

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Post-Grados de Ciencias Biomédicas

16

**CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA
HEMATOPOYÉTICO EN PACIENTES CON LINFOMA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA LA MAESTRA:

MARÍA ALEJANDRA HUERTA ZEPEDA

ASESOR: DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS

MÉXICO, D. F.

2000



2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevo a cabo en la
Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Oncológicas del
Hospital de Oncología del Centro Medico nacional. S XXI.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Bajo la dirección del Dr. Héctor Mayani Viveros.

Durante el desarrollo de este trabajo fui apoyada económicamente por la
Dirección General de Asuntos Escolares.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre y a mi madre, a mis hermanas Gabriela, Carmen y Rocio

Al Dr. Héctor Mayani Viveros, a la Dra. Patricia Ostrosky Shejet, al Dr. Mauricio Salcedo Vargas y a la Dra. Alejandra Talavera Anzures por su participación en el Comité de Asesores.

Al Dr. Luis Benitez-Bribiesca, al Dr. Alfonso Dueñas, al Dr. Hector Mayani V, a la Dra. Regina Montero, al Dr Tonatiuh Ramirez, al Dr. Fabio Salamanca y a la Dra. Patricia Ostrosky S. por las observaciones realizadas en este trabajo.

Al Dr. Agustín Avilés, a la Dra. Patricia Ostrosky, a la Dra. Natividad Neri por sus aportaciones tan valiosas en este proyecto.

A mis amigas Margarita Gutiérrez y Rocío Ruiz por el apoyo que me brindaron.

A todos aquellos que participaron en mi formación

Una teoría científica nunca puede ser verificada, siempre es provisional y está sujeta a posteriores correcciones...

*En consecuencia exige abandonar la actitud dogmática que busca verificación y certeza definitiva y pide adoptar una actitud racional y crítica que busca detectar errores y mejorar siempre nuestras provisionales teorías.
Popper*

INDICE

Lista de Figuras	I
Lista de Tablas	II
Lista de abreviaturas	III
Fotografías	IV
1. RESUMEN	3
ABSTRACT	5
2. INTRODUCCION	6
3. ANTECEDENTES:	8
3.1 El Sistema Hematopoyético	8
3.1.1. Biología y Origen de las Células de la Sangre	8
3.1.2. Microambiente Hematopoyético	12
3.1.3. Citocinas Hematopoyéticas	16
3.1.4. Enfermedades Hematológicas en Hematopoyesis	25
3.2 Generalidades del Linfoma Maligno	33
3.2.1. Etiología	34
3.2.2. Epidemiología	34
3.2.4. Citogenética y Estudios Moleculares	35
3.2.5. Clasificación	36
3.2.6. Tratamiento	39
4. JUSTIFICACION	45
5. HIPOTESIS	47
6. OBJETIVO GENERAL	48
5.1 Objetivos Particulares	48
7. MATERIAL y METODOS	49
8. RESULTADOS	56
8.1 Datos Clínicos y Hematológicos de los Pacientes	56

8.2 Progenitores Hematopoyéticos en Medula Osea	57
8.2.1. Médula Osea Normal	58
8.2.2. Pacientes con Linfoma en Enfermedad Activa	59
8.2.3. Pacientes en Remisión Completa	60
8.2.4. Discusión	62
8.3 Caracterización de Progenitores Hematopoyéticos en Cultivos a Largo Plazo	63
8.3.1. En La Fracción del Sobrenadante	64
8.3.2. En La Fracción Adherente	69
8.3.3. Discusión	75
8.4 Caracterización del Microambiente Hematopoyético	77
8.4.1. Células Nucleadas No Adherentes	77
8.4.2. Células Nucleadas Adherentes	77
8.4.3. Morfología de las Células Nucleadas	78
8.4.4. Unidades Formadoras de Fibroblastos	82
8.4.5. Citocinas en el Microambiente Hematopoyético	84
7.4.6. Discusión	86
9. DISCUSION GENERAL	87
10. CONCLUSIONES	93
11. PERSPECTIVAS	95
12. BIBLIOGRAFIA	97
13. APÉNDICE	114

Publicación artículo: *In vitro* Hematopoyesis in Patients with Malignant Lymphoma During Active Disease and at Complete Clinical Remission After Chemotherapy. (Leukemia and Lymphoma)

I. LISTA DE LAS FIGURAS:

1. Esquema de la Diferenciación y Proliferación Celular	11
2. Interacciones Celulares	13
3. Modelo de los diferentes "nichos" del Microambiente Hematopoyético	14
4. Factores Mielopoyéticos	16
5. Esquema de la Diferenciación Celular	38
6. Sitios de acción de las drogas citotóxicas	44
7. Cinética de Progenitores Hematopoyéticos Mieloides en el Sobrenadante	67
8. Cinética de Progenitores Hematopoyéticos Eritroides en el Sobrenadante	68
9. Cinética de los Progenitores Hematopoyéticos Mieloides en la Fracción Adherente	71
10. Cinética de los Progenitores Hematopoyéticos Eritroides en la Fracción Adherente	72
11. Cinética de las Células Mononucleadas	79
12. Cinética de las Células Mononucleadas de la fracción Adherente	80
13. Cinética de Células reconocibles morfológicamente	81
14. Gráfica de los CFU-F	83

II. LISTA DE TABLAS

1. Niveles de las Células Sanguíneas	9
2. Familia de Interleucina 6	21
3. Clasificación de las Neoplasias Hematológicas	27
4. Factores Pronóstico del Linfoma	33
5. Alteraciones Citogenéticas del Linfoma	35
6. Clasificación de los citotóxicos	44
7. Diferenciación celular	53
8. Datos Clínicos de los Pacientes	57
9. Porcentaje de Progenitores Hematopoyéticos en el día cero	60
10. Progenitores Hematopoyéticos en números absolutos del día cero	61
11. Porcentaje de diferenciación dentro de los CFU-mieloides	61
12. Porcentaje de diferenciación dentro de los CFU-eritroides	61
13. Porcentaje de Progenitores Mieloides en cultivo a lo largo de 7 semanas	73
14. Porcentaje de Progenitores Eritroides en cultivo a lo largo de 7 semanas	74
15. Progenitores Hematopoyéticos Mieloides Totales	74
16. Progenitores Hematopoyéticos Eritroides Totales	75
17. Concentración de citocinas plasmáticas	85
18. Concentración de citocinas en la fracción no adherente de los D-LTC.	85

III. LISTA DE ABREVIATURAS:

1. CEOP: Ciclofosfamida, Epirrubicina, Oncovin (Vincristina), Prednisona.
2. CFU: Unidades formadoras de colonias (de Colony forming units)
3. CFU-C: Unidades formadoras de colonias en cultivo
4. CFU-F: Unidades Formadoras de Colonias de Fibroblastos
5. CMN: Células Mononucleares
6. CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas
7. CSF: Factor estimulador de colonias (de Colony stimulating Factor)
8. CSH: Células Seminales Hematopoyéticas
9. D-LTC: Cultivos Líquidos a Largo Plazo tipo Dexter (de Dexter-Long Term Culture)
10. E: Eritrocitos
11. EA: Enfermedad Activa
12. Epo: Eritropoyetina
13. F: Fibroblastos
14. FGF- β : Factor de Crecimiento de Fibroblastos tipo beta (Fibroblast Growth Factor type- β)
15. FL: Ligando de flk2/flt3
16. G: Granulocitos
17. GM: Granulo-monocitos
18. IL: Interleucina
19. L: Linfocitos
20. LDCG: Linfoma Difuso de Células Grandes
21. LIF: Factor Inhibitorio de Leucemia
22. LTC-IC: Células Iniciadoras de Cultivo a largo plazo (de Long Term Colony-Initiating cell)
23. LTMC: Cultivos de médula a largo plazo (de Long term marrow culture)
24. M: Monocitos
25. MH: Microambiente Hematopoyético
26. MO N Médula Osea Normal
27. PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (de Platelet Derived Growth Factor)
28. RC: Remisión Completa
29. SCF: Factor de Células Seminales (de Stem Cell Factor)
30. TGF- β : Factor Transformante del Crecimiento tipo beta
31. TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral
32. Tpo: Trombopoyetina

IV. FOTOGRAFIAS

1. CFU-Mix
2. CFU-G y M
3. BFU-E
4. CFU-E
5. BFU-E de pacientes con LDCG
6. CFU-E de pacientes con LDCG
7. CFU-mieloide de LDCG
8. CFU-mieloide de LDCG
9. Estroma confluyente de MO de sujetos sanos
10. Estroma de pacientes con LDCG
11. CFU-F de la MO control
12. CFU-F de pacientes con LDCG



Foto 1.- Colonia de Unidades Formadoras de Colonias Mix de Médula ósea control. Se observan en la misma colonia células de origen granulocítico, macrófágico, megacariocítico y eritroide. Cultivo de Metil celulosa del día cero. Microscopio invertido. 10X

