diferencias observadas entre los cluster I y II (Fig. 28).

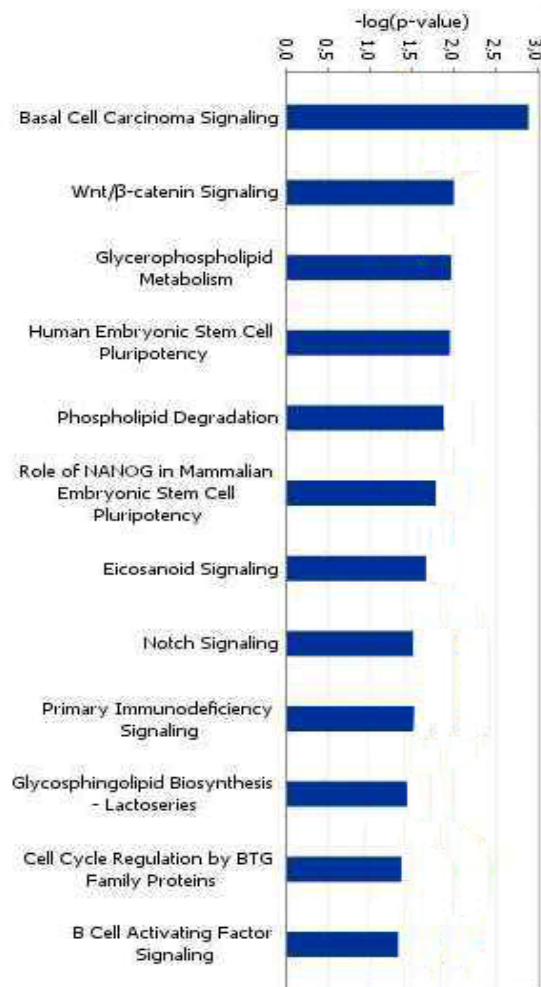


Figura 28: Vías de señalización implicadas en el perfil de expresión génica diferente entre el cluster de MSC de síndrome 5q- y el cluster de MSC de otros subtipos de SMD. El orden de las vías se asigna en función de la proporción de genes disregulados involucrados en cada vía.

Como puede observarse en la figura anterior, las vías en las cuales se encuentran mayor proporción de genes diferencialmente expresados son: vía de carcinoma de células basales, vía de Wnt/ β -catenina, vía de metabolismo glicerofosfolipídico y vía de pluripotencia de células stem embrionarias. Hay que señalar que en las primeras vías, se encuentran implicados numerosos genes comunes con la vía de Wnt/ β -catenina. Otra vía que queremos destacar es la de pluripotencia de células stem embrionarias, ya que en ella se incluyen varias moléculas que pueden resultar de interés. Así, en las MSC de los síndromes 5q- se observa :

- Sobreexpresión de las proteínas de la vía de Wnt, junto con la infraexpresión de APC, uno de los inhibidores.
- Sobreexpresión de proteínas morfogenéticas del hueso.
- Sobreexpresión de FGF4 así como de sus receptores.
- Sobreexpresión de TGF β .
- Sobreexpresión de PDGF β .

Posteriormente se realizó una búsqueda de aquellos genes que presentaban mayores diferencias en la expresión entre el cluster de las MSC de los síndromes 5q- y el cluster de las MSC de los otros subtipos y cuya función estuviera relacionada con procesos celulares que podrían estar implicados en las funciones de las MSC, control de la hematopoyesis o funciones celulares.

1) Entre estos genes, los siguientes estaban sobreexpresados de forma significativa en las MSC de los pacientes con síndrome 5q-:

- *WNT6*: “wingless-type MMTV integration site family, member 6”.

Localización 2q35.

- *TGFβ*: "transforming grow factor beta1". Localización 19q12.2.
- *CST1*: "cystatin SN". Localización 20p11.21.
- *PLA2G5*: "phospholipase A2, group 5". Localización 1p36-p34.
- *CD4*: CD4. Localización 12pter-p12.
- *GDF6*: "growth differentiation factor 6". Localización 8q22.1.
- *LRRC17*: "leucine rich repeat containing 17". Localización 7q22.1.

2) Estaban infraexpresados de forma significativa los siguientes genes en las MSC de los pacientes con síndrome 5q-:

- *APC*: "adenomatous polyposis coli". Localización 5q21-q22.
- *STAT4*: "signal transducer and activator of transcription 4". Localización 2q32.2-q32.3.
- *PIK3R4* y *PIKC3B*: "phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4" y "phosphoinositide-3-kinase catalytic". Localización 3q22.1 y 3q22.3.
- *CMAH*: "human CMP-N-Acetylneuraminic acid hydroxylase". Localización 6p21.32.
- *JMY*: "junction mediating protein". Localización 5q14.1.
- *EPGN*: "epithelial mitogen homolog". Localización 4q13.3.
- *PDE4DIP*: "phosphodiesterase 4D interacting protein". Localización 1q12.
- *OXRI*: "oxidation resistance 1". Localización 8q23.
- *TRAF5*: "TNF receptor-associated factor 5". Localización 1q32.

5.6. ESTUDIOS EN TRANSWELL

Con objeto de analizar si el cultivo en presencia de CH modificaba la expresión génica de las MSC normales, se realizó el estudio de cocultivo en transwell. Para ello se plantaron MSC de 9 donantes sanos, sobre las que se plantaron células mononucleadas de MO de pacientes con SMD (tabla 16).

Como control se realizó el mismo tipo de cultivo, pero como segundo inóculo se emplearon células mononucleadas de otros 9 donantes sanos.

Tabla 16: Pacientes con SMD cuyas células mononucleadas de MO se emplearon en el estudio de transwell. Todos los pacientes han sido incluidos en otros estudios ya descritos.

Caso	Diagnóstico OMS	Edad	Sexo	Citogenética Convencional Células hematopoyéticas	Marcadores FISH Células hematopoyéticas
6	ARSA	68	F	46, XX [20]	No marcadores
7	ARSA	68	F	46, XX [20]	No marcadores
37	Síndrome 5q-	62	M	46, XY [5] 46, XY, del(5)(q13q31)[15]	5q- (70%)
38	Síndrome 5q-	61	M	No mitosis	5q- (77%)
40	Síndrome 5q-	70	F	No mitosis	5q- (44%)
50	AREB -2	73	M	46, XY [11] 47, XY, +8[9]	+8 (55%)
56	Síndrome 5q-	59	M	46, XY [14] 46, XY, del(5)(q13q31)[6]	No realizada

Tras realizar el estudio como se ha descrito en el apartado de métodos se realizó el análisis no supervisado de los resultados de los arrays de expresión de las MSC observándose el dendograma que se muestra en la fig. 29.