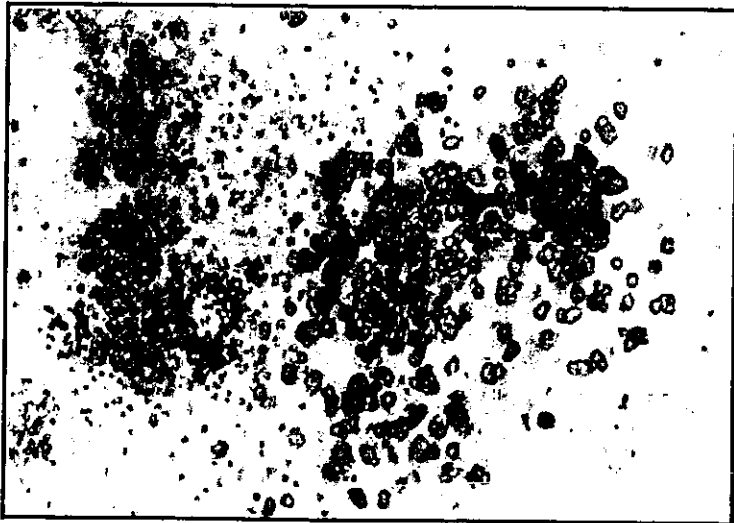


Foto 2. Se observan dos colonias: a la izquierda se observa una colonia de granulocitos (CFU-G) y a la derecha una de macrófagos (CFU-M) en cultivo de Metil-Celulosa del día 21. Microscopio Invertido 4X

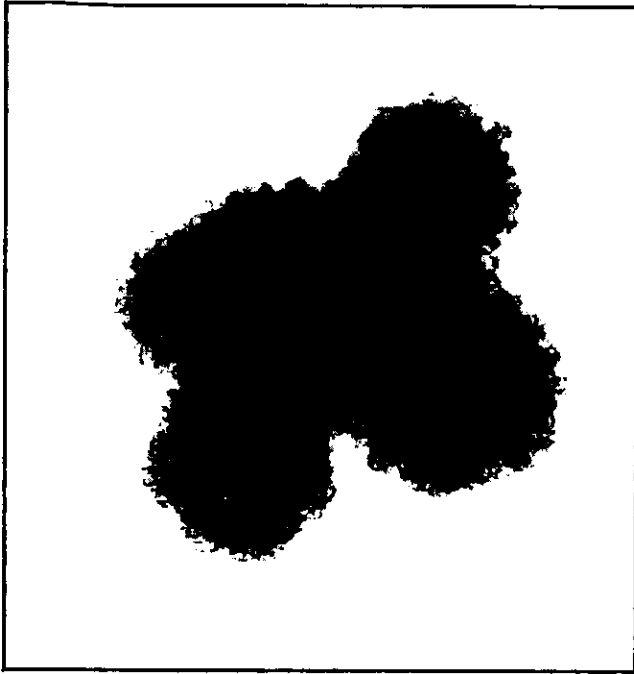
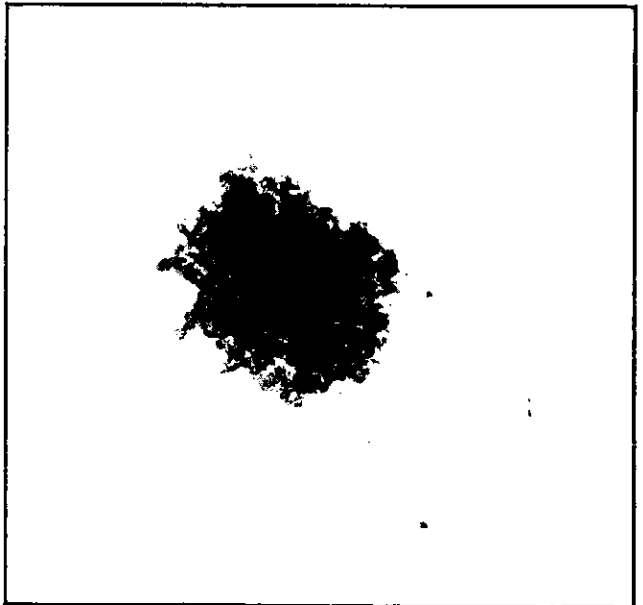


Foto 3: Se observa una BFU-E de Médula ósea control, en cultivo de Metil celulosa del día 14. Microscopio Invertido 10X

Foto 4: CFU-E. Médula ósea control, en metil celulosa del día 14. Microscopio Invertido 10 X



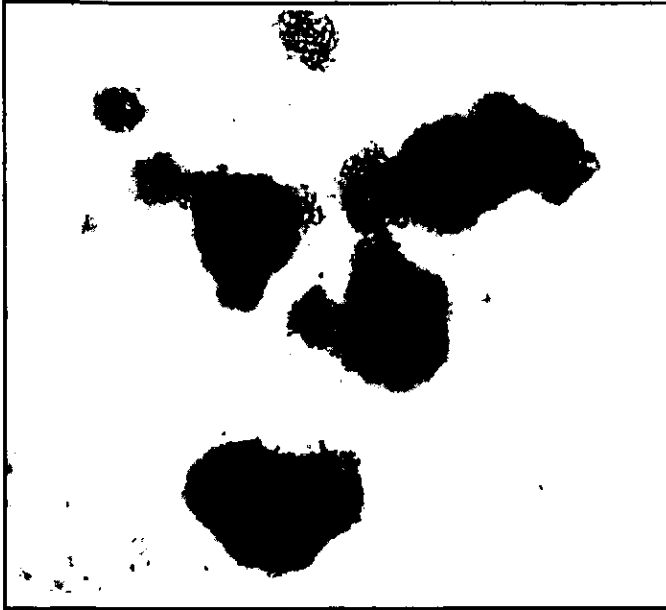


Foto 5: Se observan colonias BFU-E y CFU-E de pacientes con Linfoma. En cultivos de metil celulosa en el día 14. Microscopio Invertido. 10X

Foto 6: Se observa una colonia BFU-E de pacientes con linfoma En cultivos de metil celulosa en el día 14. Microscopio Invertido 10X

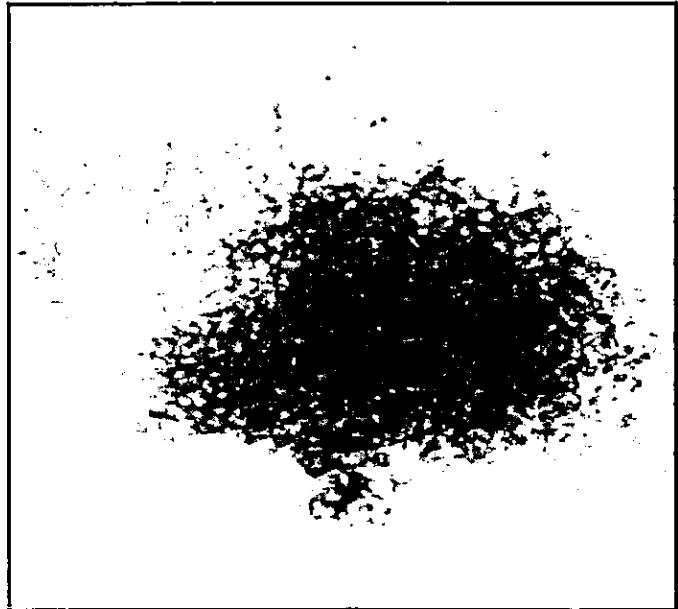
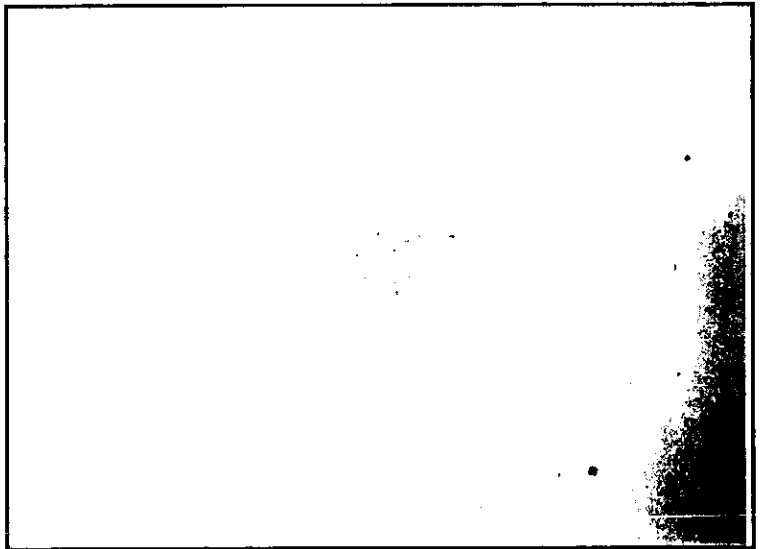




Foto 7: Se observa una CFU-M de LDCG en metil celulosa del día 21. Microscopio Invertido 10X

Foto 8: Se observa una CFU-G de pacientes con linfoma en cultivos de metil celulosa día 21. 4X



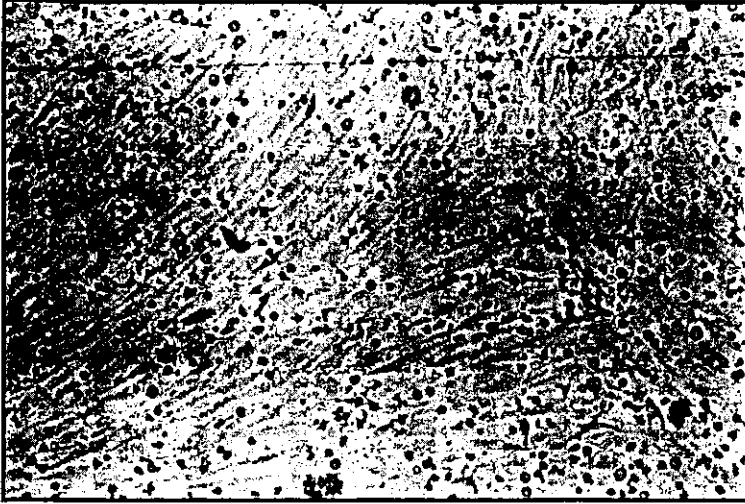


Foto 9 . Cultivo líquido a Largo Plazo tipo Dexter, de médula ósea normal a los 35 días. Se observa un estroma. Se observa un estroma confluyente donde aproximadamente el 75% de células son de origen fibroblástico y el 20% de macrófagos. Sobre el estroma se pueden apreciar algunas células hematopoyéticas. Microscopio Invertido. 10X.

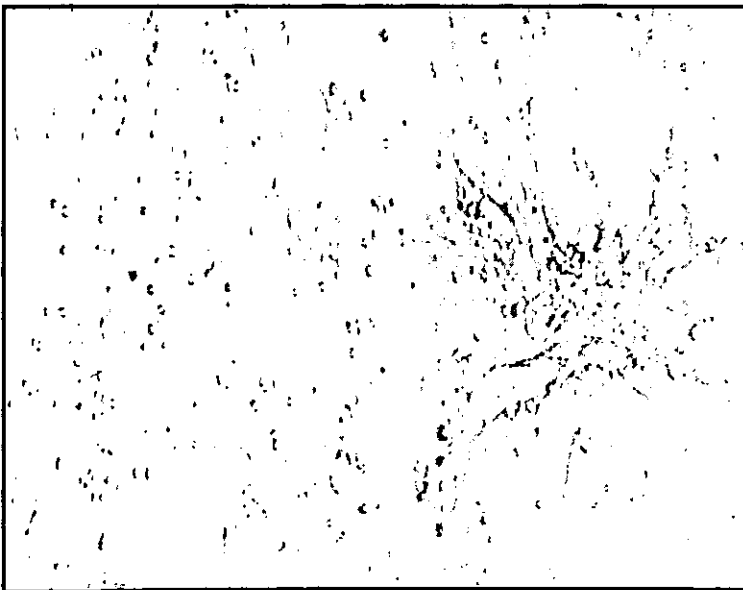


Foto 10. Cultivos a Largo Plazo tipo Dexter de Médula Ósea de pacientes con Linfoma a los 35 días. Se observa un estroma deficiente y algunas células hematopoyéticas. Microscopio invertido. 10X.

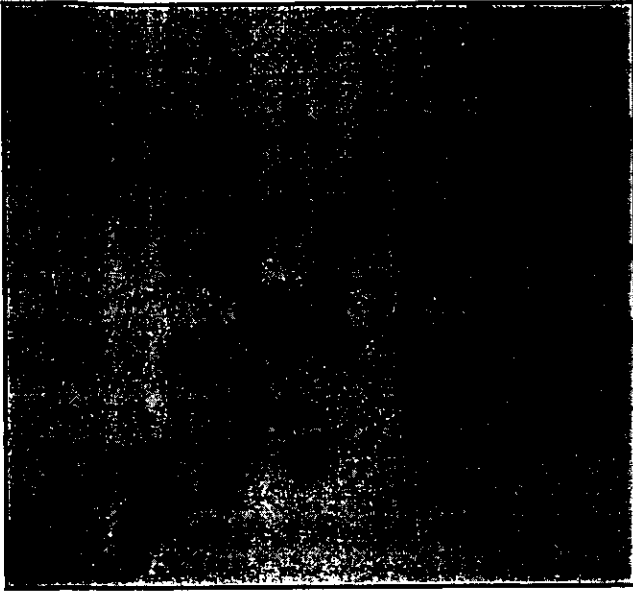
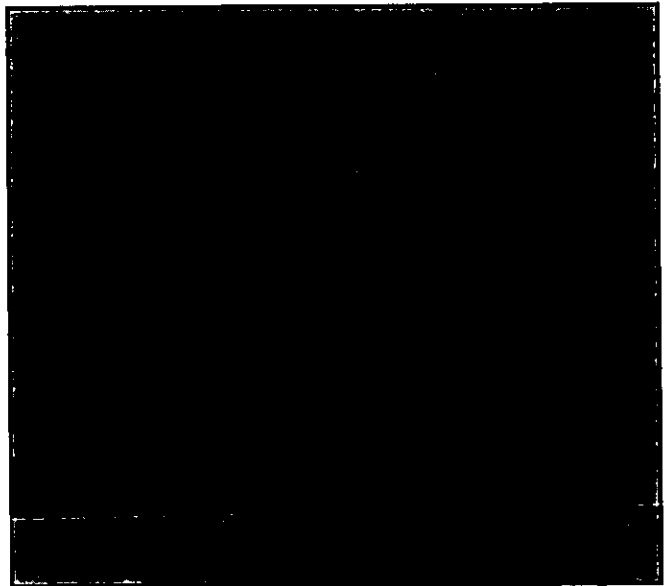


Foto 11. Cultivos de Fibroblastos de Médula Ósea Normal en el día cero. Microscopio Invertido 20X

Foto 12 Cultivos de Fibroblastos de médula ósea de pacientes con Linfoma en el día cero. Microscopio Invertido. 10X.



1. RESUMEN

Los linfomas son enfermedades neoplásicas de las células linfoides, que generalmente se originan en los ganglios linfáticos. Durante los dos últimas décadas, ha habido un considerable progreso en la caracterización de las alteraciones cromosómicas y a nivel molecular. Hasta la fecha, la función y composición del sistema hematopoyético en este grupo de neoplasias todavía no ha sido plenamente entendido. En este estudio nosotros hemos caracterizado la proliferación de las células progenitoras de Médula ósea en diez pacientes con Linfoma difuso de células grandes (LDCG) y caracterizando la proliferación de las células en cultivos a largo plazo. Este estudio se ha extendido en la composición del microambiente hematopoyético de esta enfermedad hematológica. Todos los pacientes incluidos estuvieron dentro de los parámetros hematológicos normales en sangre periférica, tanto antes como después de la quimioterapia, sin embargo, las alteraciones tanto en el microambiente hematopoyético como en las células progenitoras. Comparando con las muestras control, las muestras provenientes de los pacientes con linfoma presentaron una reducción del 35 % en el número de las células progenitoras en los tres linajes mieloide, eritroide y los progenitores pluripotenciales. La proliferación *in vitro* de estas células fue también deficiente, desde sus niveles en cultivos líquidos de médula ósea a largo plazo también fue deficiente comparándolos con la médula ósea normal. Los progenitores fibroblásticos se encontraron reducidos más del 50% y esto lo podemos correlacionar con una deficiente capa de las células adherentes desarrolladas en los cultivos a largo plazo. También observamos una reducción de la producción de las citocinas que se producen en el sobrenadante como son Stem Cell factor e IL-6. Interesantemente, las alteraciones que encontramos en los pacientes con la enfermedad activa no fueron corregidas por la quimioterapia, tanto el estroma como la proliferación de las células progenitoras se encontraron más abatidas que en enfermedad activa. En este estudio nosotros hemos encontrado deficiencias significativas en la composición y función en el sistema hematopoyético en pacientes con LDCG, tanto en enfermedad activa como en remisión completa. Las alteraciones observadas después de un periodo largo de tiempo (desde 6 a 12 meses) las alteraciones se prolongan (¿quizá de manera permanente?) sobre los componentes de la médula ósea (por ejemplo en las

células estromales). Hasta este momento, sin embargo, no se conoce el origen de las alteraciones hematopoyéticas en esta neoplasia hematológica. Posiblemente las células del linfoma están implicadas en tales alteraciones como puede ser la secreción de citocinas que inhiben el crecimiento de las células progenitoras normales o citocinas que actúan sobre las células del estroma modificando el patrón de la producción de sus citocinas.

Palabras clave: Médula ósea, hematopoyesis, In Vitro, Linfoma, progenitores, Estroma medular.