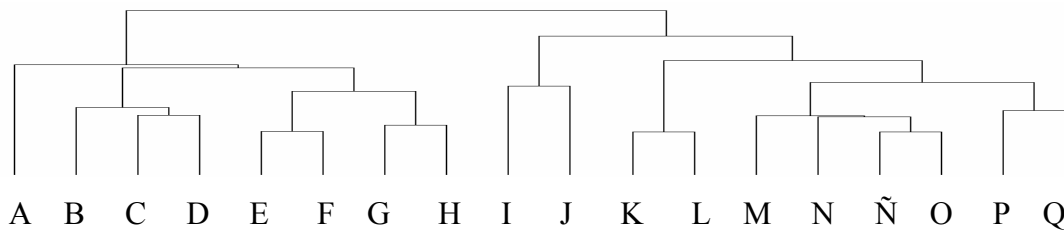


Figura 29: Dendrograma obtenido al realizar el análisis no supervisado de los arrays de expresión de las MSC sanas que han contactado con células mononucleadas de MO de pacientes con SMD o de controles sanos. Se obtienen 19 ramas nombradas con las letras A a la Q.

En el dendrograma se puede observar como, en la gran mayoría de los casos, se agrupan por parejas las MSC del mismo donante bien hayan contactado con células monucleadas de un paciente con SMD o bien con células de otro donante sano, es decir, no se encontraron grandes diferencias entre el efecto obtenido con células mononucleadas de pacientes o donantes sanos.

No obstante, al valorar tanto por un análisis de muestras independientes como por un análisis de muestras pareadas, las diferencias existentes entre las MSC que hubieran contactado con células de SMD respecto a las que hubieran contactado con células de donante sano se encontraron 5 genes que en todos los casos diferenciaban ambas células y que se especifican a continuación.

1) Genes sobreexpresados en MSC que han contactado con células hematopoyéticas de SMD:

- *IL2RB*: receptor beta de IL-2. Localización 22q13.1. Involucrado en respuesta inmune T.

- *GZMA*: granzyma A. Localización 5q11-q12. Serinesterasa asociada a los linfocitos T citotóxicos.

· *KLK1*: killer cell-lecithin receptor subfamilia K, miembro 1. Localización 12p13.2-p12.3. Se encuentra en la superficie de las células NK.

· *TRBC1*: T cell receptor β costante 1. Localización 7q34. Se encuentra en la superficie de células T.

2) Gen infraexpresado en MSC que han contactado con células hematopoyéticas de SMD

· *RNASE1*: ribonucleasa, RNasa A familia 1 (pancreática). Localización 14q11.2.

Las interacciones entre el clon neoplásico y el micromedioambiente medular han destacado recientemente como un factor importante en el desarrollo del cáncer⁶⁶. Sin embargo, aún se conoce poco sobre las características del estroma medular de los pacientes con hemopatías.

El desarrollo del SMD es un proceso complejo, para el que se ha propuesto un modelo con pasos sucesivos^{1;2;111;112}. En este modelo, un clon hematopoyético anormal interaccionaría con un micromedioambiente medular alterado que favorece su crecimiento desplazando a la hematopoyesis normal.

La descripción de nuevas alteraciones moleculares a nivel de los progenitores hematopoyéticos implicadas en la patología de los SMD está mostrando que estos procesos son mucho más complejos desde un punto de vista fisiopatológico de lo que se pensaba previamente. Así, se ha descrito recientemente que la alteración de genes que codifican para proteínas ribosomales puede participar en el desarrollo de algunos tipos de SMD como es el caso del síndrome 5q-¹⁵.

Por otro lado, la disponibilidad de nuevas metodologías, mucho más sofisticadas que las anteriormente disponibles, ha permitido conocer qué mecanismos genómicos como la haploinsuficiencia, pueden estar implicados en el desarrollo de estas enfermedades¹¹³.

Todos estos nuevos conocimientos están permitiendo analizar de forma mucho más profunda el desarrollo del clon neoplásico a partir de las alteraciones que, a nivel molecular, muestran las células hematopoyéticas. Sin embargo, pese a que se conocen estas enfermedades como un ejemplo en el cual el micromedioambiente medular juega un papel fundamental en su desarrollo, los datos existentes sobre dicho papel son muy preliminares.

Varias líneas de investigación están centradas en el estudio del papel que las células estromales pueden tener en la fisiopatología de la hematopoyesis ineficaz, pero aún no se ha alcanzado un consenso ^{3;30;67;114}. El estroma medular es un conjunto de células, moléculas y citocinas que conforman un complejo entramado que tiene como función dar apoyo y regular la producción de células sanguíneas tanto en condiciones basales como cuando se incrementa la demanda periférica. Dada esta complejidad, en el presente trabajo decidimos centrarnos en el análisis de las MSC con el fin de trabajar con una población celular homogénea carente de células hematopoyéticas y que además se considera que son los progenitores del estroma. De hecho, con nuestro método de trabajo la pureza de las MSC obtenidas ha sido siempre superior al 98.5% de las células presentes en la muestra, lo que nos permite afirmar que los datos obtenidos son los que corresponden a estas células.

La primera parte de nuestro estudio tenía como objetivo analizar si las MSC de pacientes con SMD eran diferentes de las MO normales. Con esta finalidad analizamos estas células desde un punto de vista fenotípico, funcional y de su capacidad diferenciadora. Pudimos observar cómo en los pacientes con SMD, las MSC muestran un fenotipo diferente al de las MSC de sujetos sanos y con características funcionales anormales.

El patrón de crecimiento de las MSC de los pacientes con SMD es un tema controvertido ya que algunos autores han descrito una capacidad de expansión alterada ^{30;78}, mientras otros han observado un patrón de crecimiento similar al de MO normales ⁷⁶. Nuestros resultados con una capacidad menor de expansión en las MSC de los pacientes afectados de SMD apoyan la primera hipótesis. Las diferencias en estos resultados pueden deberse a la gran variabilidad observada en el crecimiento

de las MSC de SMD, a diferencias metodológicas o bien a que algunos autores no incluyesen en el análisis los casos en los que no se alcanzó confluencia.

Ya el estudio morfológico de las MSC nos permitió detectar cambios. Es bien conocido que la morfología típica de las MSC es similar a la de los fibroblastos; nosotros hemos podido observar que en los cultivos de MSC de pacientes con SMD aparecen células con una morfología diferente, más poligonales y con mayor granularidad. Este hallazgo únicamente ha sido descrito por otro grupo de investigadores³⁰.

Respecto al estudio inmunofenotípico de las MSC la mayoría de los autores coinciden en que las MSC de estos pacientes tienen idénticos marcadores que las normales^{76;77}, sin embargo, no todos los autores están de acuerdo con este hallazgo. De hecho se ha publicado previamente que la expresión de CD90 es menor en las MSC de estos pacientes^{30;79}, dato confirmado en el presente trabajo. Pero además, en nuestra serie las MSC derivadas de pacientes con SMD mostraron una expresión menor de dos moléculas de adhesión (CD104 y CD105). Esta menor expresión podría estar implicada en la relación alterada entre el estroma medular y las células hematopoyéticas.