1. ABSTRACT

Lymphomas are neoplastic diseases of lymphoid cells, which usually originate in the lymph nodes. During the last two decades, significant progress has been made in the characterization of chromosomal and molecular alterations in these in this group of hematological disorder is still no fully understood. In the present study, we have determined the progenitor cell content in 10 patients with diffuse large cell Lymphoma (DLCL) and characterized the proliferation of these cells in long term marrow cultures. We have also addressed some issues regarding the composition and function of the hematopoietic microenvironment in this malignancy. All the patients included in this study showed normal hematological parameter in peripheral blood, both before and after chemotherapy, however, significant hematopoietic alterations were consistently observed. As compared to normal subjects, lymphoma patients showed a 35% reduction in progenitor cell numbers, including myeloid, erythroid and multipotent progenitors. The in vitro were significantly lower than those observed in normal bone marrow cultures. Fibroblastic progenitors were reduce by >50% and this correlated with a deficient adherent cell layer development in culture. A reduction was also seen in the levels in culture supernatant of the stimulatory cytokines Stem Cell Factor and Interleukin-6. Interestingly, all the hematopoietic alteration mentioned above were still present in patients at complete clinical remission after the composition and function of the hematopoietic system in patients with a diffuse large cell alterations observed in the latter situation may be due to prolonged (permanent?) effects of chemotherapy on Bone Marrow elements (e.g., stromal cells). At this moment, however, we do not know the origin of the hematopoietic alteration occurring during active disease. Possibly, the lymphoma cells are implicated in such alteration by secreting cytokines the inhibit the growth of normal progenitor cells or cytokines that act on stromal cells modifying their cytokine production pattern. Studies are in progress to address the issues.

Keywords: Bone marrow; hematopoiesis; in Vitro; Lymphoma; Progenitors; Stroma

2. INTRODUCCION

La hematopoyesis es un proceso complejo que se lleva a cabo, sin interrupción desde las primeras etapas del desarrollo embrionario siendo el saco vitelino el primer órgano hematopoyético; posteriormente el hígado y el bazo son los principales órganos hematopoyéticos. A partir del sexto mes de desarrollo se lleva a cabo en la médula ósea, hasta la muerte del individuo. En cada uno de estos órganos las células hematopoyéticas se desarrollan en un ambiente específico denominado microambiente hematopoyético. La célula seminal hematopoyética tiene la capacidad de auto-renovarse y de dar lugar a las células progenitoras pluripotenciales tanto del linaje linfóide como mieloide y estas a su vez dan lugar a las diferentes líneas de diferenciación. Los progenitores pluripotenciales tienen una ligera capacidad de auto-renovación y una alta capacidad de proliferación. Los progenitores tienen la capacidad de formar colonias en cultivos semisólidos.

El microambiente hematopoyético de la médula ósea está constituido por las células del estroma medular, las células accesorias y sus productos (citocinas y la matriz extracelular). Los distintos componentes del microambiente hematopoyético interactúan con las células hematopoyéticas, a través de diferentes mecanismos: a) contacto directo de célula a célula, (entre las células del estroma y las células hematopoyéticas) b) a través de la producción de citocinas, que pueden ser estimuladoras o inhibidoras y c) a través de la producción de las moléculas que forman la matriz extracelular (colágena, fibronectina, laminina, proteoglicanos etc.) Así pues, el microambiente hematopoyético en su conjunto, proporciona las condiciones necesarias para que la hematopoyesis se lleve a cabo de manera controlada.

Alteraciones dentro del microambiente hematopoyético y/o alteraciones en las mismas células progenitoras hematopoyéticas podrían estar involucradas en el desarrollo y progresión de enfermedades hematológicas. Varios estudios *in vitro* han demostrado anormalidades funcionales en el microambiente hematopoyético y/o en las células hematopoyéticas de ciertas hemopatías. Por ejemplo en leucemia mielocítica crónica y aguda, leucemia linfoblástica, etc.

Por otro lado, la gran mayoría de las neoplasias hematológicas son tratadas con quimioterapia. Estos agentes interfieren en los procesos de replicación del DNA, algunos interfieren en la mitosis y otros inhiben la síntesis de proteínas. Sin embargo, estas drogas antineoplásicas no solo afectan a las células neoplásicas sino que también pueden afectar a células normales que se encuentran proliferando. Hay algunas evidencias que estos agentes químicos pueden alterar la hematopoyesis a través de ciertos efectos sobre el microambiente hematopoyético. En el linfoma que es una neoplasia hematológica de un grupo heterogéneo de células B y T/NK, no existen suficientes estudios acerca de la integridad funcional del sistema hematopoyético. El tratamiento por excelencia en pacientes con linfoma es la quimioterapia.

Los objetivos de este trabajo fueron la caracterización del sistema hematopoyético a nivel medular en pacientes con linfoma difuso de células grandes y evaluar la repercusión del tratamiento de esta neoplasia tanto en el estroma medular como en los progenitores hematopoyéticos, una vez que han alcanzado la remisión completa.

3. ANTECEDENTES

3.1 EL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

3.1.1. Biología y Origen de las Células de la Sangre

La hematopoyesis es el proceso en el cual las células de la sangre se desarrollan. Este tejido presenta muchos tipos celulares con funciones muy diversas, que abarcan desde el transporte de oxígeno hasta la producción de anticuerpos. Algunas de estas funciones celulares tienen lugar en el sistema vascular, mientras otras células utilizan dicho sistema como medio de transporte, llevando a cabo su función en otro sitio. Sin embargo, todas las células sanguíneas presentan similitudes en su ciclo vital. Todas ellas tienen una vida de duración limitada, por ejemplo, desde unas cuantas horas como los granulocitos, o de tres a cuatro meses como los eritrocitos. Todas se producen de forma continua a lo largo de la vida. En una persona sana, los niveles de células sanguíneas permanecen prácticamente constantes durante la etapa adulta, lo que quiere decir que para compensar la pérdida diaria de estas células, el organismo produce 5×10^{12} eritrocitos, 3×10^{11} plaquetas y 7×10^{10} granulocitos Tabla 1.

Tabla 1

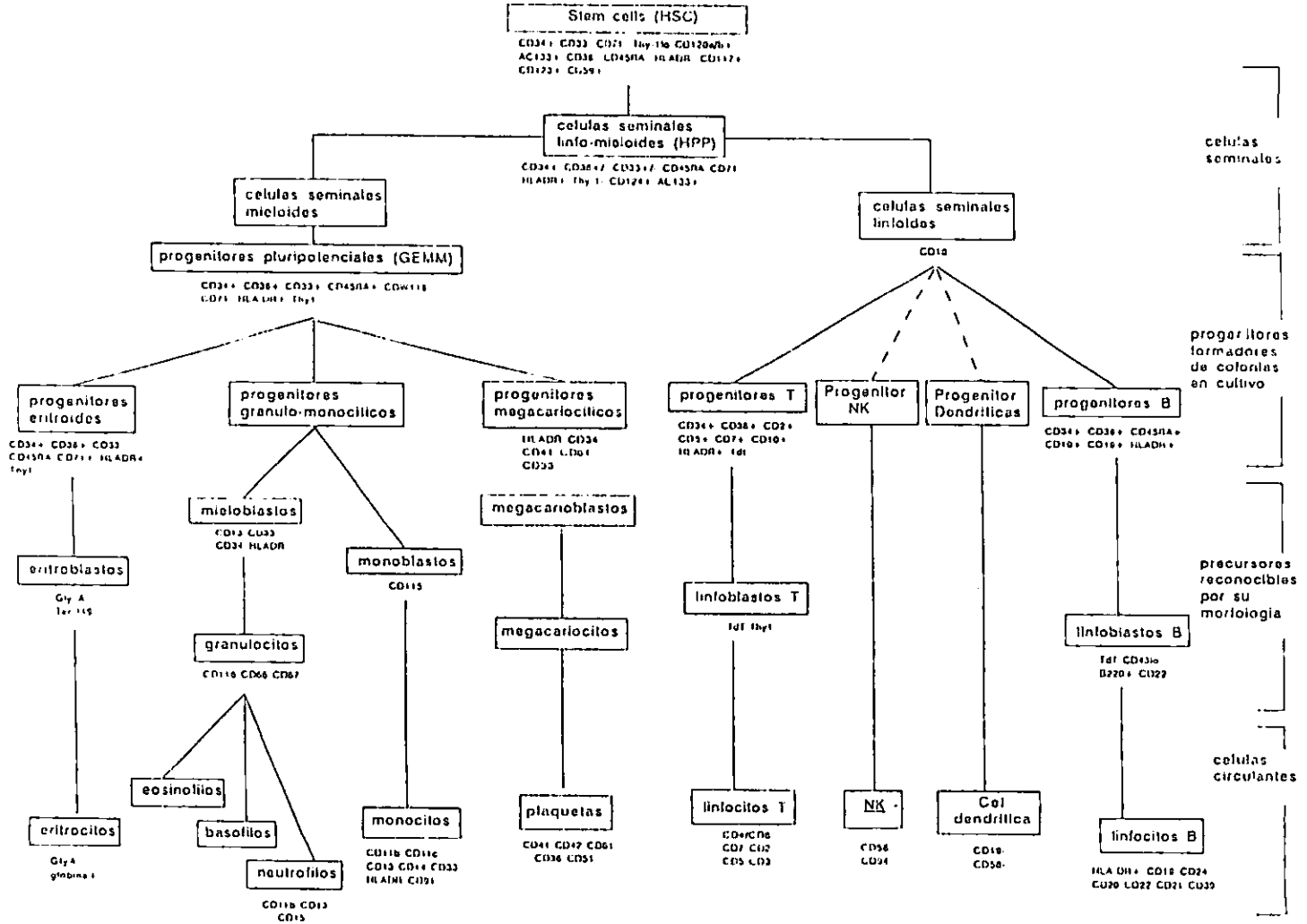
Tipo Celular (cél/litro)	Funciones Principales	Concentraciones
Eritrocitos	Transportan oxígeno y CO ₂	5 x 10 ¹²
Leucocitos		
<i>Granulocitos</i>		
Neutrófilos	Fagocitan y destruyen bacterias invasoras	5 x 10 ⁹
Eosinófilos	Destruyen parásitos y modulan respuestas inflamatorias de tipo alérgico	2 x 10 ⁸
Basófilos	liberan histamina y serotonina en ciertas reacciones inmunitarias	4 x 10 ⁷
<i>Monocitos</i>		
	Se convierten en macrófagos en los tejidos fagocitosis y digestión de microorganismos invasores cuerpos extraños y células envejecidas	4 x 10 ⁸
<i>Linfocitos</i>		
Células B	Producen Anticuerpos	2 x 10 ⁹
Células T	Matan células infectadas por virus y regulan la actividad de otros leucocitos	1 x 10 ⁹
Cél. Aseinas (natural Killer)	Matan células infectadas por virus y algunas células tumorales	1 x 10 ⁸
Plaquetas	Inician el proceso de coagulación	3 x 10 ¹¹

El cuerpo humano contiene alrededor de 5 litros de sangre que supone un 7% del peso del cuerpo. Los eritrocitos constituyen alrededor de un 45% de este volumen y los leucocitos alrededor de un 1% y el 54% de plasma sanguíneo líquido.

Sin embargo, la característica más notable es que todas ellas se generan en último término, a partir de una sola célula, denominada célula madre o célula seminal hematopoyética (CSH). La célula seminal hematopoyética tiene la capacidad de **auto-renovarse**, de dar lugar a las diferentes **líneas de diferenciación** y de **restablecer** el sistema hematopoyético en un huésped previamente radiado. Till J.E., 1961 Dexter T.M 1987, Golde, D.W 1991 Weiss L. 1988, Zucker M.B. 1980. Cada una de las células hijas, puede estar comprometida a una de las vías alternas de diferenciación que dirige la producción de uno o más linajes de las células de la sangre, o bien permanecer como lo que conocemos como CSH. Una vía involucra varios ciclos de la división celular y le siguen diferentes fases. En cada fase, las células adquieren progresivamente características del tipo celular maduro, al mismo tiempo que van perdiendo la capacidad para formar otras células. En las células maduras o diferenciadas la capacidad de replicación y auto-renovación se

pierde totalmente. La diferenciación, proliferación y maduración de estas células ha sido motivo de una gran lista de trabajos. Se podría decir que la organización estructural del sistema hematopoyético se clasifica en cuatro compartimentos. El 1er compartimento incluye a las células seminales que constituyen una población celular heterogénea con capacidad de auto-renovación y a su vez de dar lugar a otras células con la capacidad de originar células seminales tanto de tipo linfóide como mielóide (la estirpe mielóide incluye los linajes eritroide, granulomonocítico y megacariocítico). En cuanto a su inmunofenotipo, las CSH, expresan el antígeno **CD34**, presente en la superficie de la membrana, y no expresan otro tipo de proteínas (marcadores de superficie de membrana), como puede ser la proteína CD38, por lo que a las CSH se les conoce como CD34⁺ CD38⁻. [Esta molécula, CD34⁺, es una del gran número de proteínas que son conocidas con las iniciales CD de *cluster of differentiation*; (esta nomenclatura de CD fue originalmente desarrollada para las proteínas de membrana o complejos de proteínas que podrían ser identificadas por sus propiedades físicas, tales como el peso molecular o por otras características, pero cuyas funciones biológicas de muchas de ellas, aún se desconoce)]. El 2do compartimento incluye a las células progenitoras pluripotenciales con una ligera capacidad de auto-renovación y una alta capacidad de proliferación, capaces de formar colonias en cultivos semisólidos. Las células progenitoras pluripotenciales de la estirpe mielóide dan lugar a progenitores comprometidos a una estirpe particular (eritroide, granulocítica, monocítica y megacariocítica). Por otra parte, las células pluripotenciales linfoides dan lugar a progenitores linfoides de las células B, T y NK (de *natural killer*). Estos últimos progenitores poseen una gran capacidad proliferativa, sin embargo, no son capaces de mantener la hematopoyesis en cultivos *in vitro* a largo plazo, ni de restablecer la hematopoyesis *in vivo* Le Bien T. 1997. El 3er compartimento incluye a los precursores reconocibles por su morfología, éstos corresponden a la población de blastos en distintos estadios de maduración y, finalmente el cuarto compartimento contiene a las células maduras que se encuentran en circulación Dexter T M 1987, Till JE et al. 1964.

En la figura 1 está representada la organización estructural del sistema hematopoyético. Se mencionan los antígenos de superficie que presentan estas células y algunas de las citocinas que interactúan con ellas.



La hematopoyesis en medula ósea es controlada a través de: 1) mantener disponibles los depósitos de CSH; 2) regular la proliferación y diferenciación de las células comprometidas de las distintas líneas hematopoyéticas en todas las fases y; 3) modular la actividad de cada una de las vías en respuesta a las demandas fisiológicas. En la hematopoyesis intervienen un grupo de macromoléculas de superficie celular, conocidas como moléculas de adhesión, que permiten a los diferentes tipos celulares, adherirse a otras células o a la matriz extracelular (ME). Entre los tipos de moléculas de adhesión que se encuentran en las células progenitoras hematopoyéticas están: las integrinas, las selectinas y varias formas de CD44 (receptores para la matriz extracelular). Cada una de estas moléculas reconoce y se une a un ligando específico que está presente en cualquiera de las células del estroma o en la ME. También veremos como la regulación es alcanzada a través de las interacciones físicas de las células hematopoyéticas con otras células y con otros factores solubles o moléculas.

3.1.2 Microambiente Hematopoyético:

Todas las células del sistema hematopoyético, se desarrollan desde las primeras semanas del período embrionario. Como ya se mencionó, el saco vitelino es el primer órgano hematopoyético Metcalf and Moore 1971, Tavassoli 1991. A partir del tercer mes de gestación, la mayor parte de la producción de las células hematopoyéticas ocurre en el hígado fetal y desde el sexto mes se lleva a cabo en la médula ósea, siendo éste el principal órgano hematopoyético hasta la muerte del individuo. En cada uno de los órganos hematopoyéticos, las células sanguíneas pueden sobrevivir, proliferar y diferenciarse solo si se desarrollan dentro de un ambiente específico denominado Microambiente Hematopoyético (MH), constituido por diferentes tipos de células: macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y adipocitos. Las células reticulares son el principal componente de la médula ósea y hay dos tipos: las células adventicias y fibroblásticas. Las células reticulares adventicias están localizadas alrededor del sinusoides venoso formando una capa que parcialmente cubre el endotelio. Estudios morfológicos indican que su principal papel es la regulación de la migración de las células maduras de la médula ósea a circulación Shaklai M. 1989. Las células fibroblásticas presentan

procesos citoplasmáticos involucrados en la maduración de las células hematopoyéticas. Los macrófagos forman el segundo componente del estroma de la médula. Se encuentran en tres diferentes sitios en la médula como macrófagos centrales en las islas eritroblásticas; macrófagos perisiniales, sobre el lado abluminal del endotelio y dispersos entre el desarrollo de las células hematopoyéticas *Shakli M. 1989*. Las células endoteliales y adipocitos también forman parte de los principales componentes del estroma medular. Las células endoteliales son el tipo celular primario que forman los vasos de la médula. Los adipocitos por otra parte ocupan la mayoría de la cavidad de la médula en los mamíferos adultos. Su papel en la hematopoyesis todavía no está claro, aunque estudios *in vitro* sugieren que son capaces de producir factores hematopoyéticos *Lanotte M., et al. 1982*. También forman parte del MH los linfocitos T y los monocitos, que son conocidas como células accesorias, ya que son transitorias en la médula ósea. Los productos de estas células como son las citocinas y la matriz extracelular, son también parte del MH. *Figura 2.*

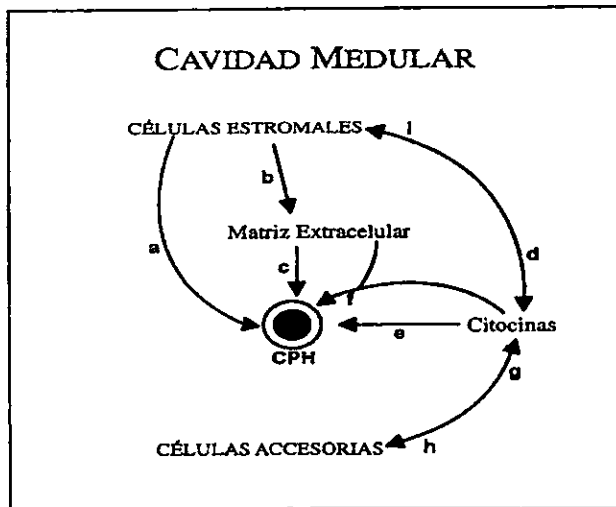


Figura 2. Representación Esquemática de los diferentes componentes del microambiente hematopoyético y las interacciones celulares: CPH: Células Progenitoras Hematopoyéticas. Las células accesorias (linfocitos T y monocitos) no se encuentran dentro de la cavidad medular de manera estable, son células transitorias.