Dentro de los criterios necesarios para la caracterización de las MSC exigida por la ISCT se necesita demostrar su potencial de diferenciación a tres líneas celulares: adipocito, osteoblasto y condrocito³⁶. A este respecto son muy escasos los datos existentes en la literatura, por lo que no se han podido extraer conclusiones definitivas. Tan solo en un trabajo se indica que, si bien las MSC de los SMD son capaces de diferenciarse a adipocito, los autores observan un menor número de focos de diferenciación que en los controles⁷⁸. En el presente trabajo hemos observado que las MSC de los pacientes consiguen diferenciarse a osteoblasto y a adipocito. Sin

embargo, aunque consiguen diferenciarse a condrocito, el patrón de distribución de las células positivas para colágeno tipo II es muy llamativo y difiere claramente entre los controles sanos y los pacientes.

Uno de los hallazgos más llamativos de nuestro estudio ha sido la capacidad disminuida de las MSC de nuestros pacientes para alcanzar confluencia en el frasco de cultivo y posteriormente para proliferar cuando las células se tripsinizaban y se realizaban pases sucesivos. Dos podrían ser los mecanismos implicados en este crecimiento alterado: o un incremento en la apoptosis o una disminución en la proliferación. Para profundizar en los mecanismos implicados en esta menor capacidad de expansión, se realizaron estudios de ciclo celular y apoptosis. Con relación a lo primero no se hallaron diferencias en la proporción de células en fases S-M entre las MSC de los pacientes y las de los controles. Referente a la apoptosis, aunque era discretamente superior en las MSC de los casos de SMD, esta diferencia no justificaría la difícil expansión observada en las MSC de estos enfermos. De acuerdo con esta observación, son necesarios más estudios que nos permitan explicar la baja capacidad de expansión de las MSC de estos pacientes.

Una de las cuestiones que ha generado más debate en los últimos años es si las MSC de los pacientes con estas enfermedades pertenecen o no al mismo clon tumoral que las células hematopoyéticas. En la mayoría de los estudios la metodología empleada es la misma que la utilizada en este trabajo: estudios mediante FISH de la alteración citogenética clonal. En este sentido los datos de la bibliografía son discordantes. Mientras que en un trabajo se describe un caso en el que las MSC presentan la misma alteración citogenética que las hematopoyéticas ⁸³, otros autores observan que las MSC ⁷⁶ o las células estromales en general ⁶⁹ de los pacientes con SMD no presentan la misma alteración que se detecta mediante FISH en las células

hematopoyéticas. En nuestro estudio, para sistematizar la técnica, el análisis se ha realizado con las mismas sondas comerciales empleadas en el estudio habitual de las hematopoyéticas realizado en el laboratorio de citogenética. En 9 de los 14 casos estudiados pudimos encontrar un porcentaje variable pero significativo (entre 11 y 26%) de MSC con la misma alteración que la que estaba presente en las células hematopoyéticas del mismo paciente. Un punto a tener en cuenta es que realizar la FISH en las MSC es más difícil que realizarla en las hematopoyéticas debido a dos cuestiones: primero la dificultad en individualizar las células tras la “tripsinización”, por lo que hay que buscar campos de microscopio que sean valorables. En segundo lugar, la hibridación es más difícil debido a la menor permeabilidad de la pared celular en las MSC. Nosotros en el presente trabajo optimizamos esta técnica mediante el empleo directo de choque osmótico para desprender las células del frasco de cultivo sin emplear tripsina previa y al no utilizar este enzima se preservan mejor las células. Además, se modificó la velocidad de citocentrifugación al pasar las células a los portas. Con ello fuimos capaces de obtener la hibridación en todos los casos excepto en el número 43 en el que se intentó hibridar dos veces consecutivas dado que presentaba dos alteraciones citogenéticas, pero sólo se consiguió la primera.

Con los resultados anteriormente expuestos podemos concluir que la mayoría de las MSC de estos pacientes no pertenecen al clon tumoral. Sin embargo, una pequeña proporción de las mismas presenta la alteración clonal. Esto sugiere que la célula diana de la alteración clonal podría ser un progenitor más inmaduro que diera lugar tanto a las MSC como a las hematopoyéticas. No obstante, ésta es una hipótesis que habría que confirmar con nuevos experimentos.

Puesto que la gran mayoría de las MSC no pertenecen al clon neoplásico pero presentan importantes déficits funcionales, hemos querido estudiar si estas células presentan otras alteraciones genómicas diferentes de las clonales. Entre los datos existentes previamente, hay algunos estudios en los que se han encontrado alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales cuando se analizaban estas células con técnicas de citogenética convencional ^{30;77}, aunque el número de pacientes analizado es escaso. Sin embargo otros autores no encuentran alteraciones.

Con relación al otro método más frecuentemente utilizado, la FISH, los datos son discordantes: mientras que los datos de Soenen-Cornu ⁷⁶ y Ramakrishan ⁶⁹ mostraban que son normales, Narendran ⁸³ encontraba alteraciones similares al clon hematopoyético en un caso.

Para poder dar respuesta al interrogante de la presencia o no de alteraciones genómicas en estas células, hemos llevado a cabo el estudio mediante técnica de CGH arrays, técnica más sensible que permite estudiar un número mucho mayor de genes que la citogenética convencional o la FISH, permitiendo estudiar las pérdidas o ganancias de material genómico. En todos los casos analizados de pacientes con SMD se encontraron anomalías, mientras que las MSC de los donantes sanos no presentaban estos cambios. Para descartar que se tratase de alteraciones constitucionales y / o que también estuviesen presentes en las células hematopoyéticas, en 7 casos se realizó en paralelo el estudio de CGH arrays en MSC, linfocitos T y células mononucleadas de SP y en ninguno de los casos las alteraciones presentes en las MSC se observaron en las CH o en los linfocitos, lo que demuestra que estas alteraciones no son constitucionales y no están presentes en el clon anormal de las CH. Para confirmar los cambios genómicos en las MSC, se realizó un estudio mediante FISH utilizando la misma sonda usada en el BAC

sobreexpresado en el CGH array y pudimos confirmar la ganancia de material genómico (Fig. 18).

Debemos destacar que en las MSC expandidas las ganancias de material genómico fueron mucho más frecuentes que las pérdidas que tan sólo se observaron en 4 casos. Las regiones cromosómicas más frecuentemente afectadas se han mostrado en la tabla 10. Resulta muy interesante comprobar que en las regiones ganadas están incluidos genes importantes implicados en mecanismos de adhesión célula-célula (tal como la R-Cadherina) o en el desarrollo de tumores (kallikreinas).

Todos los experimentos referidos hasta el momento se llevaron a cabo en células expandidas “in vitro”. Podría pensarse que los cambios genómicos se debieran al proceso de manipulación o expansión in vitro. Para descartar esta posibilidad analizamos si las MSC no expandidas tenían también cambios genómicos. Para ello se aislaron MSC mediante “sorting” por citometría de flujo. Si bien es sabido que las MSC no tienen marcadores específicos^{36;84}, se ha publicado recientemente que la selección de las células con una expresión fuerte para CD73 y CD271 permite enriquecer la población de MSC de la MO³⁷. Para evitar contaminación con las CH se seleccionó por este método una población celular negativa para CD45 y CD34 y con marcadores positivos fuertes CD73 y CD271. Nuevamente se llevó a cabo un análisis mediante CGH arrays y observamos de nuevo que estas células tenían alteraciones genómicas. Al igual que sucedía con los estudios previos, las ganancias eran más frecuentes que las pérdidas. Estos cambios genómicos también se confirmaron realizando un análisis por FISH empleando nuevamente la sonda extraída del BAC sobre las mismas MSC expandidas in vitro, confirmando la presencia de cambios genómicos en las MSC de los pacientes con SMD obtenidas directamente de la MO y que estos mismos cambios están presentes

en las células tras su expansión. Sin embargo, no se puede excluir que el proceso de expansión incremente los cambios genómicos en la población de MSC tras su manipulación *in vitro*.