Las células del microambiente hematopoyético regulan la hematopoyesis, de una manera positiva o negativa, por diferentes mecanismos, ya sea por contacto directo, de célula a célula, o secretando moléculas reguladoras que influyen en las células hematopoyéticas ^{Mayani H et al 1992}.

Generalmente se piensa que la hematopoyesis se lleva a cabo en un ambiente acuoso, dinámico, donde las células responden principalmente a factores solubles como las citocinas, sin embargo, la médula ósea es un tejido donde las diferentes células hematopoyéticas se desarrollan físicamente en sitios específicos. Este microambiente se hace visible en cortes histológicos de la médula ósea que revela nichos, donde cada *locus* favorece la producción particular de un tipo celular o estirpe: la eritropoyesis, mielopoyesis, etc. Dentro de cada microambiente, las células entran en contacto con otras células y diversas moléculas que forman la matriz extracelular y facilitan grandemente la división y diferenciación celular. Las principales proteínas que forman parte de la Matriz Extracelular son la colágena, laminina, fibronectina y proteoglicanos. Figura 3.

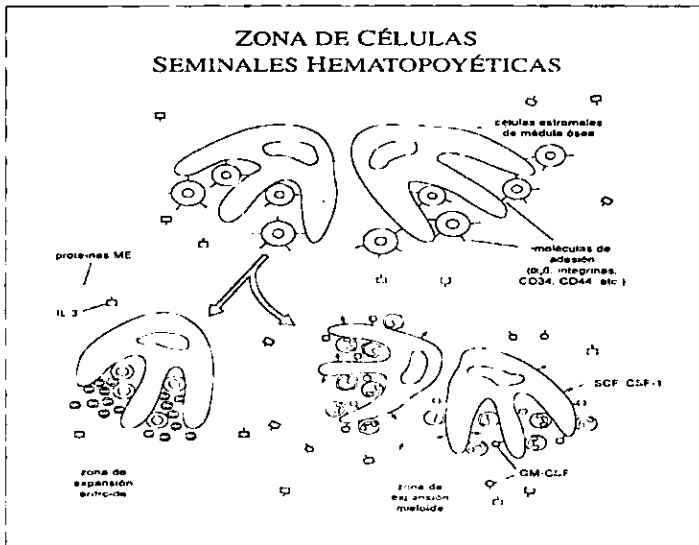


Figura 3. Microambiente Hematopoyético que favorece las diferentes zonas de expansión mielóide o eritroide.

Interacciones entre las células hematopoyéticas y las células del estroma:

Como ya se mencionó anteriormente, las células del estroma pueden interactuar con las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) por contacto directo ó también pueden producir proteínas que constituyen la matriz extracelular, que a su vez pueden interactuar con las células hematopoyéticas. Por otra parte, las células del estroma también son fuente de citocinas, las cuales pueden permanecer como moléculas asociadas a las células y ser presentadas a las CPH durante la interacción directa o quizá ser secretadas y actuar sobre su célula blanco. Las citocinas también pueden asociarse a la matriz extracelular y ser presentadas a las CPH. Las células accesorias LT y monocitos influyen en la hematopoyesis por la producción de citocinas. Las células del estroma y las células accesorias no solamente producen citocinas sino también son reguladas por ellas

Mayuni H et al ,1992,

La proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas normales, así como las células malignas, son reguladas por diversas glicoproteínas o citocinas Vrhovac R. et al., 1993, Stef CA et al., 1987. Han sido identificadas cerca de 30 citocinas. Un gran número de ellas puede influir en el crecimiento de las células seminales hematopoyéticas y en las células progenitoras hematopoyéticas Silvennoinen MD 1996. Debido a que éstas pueden inducir la producción o liberación de otras citocinas, se vuelve muy complejo el identificar la actividad hematopoyética *in vivo* de estas proteínas. Se conocen varias citocinas que actúan sobre las células seminales o CPH muy tempranas, que inducen a que salgan de la fase G₀ del ciclo celular. En contraste, existen otras citocinas que actúan solamente sobre progenitores ya comprometidos a una determinada línea de diferenciación. Funcionalmente, algunas citocinas aumentan la actividad de las células maduras.

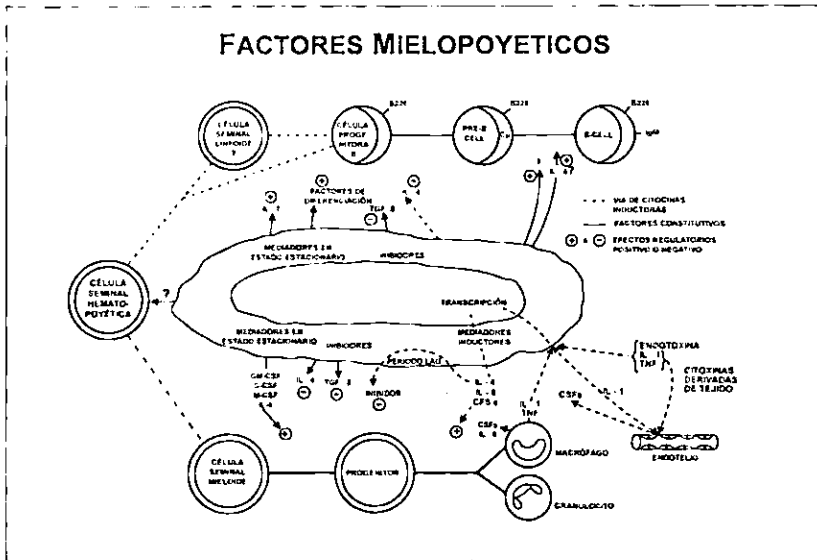


Figura 4. Factores que intervienen en la Hematopoyesis tanto estimuladores como inhibidores.

3.1.3. Citocinas Hematopoyéticas:

Aquellas citocinas que tienen como función primaria, regular la diferenciación y proliferación de las células de la sangre, son conocidas como citocinas hematopoyéticas. Así la hematopoyesis es regulada, al menos en parte, a través de la acción opuesta de citocinas estimuladoras e inhibitorias.

La familia de citocinas hematopoyéticas con efecto estimulatorio sobre los progenitores hematopoyéticos incluyendo los factores estimuladores de colonias, son: el factor de células seminales: SCF (de *Stem Cell Factor*, también llamado ligando de *c-kit*, o *steel factor*), ligando de FLT-3 (FL), Factor estimulador de colonias de Macrófagos: M-CSF (de *Macrophage-Colony Stimulating Factor*), Factor estimulador de Granulocitos: (G-CSF), Factor estimulador granulo-monocítico, (GM-CSF), Eritropoyetina, (Epo), factor inhibitorio de Leucemia: LIF (de *Leukemia inhibitory factor*) y trombopoyetina, (Tpo) Jacobsen SEW 1996, Moore MAS 1991, Ogawa M. 1993, Metcalf D 1993 de Sauvage FJ 1994 así como una batería de interleucinas (IL) 2,3,4,5,6,7,9,11,12,13,15 Silvennoinen MD 1996. Las citocinas con un efecto

predominantemente inhibitorio sobre los progenitores hematopoyéticos *in vitro* incluyen al Factor Transformante del Crecimiento tipo beta: (TGF- β de *Transforming Growth factor- β*), Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α de *Tumor Necrosis Factor- α* ,), Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α de *Macrophage inflammatory Protein-1 α*), y el Interferón Gama (IFN γ). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias estas citocinas también pueden estimular directamente el crecimiento de progenitores hematopoyéticos Keiser JR 1991, 1992, Broxmeyer HE, 1989, Caus C. 1990, 1992, Williams DE 1990. (Se describirán solo aquellas citocinas que intervienen más directamente en el linaje mieloide)

Factor de Células seminales (SCF)

El SCF es producido por las células del estroma, preferencialmente por los fibroblastos. Se conocen dos isoformas, una proteína soluble y otra proteína unida a membrana. Estas dos formas de SCF resultan de la escisión (*alternative splicing*) del DNA resultando dos proteínas una de 248 aminoácidos (SCF²⁴⁸) y otra de 220 aminoácidos (SCF²²⁰). SCF²⁴⁸ es fracturado en el dominio extracelular para dar la forma soluble que consiste en una proteína de 165 aminoácidos. SCF nativo es un dímero de 45 KDa Mc Niece and Brndel 1996. SCF ha sido identificado como un regulador esencial para la hematopoyesis. Es relativamente selectivo para las células progenitoras hematopoyéticas más primitivas Williams DE et al 1990, Zsebo KM 1990, Huang E. 1990, aunque también se ha establecido que SCF tiene un pequeño efecto estimulador sobre los progenitores comprometidos al linaje eritroide, mieloide y los mastocitos Gali SJ. 1994, tanto en la médula ósea como en sangre periférica.