Como hemos referido previamente en el capítulo de resultados, en el estudio de CGH arrays se llevó a cabo un análisis no supervisado donde encontramos que las MSC de los pacientes con SMD se agrupaban en dos clusters bien diferenciados. En el cluster II se incluían las MSC de todos los pacientes diagnosticados de síndrome 5q-, una entidad claramente definida entre los SMD por su perfil biológico y evolución. Solo un caso, el paciente número 1, no era un paciente con síndrome 5q- sino que había sido diagnosticado de AR. Cuando se revisó el diagnóstico pudimos comprobar que, curiosamente, este paciente no había sido diagnosticado como síndrome 5q- porque presentaba un porcentaje bajo de CH con esta alteración (4% por FISH), pero la morfología en MO era similar a los pacientes con síndrome 5q- (serie roja hipoplásica y megacariocitos monolobulados en un paciente con anemia y cifra de plaquetas normal en sangre periférica). Estos hallazgos sugieren que el estroma medular y/o sus precursores mesenquimales están alterados y que esta alteración puede ser diferente dependiendo del subtipo de SMD. De hecho nuestros datos revelan que en las MSC de pacientes con 5q- existe un perfil genómico singular diferente de otros pacientes y que incluiría la sobreexpresión de algunas regiones genómicas (7p22.3, 19p13.3, 19p13.11) cuyos genes podrían desempeñar un importante papel en la patogénesis y en las características clínicas de la enfermedad.

El papel del micromedioambiente en el desarrollo tumoral fue propuesto inicialmente por Paget en su hipótesis "seed and soil" (semilla, CH, y tierra, estroma)¹¹⁵. Trabajos recientes han demostrado que en etapas tempranas de la carcinogénesis

se producen cambios genéticos en el estroma ¹¹⁶. Este estroma genéticamente inestable podría facilitar el crecimiento de células clonales malignas llegando a un “ambiente permisivo” ^{117;118}. Se ha propuesto que el micromedioambiente en SMD jugaría una papel central en el desarrollo del SMD y actualmente se están buscando dianas terapéuticas específicas contra este micromedioambiente ¹¹⁹⁻¹²¹.

Este modelo es el que se considera por muchos autores que puede ser el que se esté produciendo en los SMD. De hecho nuestros datos apuntan a que este micromedioambiente “permisivo” o “inductor” no solamente se debe a cambios funcionales sino que, al menos en algunos casos, podrían existir de base cambios genómicos. Nuestros datos apuntaban a que al menos un subtipo de pacientes con un tipo específico de alteración, los pacientes con síndrome 5q-, presentaban en su micromedioambiente alteraciones diferentes de otros SMD. Muy recientemente se ha demostrado que la base de la alteración de la hematopoyesis de estos pacientes se encontraba en una alteración molecular que afecta a un gen que codifica para una proteína ribosomal cuya función estaría alterada ¹⁵. Sin embargo, esta alteración que podría ser la causa de la eritropoyesis deficiente, no explica la ventaja proliferativa del clon así como otros hallazgos biológicos, sugiriendo que podría haber otras alteraciones implicadas en la patogénesis de este subtipo de SMD ¹²².

Con el fin de profundizar sobre las diferencias halladas entre ambos cluster en el estudio de CGH arrays, decidimos analizar qué genes que pudieran estar implicados en el desarrollo de los SMD podría estar expresado de forma diferente en ambos cluster. Varios genes sobreexpresados en el cluster II podrían estar de alguna manera implicados en el desarrollo de estas enfermedades. Elegimos los siguientes genes para su estudio más detallado: genes implicados en la regulación de la síntesis de la Hb (*EIF2AK1* y *GDF15*), genes implicados en megacariopoyesis (*FGF4*),

genes implicados en angiogénesis (*PDGF α*) y también genes implicados en mecanismos de apoptosis (*IL32*). Puesto que *IL32* media apoptosis a través de la vía de *TNF α* , se incluyó también en el análisis el gen que codifica esta citocina. Analizamos la expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa en una serie de 29 pacientes.

Comprobamos que varios de estos genes podrían estar implicados en la fisiopatología de estos procesos. En primer lugar, dada la importante afectación de la serie roja en los SMD, analizamos dos genes implicados en la regulación de la síntesis de Hb, pero para ninguno de los dos encontramos diferencias en su expresión génica en pacientes con síndrome 5q- frente a otros.

El gen que codifica para *FGF4* se encuentra a nivel del cromosoma 11q13 y esta región se encuentra amplificada en nuestra serie de pacientes con síndrome 5q-. Cuando analizamos este gen mediante PCR cuantitativa comprobamos que se encuentra claramente sobreexpresado en las MSC de los pacientes con síndrome 5q- cuando se compara con las MSC de otros SMD. *FGF4* en los adultos está implicado en producción de plaquetas mediante la inducción de megacariopoyesis por una vía independiente de la trombopoyetina¹²³ y esto podría justificar el número normal de plaquetas en estos enfermos.

Uno de los procesos implicados en la patología de los SMD y que ha ido adquiriendo mayor relevancia durante los últimos años es el incremento de la apoptosis en las CH, la cual estaría implicada en el desarrollo de citopenias^{3;4;6}. La *IL32* está implicada en apoptosis en la vía de *TNF α* ¹²⁴. En un estudio recientemente publicado se ha determinado que se encuentra elevada en células estromales de SMD¹²⁵. El gen que codifica para esta citosina se encuentra en 16p13 y al igual que sucedía en el caso anterior se encontraba sobreexpresado en los pacientes que se

agrupaban en el cluster II. Cuando analizamos este gen por PCR cuantitativa comprobamos que se encontraba sobreexpresada en las MSC de los síndromes 5q-. Dado que esta citocina actúa en la vía de TNF α quisimos ver si el gen que codifica para éste también estaba sobreexpresado y pudimos ver que así era. De hecho, la correlación entre la expresión de los genes que codifican para ambas citocinas es muy buena. Ambos se encuentran sobreexpresados en las MSC de los SMD, siendo muy significativos los altos niveles en las MSC de los casos de síndrome 5q-. El TNF α es una de las citocinas que ha sido más ampliamente estudiada como mediadora de apoptosis en estos pacientes. Sin embargo, según nuestros datos, al menos en casos de pacientes con síndrome 5q- es posible que la primera citocina aumentada debido a la alteración genómica de las MSC sea la IL32. El TNF α podría incrementarse de forma secundaria debido a los mecanismos de retroalimentación que funcionan en este sistema ¹²⁴.