En cultivos en agar con médula ósea de ratón, SCF estimula la formación de colonias de neutrofilos. En cultivos líquidos a largo plazo, genera poblaciones puras de células cebadas. Sin embargo, el principal efecto estimulador de SCF es en combinación con otros factores de crecimiento. Se obtiene un aumento sinérgico en el número de colonias, cuando se adiciona SCF y CSF u otras interleucinas McNiece IK1991, Williams 1992 Bernstein 1991 Ulich K 1991 a,b. Por ejemplo: SCF + G-CSF y/o SCF + M-CSF estimulan el linaje mieloide principalmente de granulocitos y de monocitos respectivamente. En presencia de GM-CSF, estimula principalmente a colonias de tipo gránulo-monocitos: CFU-GM (de *Colony forming units-*

granulocyte/macrophage). Las colonias producidas en presencia de SCF junto con otros factores de crecimiento son más numerosas y con mayor número de células. SCF + Epo estimulan la formación de progenitores eritroides muy primitivos (BFU-E). SCF + Tpo estimulan la formación de Progenitores de Megacariocitos (CFU-Meg) Hunt 1994. SCF + IL-7 actúan sobre los precursores primitivos de células B y T McNiece IK1991 b, Namen 1991. Se conoce que los mecanismos de acción de SCF son a través de su receptor *c-kit* que es un receptor con actividad tirosina-cinasa. SCF + IL-6 estimula la formación de progenitores muy primitivos como las HPP-CFC (de *High proliferative potential-colony forming cell*) Williams 1992. SCF + IL-3 estimulan la formación de progenitores maduros como CFU-GM. Se ha demostrado que un cocktail de citocinas expande a las células maduras aproximadamente 100 veces más que la combinación de 1 o 2 citocinas y a nivel de los progenitores granulomonocítico aproximadamente 20 veces o más. En definitiva la presencia de SCF es esencial para una expansión óptima Mc Niece 1991a.

flt-3/flk-2-Ligando FL (Ligando del receptor de una tirosin cinasa con homología al receptor de M-CSF (c-fms)

FL es de las últimas citocinas identificadas. Es un miembro de las superfamilias de receptores de la clase III de tirosin cinasa Rosnet O. 1996 , Zeigler P. 1994 Birg F. 1992. Solo se encuentra la expresión de Flt-3/Flk-2 en las células progenitoras hematopoyéticas muy primitivas. Aunque el rango de su actividad no ha sido establecido en detalle, se ha visto que muestra una gran homología con SCF a través de su receptor tirosin cinasa Ashman LK. 1991, Buhring H.J. 1991 y con el receptor de *c-fms* Sherr C.J. 1985. El ligando de Flt-3/Flk-2 ha sido recientemente clonado Lyman SD 1993 y 1994. Aunque no se ha establecido en detalle, si se ha demostrado que cuando FL actúa sólo, es un débil estimulador, sin embargo, al igual que SCF puede sinergizar con múltiples factores de crecimiento (CSFs, SCF, IL-6, IL-11 e IL-12), para realzar el crecimiento y expansión de las células progenitores hematopoyéticas muy primitivas Veiby et al 1996, Jacobsen et al. 1996. Hay varias evidencias donde FL, puede estimular el crecimiento de las células progenitoras, en particular aquellas células con un potencial linfóide B Hannum C. 1994, Huamaya F. 1995, lo que sugiere que puede ser un estimulador temprano de la linfopoyesis. Se ha demostrado que los efectos de

FL pueden ser completamente abolidos por TGF- β mientras que TNF- α potencialmente promueve los efectos de esta citocina en células Lin⁻Sca.1⁺ Jacobsen F&W 1996.

Familia de citocinas IL-3

La subfamilia de citocinas hematopoyéticas de IL-3 representan los principales estimuladores de las células progenitoras hematopoyéticas mieloides, aunque también regulan la función de las células maduras. La familia de IL-3 incluye a IL-3, IL-5 y el factor estimulador de colonias granulo-monocitos (GM-CSF). Todas ellas tienen una subunidad β_c con un receptor común. Debido a la similitud en la actividad biológica de G-CSF (granulocitos), también se presentará en este grupo.

Interleucina 3

La producción de interleucina 3 está restringida a las células Th, de ambos tipos 1 y 2 Ihle JN 1990. IL-3 tiene la capacidad de estimular el crecimiento y diferenciación de las células hematopoyéticas pluripotenciales, para dar lugar a los diferentes linajes. Las células mieloides representan su principal blanco y tiene una actividad limitada en los progenitores ya comprometidos Ihle JN 1990. Todos estos efectos son mediados, al menos en parte, a través de la regulación de la expresión de su receptor (IL-3R). También actúa sinérgicamente con IL-1, IL-6, SCF y G-CSF para estimular la proliferación de las células pluripotenciales. IL-3 en combinación con Epo, IL-5, o G-CSF aumenta el desarrollo de los linajes eritroide, eosinófilo y neutrófilo respectivamente Ihle J.N. 1983.

Factor Estimulador de Colonias de Granulo-monocitos (GM-CSF).

Fue el primero de los factores que fue purificado y caracterizado, se le nombró GM-CSF debido a su capacidad de promover el crecimiento y diferenciación de los linajes de granulocitos y monocitos Burgess AW. 1977. Lee P. 1985. GM-CSF es producido por las células Th, por los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales Grant SM 1992. GM-CSF estimula la proliferación y maduración de las células mieloides en la médula ósea y en sangre periférica. También tiene efecto sobre precursores de megacariocitos y eritroblastos. GM-CSF actúa

fisiológicamente en conjunto con otros factores de crecimiento tales como SCF, IL-3 y G-CSF. Esta actividad es mediada por receptores que no son tirosin cinasa, los cuales están unidos por una sub-unidad- α (que une al ligando) y que se une con la sub-unidad β , requerida para la transducción de señales. Es un receptor de alta afinidad Sakamoto KM. 1994. La porción intra-citoplasmática de la sub-unidad alfa es esencial para la transducción de señales y para la estimulación del ciclo celular Polotskaya A. 1994. Estos efectos de GM-CSF sobre el ciclo celular de las células blanco son complejos y todavía no están plenamente entendidos, pero se sabe que aumenta la fracción de la fase S del ciclo celular de las células progenitoras mieloides durante el tiempo en el que sea expuesto Broxmeyer HE. 1988, Aglietta M 1989, Vadhan Raj S. 1992.

Interleucina 5 (IL-5)

IL-5 primero fue identificada como factor sustituyente de células T (TRF del inglés *T-cell Replacing Factor*) Schimpl A 1972. IL-5 es producida por las células Th y mastocitos. Es un factor de diferenciación de las células B. Su actividad no está restringida a las células B, por el contrario, la principal función de IL-5 está relacionada con las reacciones alérgicas e inflamatorias mediadas por eosinófilos y basófilos. Estimula selectivamente la formación de colonias de eosinófilos regulando su proliferación y activación Takatsu 1980, 1994.

Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF.)

Biológicamente es el mas cercanamente relacionado a IL-3, IL-5 y GM-CSF aunque su receptor no pertenece a la sub-familia de IL-3R β c. Es producido por las células estromales en la médula ósea, por lo macrófagos, las células Th, las células endoteliales y fibroblastos. La principal función de G-CSF es inducir la proliferación, diferenciación y activación neutrofílica y granulocítica.

Familia de citocinas de IL-6

La subfamilia de citocinas de IL-6, la forman IL-11, IL-12, Oncostatin M (OSM) factor inhibitorio de leucemia (LIF), Cardiotrofina 1 (CT-1) Akira S. 1993. Clonando la cadena del receptor que traduce la señal de IL-6, se encontró que es una glicoproteína de peso molecular de 130, conocida como gp130, que está

involucrada en la señalización de las citocinas antes mencionadas, por lo que es más conocida como la sub-familia gp130. (Sólo se mencionan y se anexa un cuadro de la familia de IL-6 pero no son de importancia para este estudio).