En definitiva, el estudio de PCR cuantitativa confirma los resultados de sobreexpresión de algunos genes hallados en el estudio de CGH arrays y plantea que estas alteraciones pueden estar implicadas en el desarrollo de alguna de las características de estas enfermedades, por ejemplo la cifra de plaquetas normal o alta de los pacientes con síndrome 5q-, así como una apoptosis incrementada respecto a otros SMD, lo que podría explicar la importante hipoplasia de serie roja que caracteriza a este síndrome.

Dado que en el análisis llevado a cabo mediante CGH arrays observamos diferencias entre los pacientes con síndrome 5q- y otros SMD, pero que estas diferencias no justificaban completamente todas las características diferenciales entre ambos tipos de SMD, llevamos a cabo un análisis mediante arrays de expresión. Puesto que nuestro objetivo con este estudio era analizar los hallazgos que podrían

ser característicos de las MSC del síndrome 5q-, las comparamos con las MSC de otros subtipos de SMD de “bajo grado”, AR, ARSA y CRDM, en lugar de utilizar como control las MSC de donantes sanos.

Al igual que sucedía con el estudio mediante CGH arrays, al llevar a cabo el análisis no supervisado, las MSC de los pacientes con síndrome 5q- se agrupan en un cluster claramente diferenciado del otro, este último formado por el resto de los subtipos. Este hecho, muy llamativo, demuestra que las MSC de los síndromes 5q-, a pesar del bajo número analizado, presentan un perfil de expresión génica que las diferencia de las MSC de otros subgrupos de SMD de bajo riesgo, teóricamente los más próximos a los primeros confirmando los datos obtenidos previamente mediante CGH arrays.

Una vez comprobado que el perfil de expresión era claramente diferente, quisimos comprobar qué vías de señalización eran las que más diferencias mostraban para poder valorar su posible relación con diferentes SMD. Finalmente analizamos, dentro de las vías descritas, qué genes se encontraban diferencialmente expresados de forma significativa en ambos grupos de pacientes. En la primera vía seleccionada por el programa informático, que es la vía de carcinoma de células basales (Fig. 28), se encuentran implicados numerosos genes comunes con los implicados en la vía de Wnt. Lo mismo sucede con la vía de pluripotencia de células stem embrionarias, en la que están incluidos no sólo los genes de la vía de Wnt sino también otros genes interesantes en relación con la fisiopatología de los SMD o genes que hemos encontrado alterados previamente en nuestro trabajo con CGH arrays. La vía de Wnt se encuentra implicada en numerosos procesos de la biología celular: proliferación celular, embriogénesis, control de la diferenciación a osteoblasto y adipocito de MSC, etc ^{126,127}. En el presente estudio, varios inductores de la vía de Wnt se

encuentran sobreexpresados en las MSC de síndrome 5q- mientras que hay represores infraexpresados. Cada vez es más evidente la interrelación que se produce entre el tejido óseo y el hematopoyético, de tal manera que se admite por la mayoría de los autores que las células osteoblásticas, células derivadas de las MSC, están implicadas en el control de la hematopoyesis y son parte fundamental del denominado nicho de la CH³⁹⁻⁴¹. Por lo tanto, cualquier modificación en la expresión génica de estos precursores osteoblásticos podría redundar en el control de la hematopoyesis. De hecho, la activación de la vía de Wnt en las MSC se ha relacionado con la diferenciación a osteoblasto de las MSC mientras que inhibiría la diferenciación de estas células a adipocito¹²⁶. La sobreexpresión de Wnt podría estar implicada en estos procesos en un intento de preservar la CSH. Otros genes implicados en la regulación de la diferenciación osteoblástica son las proteínas morfogenéticas del hueso, relacionadas con la remineralización del hueso y con la morfogénesis de órganos^{128;129}, las cuales se han encontrado sobreexpresadas en las MSC de los síndromes 5q-. En esta línea también se ha encontrado sobreexpresión de *LRRC17*, implicada en la regulación de los osteoclastos. Su expresión inhibiría la diferenciación de estos¹³⁰.

El gen *CMAH* ha sido recientemente descrito como un nuevo marcador de célula stem, tanto hematopoyética como mesenquimal¹³¹. El hecho de que su nivel sea inferior en las MSC de los síndromes 5q- indicaría que son células más maduras, probablemente por su mayor diferenciación a osteoblasto como hemos comentado en el párrafo previo. Este dato apoyaría el hallazgo de mayor número de osteoblastos en el estroma de pacientes con SMD⁷¹.

Cabe destacar que varios genes relacionados con el metabolismo lipídico están también diferencialmente expresados en nuestros pacientes. Debemos recordar

que muchas de las enzimas implicadas en el mismo, intervienen además en importantes funciones celulares y se ha descrito su implicación en la evolución de los SMD. Así en un reciente artículo, se demuestra la importancia de diversas enzimas del metabolismo lipídico (fosfolipasas) en la evolución de estos procesos ¹³². En el presente estudio hemos podido observar la infraexpresión de dos subunidades de la “fosfoinositide-3-kinase”. Esta enzima forma parte de la vía de señalización de Akt, antiapoptótica, cuya activación podría estar implicada en la transformación de los SMD de bajo a alto riesgo ¹³³. La infraexpresión en las MSC podría, de alguna manera, estar implicada en el incremento de su apoptosis.

Es bien conocido que TGFβ es una de las citocinas implicadas en la fisiopatología de enfermedades hematológicas ¹³⁴ y en especial de los SMD ⁶⁸, estando implicado en la apoptosis de las CH maduras ¹³⁵. En el presente estudio hemos demostrado que el gen que codifica esta citocina presenta mayor nivel de expresión en las MSC de los síndromes 5q-. Trabajos previos de otros autores han mostrado mayor producción de esta citocina por parte del estroma ⁶⁸. El incremento de todas estas moléculas proapoptóticas podría estar implicado en la mayor hipoplasia de serie roja que se observa en este subtipo de SMD respecto a otros y sugiere que, como hemos apuntado previamente, las MSC pueden jugar un papel relevante en la fisiopatología de los SMD. Con relación a este hallazgo, otros genes implicados en regulación de apoptosis / muerte celular están diferencialmente expresados, como *JMY*, un coactivador de p53 ¹³⁶, o *TRAF5* que está implicado en la transducción de varios receptores de TNF ¹³⁷, apoyando los datos obtenidos en el estudio de CGH arrays.

Creemos importante destacar que, al igual que sucedía con los CGH arrays, la sobreexpresión de *FGF4* ¹²³ diferencia a las MSC de los 5q- de otros SMD,

confirmando así los resultados de los estudios genómicos. Además de la sobreexpresión de este gen, se observa un incremento de otras subfamilias de FGF. Esto podría estar implicado, como hemos sugerido previamente, en la cifra de plaquetas normal o aumentada que presentan estos pacientes.

Otras propiedades y funciones de las MSC parecen estar disreguladas en estos pacientes. Cabe destacar por ejemplo, algunos genes implicados en respuesta inmunológica. Es bien conocido que, entre los factores implicados en la fisiopatología de los SMD, se encuentra la disregulación inmune^{1;6;9} y que las MSC tienen una importante función inmunomoduladora⁵⁶⁻⁶⁰. Genes como *STAT4*¹³⁸ o *CSTI*¹³⁹ podrían estar implicados en tal disregulación. Por supuesto se necesitaría ampliar el estudio con proyectos en esta línea que confirmen o desechen esta hipótesis.

Otros procesos que están ampliamente implicados y reconocidos como importantes en el desarrollo de la mielodisplasia son, por ejemplo, el incremento de la angiogénesis o el estrés oxidativo. Con relación al primer aspecto, *PDGFβ* está implicado en varias funciones^{127;140-142} entre otras vasculogénesis¹⁴¹. El incremento de la misma se ha mostrado como un factor clave en la fisiopatología de los SMD¹⁴³ e incluso existen modernos tratamientos diseñados para su control^{144;145}. Con relación al segundo punto, recientemente se conoce la importancia que el estrés oxidativo puede tener en SMD¹⁴⁶. La proteína OXR1 se localiza en las mitocondrias y reduce el daño en el DNA causado por los radicales de oxígeno¹⁴⁷. El gen correspondiente se encuentra infraexpresado en las MSC de los síndromes 5q-, lo que podría implicar menor supervivencia de estas células.

En definitiva, este estudio de microarrays de expresión es concordante con los hallazgos descritos previamente en el trabajo, orientando en muchos casos a que las

MSC juegan un papel importante en la fisiopatología de los SMD. De hecho hemos mostrado alteraciones morfológicas, fenotípicas, funcionales, genómicas y claras diferencias en el patrón de expresión génica de estos pacientes, sugiriendo además que estas diferencias pueden ser específicas del subtipo de SMD. Todos estos datos abren nuevas líneas de investigación que nos permitirán profundizar más en el conocimiento de la fisiopatología de estos procesos y presumiblemente en el desarrollo de nuevas dianas diagnósticas o terapéuticas.

Puesto que la hipótesis que se baraja es que probablemente la interrelación micromedioambiente / CPH sea bidireccional, en un último experimento quisimos comprobar si la presencia de CPH procedentes de pacientes con SMD podría modificar de alguna manera la expresión génica de las MSC procedentes de sujetos sanos. Para poder aislar estas MSC llevamos a cabo experimentos que permitían exclusivamente el contacto humoral.

Para finalizar, en la última parte de nuestro trabajo, estudiando las MSC de controles sanos hemos visto que el simple contacto “humoral” mediante el cocultivo en placas transwell con CH de diferentes SMD, induce la infraexpresión de una RNasa¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ y la sobreexpresión de otros 4 genes. Es muy interesante destacar que esos 4 genes están implicados todos ellos con la respuesta inmune¹⁵¹⁻¹⁵³, mecanismo que sabemos que influye en la fisiopatología de los SMD^{6;9}. Estos datos, por supuesto muy preliminares, abren nuevas vías para realizar posteriores estudios.

En definitiva, nuestros resultados ilustran que las MSC no sólo presentan un fenotipo distinto con un crecimiento alterado sino que además presentan cambios genómicos particulares, algunos de ellos asociados especialmente con un subtipo de SMD apoyando la hipótesis de la relevancia que tiene el micromedioambiente en el desarrollo de los SMD.

De lo expuesto en el presente trabajo podemos concluir:

1. En relación a las características de las MSC de pacientes con SMD:

1.A. Las MSC de pacientes con SMD presentan una capacidad de crecimiento *in vitro* alterada al compararlas con las MSC de sujetos sanos tanto en el tiempo hasta alcanzar la confluencia en la placa de cultivo como en el número máximo de pases alcanzables.

1.B. Las MSC de pacientes con SMD presentan el fenotipo característico descrito para las MSC pero con infraexpresión de algunos marcadores como CD105 y CD104.

1.C. Las MSC de pacientes con SMD son capaces de diferenciarse a adipocito, osteoblasto y condrocito, pero el patrón de diferenciación a condrocito es anómalo.

2. En relación con la presencia de alteraciones genómicas:

2.A. Un porcentaje variable de las MSC de los pacientes con SMD, entre el 10 y el 26%, comparten la alteración clonal con las células hematopoyéticas.

2.B. Las MSC de los pacientes con SMD al ser analizadas mediante CGH arrays presentan alteraciones genómicas, siendo más frecuentes las ganancias de material genómico que las pérdidas.

2.C. Las MSC de los pacientes con síndrome 5q- presentan un patrón genómico y de expresión génica diferente a las MSC de otros subtipos de SMD.

3. En relación con las alteraciones de las MSC y la disregulación de los mecanismos de control de la hematopoyesis:

3.A. Las ganancias genómicas de las MSC afectan a genes que pueden estar implicados en el fenotipo de la enfermedad como pueden ser *FGF4* e *IL32* en el síndrome 5q-.

3.B. En las MSC de los pacientes con síndrome 5q- existe disregulación de otros genes, como *TGF β* y enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico que podrían estar implicados en las características de la enfermedad.

3.C. Tanto los estudios de CGH arrays, arrays de expresión y PCR confirman que genes implicados en apoptosis (*TGF β* , *TNF α*) y control de hematopoyesis (*FGF4*, *PDGF β*) están diferencialmente expresados en pacientes con SMD.

1. Fenaux P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin.Hematol.* 2004;41:6-12.
2. Catenacci DV, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2005;19:301-319.
3. Corey SJ, Minden MD, Barber DL et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:118-129.
4. Liesveld JL, Jordan CT, Phillips GL. The hematopoietic stem cell in myelodysplasia. *Stem Cells* 2004;22:590-599.
5. Nilsson L, Eden P, Olsson E et al. The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes. *Blood* 2007;110:3005-3014.
6. Ogata K, Satoh C, Tachibana M et al. Identification and hematopoietic potential of CD45- clonla cells with very immature phenotype (CD45-CD34-CD38-Lin-) in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem Cells* 2005;23:619-630.
7. Ogata K, Satoh C, Hyodo H et al. Association between phenotypic features of blasts and the blast percentage in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk.Res.* 2004;28:1171-1175.
8. Lopez-Holgado N, Arroyo JL, Pata C et al. Analysis of hematopoietic progenitor cells in patients with myelodysplastic syndromes according to their cytogenetic abnormalities. *Leuk.Res.* 2004;28:1181-1187.
9. Greenberg PL, Young NS, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2002;136-161.
10. Delforge M, Raets V, Van D, V, Vandenberghe P, Boogaerts M. CD34+ marrow progenitors from MDS patients with high levels of intramedullary apoptosis have reduced expression of alpha4beta1 and alpha5beta1 integrins. *Leukemia* 2005;19:57-63.
11. Steidl C, Steffens R, Gassmann W et al. Adequate cytogenetic examination in myelodysplastic syndromes: analysis of 529 patients. *Leuk.Res.* 2005;29:987-993.
12. Sole F, Luno E, Sanzo C et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005;90:1168-1178.
13. Nishino HT, Chang CC. Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2005;129:1299-1310.

14. Giagounidis AA, Germing U, Aul C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin.Cancer Res.* 2006;12:5-10.
15. Ebert BL, Pretz J, Bosco J et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 2008;451:335-339.
16. Pellagatti A, Esoof N, Watkins F et al. Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes using cDNA microarray technology. *Br.J.Haematol.* 2004;125:576-583.
17. Steensma DP. The spectrum of molecular aberrations in myelodysplastic syndromes: in the shadow of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2007;92:723-727.
18. Haferlach T, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Insight into the molecular pathogenesis of myeloid malignancies. *Curr.Opin.Hematol.* 2007;14:90-97.
19. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood* 2004;104:1474-1481.
20. Sloand EM, Mainwaring L, Fuhrer M et al. Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106:841-851.
21. Wlodarski MW, Gondek LP, Nearman ZP et al. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2006;108:2632-2641.
22. Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. *Blood* 2007;109:4816-4824.
23. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br.J.Haematol.* 1982;51:189-199.
24. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
25. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937-951.
26. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1966;16:381-390.

27. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S8-S12.
28. Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2007;8:345-354.
29. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 2001;226:507-520.
30. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola G, Perez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk.Res.* 2005;29:215-224.
31. 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;56:289-301.
32. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J.Cell Physiol* 1999;181:67-73.
33. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
34. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13:69-80.
35. Lee OK, Kuo TK, Chen WM et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-1675.
36. Dominici M, Le BK, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-317.
37. Buhring HJ, Battula VL, Tremel S et al. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2007;1106:262-271.
38. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J.Cell Physiol Suppl* 1982;1:87-94.
39. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J.Clin.Invest* 2006;116:1195-1201.
40. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat.Rev.Immunol.* 2006;6:93-106.
41. Van Overstraeten-Schlogel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal-derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur.J.Haematol.* 2006;76:488-493.
42. Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S et al. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 2004;103:2981-2989.

43. Kim CH, Broxmeyer HE. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood* 1998;91:100-110.
44. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005;105:2631-2639.
45. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem.Sci.* 2006;31:589-595.
46. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment. *Blood* 2005;106:3012-3019.
47. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J.Cell Physiol* 2009;218:237-245.
48. Ringden O, Uzunel M, Sundberg B et al. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia* 2007;21:2271-2276.
49. Hanson S, Thibeault SL, Hematti P. Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in Laryngotracheal Reconstruction. *Curr.Stem Cell Res.Ther.* 2009
50. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis.Colon Rectum* 2009;52:79-86.
51. Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2009;1176:101-117.
52. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp.Hematol.* 2002;30:870-878.
53. El-Badri NS, Wang BY, Cherry, Good RA. Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Exp.Hematol.* 1998;26:110-116.
54. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000;95:3620-3627.
55. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21:1733-1738.
56. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006;20:161-171.

57. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005;105:2821-2827.
58. Maccario R, Podesta M, Moretta A et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005;90:516-525.
59. Jiang XX, Zhang Y, Liu B et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105:4120-4126.
60. Meisel R, Zibert A, Laryea M et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619-4621.
61. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.
62. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-1441.
63. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006;81:1390-1397.
64. Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant.Proc.* 2007;39:3358-3362.
65. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-1586.
66. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J.Cell Biochem.* 2007;101:805-815.
67. Deeg HJ. Marrow stroma in MDS: culprit or bystander? *Leuk.Res.* 2002;26:687-688.
68. Verma A, List AF. Cytokine targets in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Curr.Hematol.Rep.* 2005;4:429-435.
69. Ramakrishnan A, Awaya N, Bryant E, Torok-Storb B. The stromal component of the marrow microenvironment is not derived from the malignant clone in MDS. *Blood* 2006;108:772-773.
70. Alvi S, Shaher A, Shetty V et al. Successful establishment of long-term bone marrow cultures in 103 patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk.Res.* 2001;25:941-954.

71. Borojevic R, Roela RA, Rodarte RS et al. Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic syndrome: composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression. *Leuk.Res.* 2004;28:831-844.
72. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841-846.
73. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:2240-2245.
74. Lundberg LG, Hellstrom-Lindberg E, Kanter-Lewensohn L, Lerner R, Palmblad J. Angiogenesis in relation to clinical stage, apoptosis and prognostic score in myelodysplastic syndromes. *Leuk.Res.* 2006;30:247-253.
75. Estey EH. Modulation of angiogenesis in patients with myelodysplastic syndrome. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2004;17:623-639.
76. Soenen-Cornu V, Tourino C, Bonnet ML et al. Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid of chromosomal clonal markers and support short- and long-term hematopoiesis in vitro. *Oncogene* 2005;24:2441-2448.
77. Blau O, Hofmann WK, Baldus CD et al. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp.Hematol.* 2007;35:221-229.
78. Tauro S, Hepburn MD, Bowen DT, Pippard MJ. Assessment of stromal function, and its potential contribution to deregulation of hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2001;86:1038-1045.
79. Campioni D, Moretti S, Ferrari L et al. Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment. *Haematologica* 2006;91:364-368.
80. Coutinho LH, Geary CG, Chang J, Harrison C, Testa NG. Functional studies of bone marrow haemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). *Br.J.Haematol.* 1990;75:16-25.
81. Deeg HJ, Beckham C, Loken MR et al. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk.Lymphoma* 2000;37:405-414.
82. Aizawa S, Nakano M, Iwase O et al. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differentiation in vitro. *Leuk.Res.* 1999;23:239-246.
83. Narendran A, Hawkins LM, Ganjavi H et al. Characterization of bone marrow stromal abnormalities in a patient with myelodysplastic syndrome. *Pediatr.Hematol.Oncol.* 2004;21:209-221.

84. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004;89:1421-1427.
85. Perez-Simon JA, Caballero D, Diez-Campelo M et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia* 2002;16:1423-1431.
86. Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaria C et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood* 2009
87. Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS.One.* 2009;4:e5994.
88. Willasch A, Eing S, Weber G et al. Enrichment of cell subpopulations applying automated MACS technique: purity, recovery and applicability for PCR-based chimerism analysis. *Bone Marrow Transplant.* 2009
89. del Canizo MC, Fernandez ME, Lopez A et al. Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2003;88:402-407.
90. Blanco B, Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca LI et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 2006;107:3575-3583.
91. Hernandez JM, Gonzalez MB, Granada I et al. Detection of inv(16) and t(16;16) by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia M4Eo. *Haematologica* 2000;85:481-485.
92. Carter NP, Fiegler H, Piper J. Comparative analysis of comparative genomic hybridization microarray technologies: report of a workshop sponsored by the Wellcome Trust. *Cytometry* 2002;49:43-48.
93. Fiegler H, Carr P, Douglas EJ et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes.Cancer* 2003;36:361-374.
94. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 1987;162:156-159.
95. Robledo C, Garcia JL, Caballero D et al. Array comparative genomic hybridization identifies genetic regions associated with outcome in aggressive diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer* 2009;115:3728-3737.
96. Herrero J, Al-Shahrour F, az-Uriarte R et al. GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:3461-3467.

97. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:14863-14868.
98. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98:5116-5121.
99. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006;108:2366-2372.
100. Gonzalez MB, Hernandez JM, Garcia JL et al. The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma. *Haematologica* 2004;89:1213-1218.
101. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
102. Santamaria C, Chillon MC, Fernandez C et al. Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2007;92:315-322.
103. Ward JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Am Statist Assoc* 1963;58:236-244.
104. Gutierrez NC, Ocio EM, de Las RJ et al. Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* 2007;21:541-549.
105. Meng E, Guo Z, Wang H et al. High mobility group box 1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway. *Stem Cells Dev.* 2008;17:805-813.
106. Lin N, Tang Z, Deng M et al. Hedgehog-mediated paracrine interaction between hepatic stellate cells and marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2008;372:260-265.
107. Li N, Feugier P, Serrurier B et al. Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34⁺ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp.Hematol.* 2007;35:507-515.
108. Gutierrez NC, Lopez-Perez R, Hernandez JM et al. Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005;19:402-409.

109. Mills KI, Kohlmann A, Williams PM et al. Microarray-based classifiers and prognosis models identify subgroups with distinct clinical outcomes and high risk of AML transformation of myelodysplastic syndrome. *Blood* 2009;114:1063-1072.
110. Hernandez JM, Castilla C, Gutierrez NC et al. Mobilisation with G-CSF in healthy donors promotes a high but temporal deregulation of genes. *Leukemia* 2005;19:1088-1091.
111. Hellstrom-Lindberg E, Willman C, Barrett AJ, Saunthararajah Y. Achievements in Understanding and Treatment of Myelodysplastic Syndromes. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2000;110-132.
112. Mufti GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2004;17:543-557.
113. Pellagatti A, Hellstrom-Lindberg E, Giagounidis A et al. Haploinsufficiency of RPS14 in 5q- syndrome is associated with deregulation of ribosomal- and translation-related genes. *Br.J.Haematol.* 2008;142:57-64.
114. List AF. New approaches to the treatment of myelodysplasia. *Oncologist.* 2002;7 Suppl 1:39-49.
115. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:139-147.
116. Ishiguro K, Yoshida T, Yagishita H, Numata Y, Okayasu T. Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. *Gut* 2006;55:695-702.
117. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2004;4:839-849.
118. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat.Rev.Cancer* 2007;7:585-598.
119. List AF, Vardiman J, Issa JP, DeWitte TM. Myelodysplastic syndromes. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2004;297-317.
120. Giagounidis AA, Haase S, Heinsch M et al. Lenalidomide in the context of complex karyotype or interrupted treatment: case reviews of del(5q)MDS patients with unexpected responses. *Ann.Hematol.* 2007;86:133-137.
121. Mufti G, List AF, Gore SD, Ho AY. Myelodysplastic syndrome. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2003;176-199.
122. Cazzola M. Myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion (5q-syndrome). A clonal stem cell disorder characterized by defective ribosome biogenesis. *Haematologica* 2008;93:967-972.

123. Kosaka N, Sakamoto H, Terada M, Ochiya T. Pleiotropic function of FGF-4: its role in development and stem cells. *Dev.Dyn.* 2009;238:265-276.
124. Stirewalt DL, Mhyre AJ, Marcondes M et al. Tumour necrosis factor-induced gene expression in human marrow stroma: clues to the pathophysiology of MDS? *Br.J.Haematol.* 2008;140:444-453.
125. Marcondes AM, Mhyre AJ, Stirewalt DL et al. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008;105:2865-2870.
126. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 2009;433:1-7.
127. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat.Med.* 2004;10:789-799.
128. Jeanpierre S, Nicolini FE, Kaniewski B et al. BMP4 regulation of human megakaryocytic differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood* 2008;112:3154-3163.
129. Pregizer S, Mortlock DP. Control of BMP gene expression by long-range regulatory elements. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:509-515.
130. Kim T, Kim K, Lee SH et al. Identification of LRRc17 as a negative regulator of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation. *J Biol.Chem.* 2009;284:15308-15316.
131. Nystedt J, Anderson H, Hirvonen T et al. Human CMP-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) is a Novel Stem Cell Marker Linked to Stem Cell-Specific Mechanisms. *Stem Cells* 2009
132. Follo MY, Mongiorgi S, Finelli C et al. Nuclear inositide signaling in myelodysplastic syndromes. *J Cell Biochem.* 2010
133. Nyakern M, Tazzari PL, Finelli C et al. Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia* 2006;20:230-238.
134. Dong M, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. *Blood* 2006;107:4589-4596.
135. Raza A, Mundle S, Shetty V et al. A paradigm shift in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 1996;10:1648-1652.
136. Zuchero JB, Coutts AS, Quinlan ME, Thangue NB, Mullins RD. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat.Cell Biol.* 2009;11:451-459.

137. Au PY, Yeh WC. Physiological roles and mechanisms of signaling by TRAF2 and TRAF5. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2007;597:32-47.
138. Korman BD, Kastner DL, Gregersen PK, Remmers EF. STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity. *Curr.Allergy Asthma Rep.* 2008;8:398-403.
139. Choi EH, Kim JT, Kim JH et al. Upregulation of the cysteine protease inhibitor, cystatin SN, contributes to cell proliferation and cathepsin inhibition in gastric cancer. *Clin.Chim.Acta* 2009;406:45-51.
140. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22:1276-1312.
141. Albitar M. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol.* 2001;106:170-176.
142. Ng F, Boucher S, Koh S et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 2008;112:295-307.
143. Campioni D, Punturieri M, Bardi A et al. "In vitro" evaluation of bone marrow angiogenesis in myelodysplastic syndromes: a morphological and functional approach. *Leuk.Res.* 2004;28:9-17.
144. List A, Kurtin S, Roe DJ et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N.Engl.J.Med.* 2005;352:549-557.
145. Kotla V, Goel S, Nischal S et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J.Hematol.Oncol.* 2009;2:36.
146. Farquhar MJ, Bowen DT. Oxidative stress and the myelodysplastic syndromes. *Int.J Hematol.* 2003;77:342-350.
147. Durand M, Kolpak A, Farrell T et al. The OXR domain defines a conserved family of eukaryotic oxidation resistance proteins. *BMC.Cell Biol.* 2007;8:13.
148. Wang L, Zhu JS, Song MQ, Chen GQ, Chen JL. Comparison of gene expression profiles between primary tumor and metastatic lesions in gastric cancer patients using laser microdissection and cDNA microarray. *World J.Gastroenterol.* 2006;12:6949-6954.
149. Psarras K, Ueda M, Tanabe M et al. Targeting activated lymphocytes with an entirely human immunotoxin analogue: human pancreatic RNase1-human IL-2 fusion. *Cytokine* 2000;12:786-790.
150. Yagi H, Ueda M, Jinno H et al. Anti-tumor effect in an in vivo model by human-derived pancreatic RNase with basic fibroblast growth factor

- insertional fusion protein through antiangiogenic properties. *Cancer Sci.* 2006;97:1315-1320.
151. Kuhn DJ, Dou QP. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front Biosci.* 2005;10:1462-1474.
 152. Metkar SS, Mena C, Pardo J et al. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity.* 2008;29:720-733.
 153. Kato N, Tanaka J, Sugita J et al. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 2007;21:2103-2108.