Tabla 2:

Familia de IL-6

Citocina	PM KDa	aa	Localización Cromosómica	Producida por	Efecto Principal
IL-6	21-28	184	7p14-21	monocitos Th2	Dif. y actividad de cél B. hematopoyesis.
IL-11	23	178	19q13	Cél del estroma	Igual a IL-6, pero no Tiene efecto sobre cél. T
LIF	25	182	22q12	Fibroblastos	Inhibición de la dif.
OSM	28	196	22q12	Monocitos Células T	Igual a LIF
CT-1	21	203		Casi todas las células	prolif. de los miocitos cardiacos, igual IL-6
IL-12	70 dimerico				Diferenciación Th1, CTL activación de CTL y NK, inhibición de Th2

Interleucina 6 (IL-6)

Es una citocina pleiotrópica que actúa en la diferenciación de células B, en reacciones de fase aguda y en hematopoyesis. Es producida por un gran número de células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, células mieloides y células T. Su producción es estimulada en respuesta a reacciones *stress* e infecciones bacterianas. Se descubrió en 1980, recibiendo diferentes nombres conforme a las células donde fue descubierta y/o su función: *Interferon β2*: IFNβ2, *B cell Differentiation Factor*: BCDF, *B-Cell stimulatory Factor-2* (BSF-2), *Hepatocyte Stimulating Factor*: HSF, *Macrophage Granulocyte inducing Factor 2*, a MGI-2A, etc. Sé clonó en 1986 y recibió el nombre de IL-6 ^{Hirano T 1985, 1986, 1990}. Es una citocina que actúa de manera sinérgica. IL-6 en combinación con otras citocinas estimula diferentes progenitores, por ejemplo en combinación con IL-3 induce la

proliferación en los progenitores hematopoyéticos pluripotenciales. En combinación con M-CSF induce la producción de CFU-M y con GM-CSF incrementa las CFU-mieloides en general ^{Akira S 1993}.

Varias citocinas promueven el crecimiento de células malignas *in vitro* y por eso se cree que contribuyen a la agresividad de la enfermedad. Dentro de ellas se encuentra la IL-6, la cual estimula el crecimiento de las células de mieloma múltiple ^{Gauldie J 1987}. Las células neoplásicas de pacientes con linfoma no Hodgkin (LNH) contienen altas concentraciones de IL-6 ^{Kato H 1996}. En pacientes con linfoma de alto grado de células B, los inmunoblastos malignos expresan IL-6, que podría actuar como factor de crecimiento en algunas formas de esta enfermedad ^{Emile D 1992}. IL-6 afecta la patogénesis de varias enfermedades por mecanismos autocrinos y paracrinos ^{Kishimoto T 1989}.

Citocinas con Receptor de una sola sub-unidad

Aunque los efectos biológicos de eritropoyetina y trombopoyetina, son muy diferentes, los podemos agrupar desde el punto de vista de sus receptores ya que ambos tienen una cadena sencilla.

Eritropoyetina (Epo).

Es el principal regulador de la producción de las células rojas. Se encuentra en muy bajas concentraciones en circulación. Epo es producida casi exclusivamente por el riñón (y a muy bajas concentraciones en el hígado). La producción de esta hormona es regulada por la concentración de oxígeno y/o una disminución del número de eritrocitos, lo que estimula a las células del riñón a sintetizar y segregar mayores cantidades de eritropoyetina hacia la circulación sanguínea ^{Krantz SB. 1991}.

Cuando la Epo es secretada, actúa sobre progenitores eritroides maduros (CFU-E), pero no actúa sobre los progenitores más primitivos (BFU-E). Las células eritroides, son prácticamente las únicas células blanco para eritropoyetina, aunque existen reportes que también tiene un efecto estimulador sobre los megacariocitos

^{Silvennoinen O 1996. Wu H 1995}.

Trombopoyetina.

Es un factor que estimula el desarrollo de megacariocitos (precursores de plaquetas) provocando un aumento en el número de plaquetas circulantes de una manera análoga a la eritropoyetina en la estimulación de precursores eritroides.

El receptor de la trombopoyetina (*Mpl*) es el producto del gen *c-mpl*, el homólogo normal del oncogen *v-mpl*. El receptor *Mpl* fue la llave para la identificación de la trombopoyetina, la cual fue clonada en 1994 de Sauvage F J et al 1994., Lok S., et al 1994, Bartley T.D. 1994 Miyazaki H., et al 1994, Kutter D J et al 1994. Con oligonucleótidos antisentidos de *c-mpl*, se inhibe la capacidad de formar colonias de progenitores de megacariocitos Mehta N., et al 1993 y en ratones *knockout* deficientes en *c-mpl* se reduce el 85% de las plaquetas circulantes. El receptor *Mpl*, muestra una secuencia conservada y de características similares a los miembros de la superfamilia de las citocinas hematopoyéticas. Una secuencia con actividad cinasa es encontrada en el dominio citoplasmático del receptor. El dominio intracelular del receptor *Mpl* consiste en dos dominios distintos que interactúan por diferentes vías en la transducción de señales. Uno es por vía *Ras* y el otro es por vía de la activación de *JAK2* cinasa y subsecuentemente la activación de la proteína *STAT* Nagata Y. 1997. La actividad hematopoyética de la *Tpo* es difícil de definir, se conoce que es un regulador primario de la producción de megacariocitos y plaquetas. Se sabe que hay múltiples citocinas con actividad trombopoyética que intervienen en la diferenciación y proliferación. Recientes estudios en ratones deficientes en *c-mpl* demostraron una severa alteración en la hematopoyesis temprana Ramsfjell V. 1997, lo que sugiere que no sólo interviene en la proliferación y diferenciación de las células comprometidas a los megacarioblastos o células maduras (plaquetas), sino que también intervienen en la proliferación de células muy primitivas.

Inhibidores.

Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α)

TNF- α es una citocina con actividad pleiotrópica. Fue inicialmente identificada en animales como un factor responsable de fiebre, anorexia y caquexia. Otras múltiples actividades se le han atribuido a esta citocina que juega un papel

importante en la respuesta inflamatoria e inmune Beutler 1992. TNF- α exhibe una actividad citotóxica frente a ciertas células tumorales y también contribuye a la regulación de la hematopoyesis Tracey K. 1994. Los efectos biológicos son mediados a través de la interacción de un trimero con dos tipos de receptores (tipo I, p55 y tipo II p75, son dos receptores membranales que traducen la señal de la citocina a la célula blanco) Beutler & Hufferl 1994. También se ha reportado que TNF- α promueve el crecimiento de las células peludas leucémicas y de las células linfocíticas leucémicas, ambos tumores derivados de las células B Cordingley 1988, Digel 1989. Los niveles de TNF- α , están significativamente asociados, con los tumores de alto grado Tracey K 1994. TNF- α y su receptor (R-TNF- α) están asociados con altos niveles de LDH y β -2- microglobulina. La actividad biológica del TNF- α incluye la supresión de la hematopoyesis y particularmente de la eritropoyesis *in vitro*. TNF- α y su receptor son miembros de la gran familia de los receptores de superficie celular y el ligando está implicado en el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. TNF- α juega un papel en linfopoyesis e inmunopoyesis. Es producida principalmente por los macrófagos.

Factor Transformante del Crecimiento-beta (TGF- β)

El factor transformante del crecimiento, se identificó por inducir reversiblemente la transformación fenotípica de líneas celulares de fibroblastos. La detección inicial de la actividad de TGF- β sugirió la transformación maligna celular que provocaba este factor y del desarrollo de tumores. Ahora se conoce que ejerce una multiplicidad de actividades biológicas sobre la mayoría de las células, tanto normales como transformadas y regula muchos de los procesos fisiológicos. La respuesta biológica de TGF- β es compleja y depende del tipo celular y de las condiciones fisiológicas. Se puede decir que es un regulador bidireccional de las células progenitoras hematopoyéticas en donde puede inhibir o estimular su crecimiento Keller JR 1988, 1991, 1992. Se clonó en 1985 Derynck et al 1985. Existen tres isoformas conocidas como TGF- β_1 , Derynck et al 1985, TGF- β_2 Martin et al 1987, TGF- β_3 , Derynck et al 1988; ten Dyke et al 1988. El proceso de secreción también es muy complejo. Debido a las tres isoformas que existen, unos segmentos precursores inducen la secreción

de este factor, sin embargo, una vez secretado el pro-segmento mantiene a TGF- β en un complejo latente maduro y activo previendo la interacción con sus receptores Miyazono et al 1988 Wakefield et al 1988. Es indudable que deben existir diferentes mecanismos muy importantes que estratégicamente mantengan inactivo a este complejo hasta ser requerido en el sitio de acción. TGF- β interactúa con receptores de superficie celular para inducir sus actividades biológicas Massague 1992, Lin and Lodish 1993. TGF- β activa receptores que son proteínas serina/treonina cinasas. Se conoce que 6 polipéptidos están involucrados en la transducción de señales.

Interferon Gamma IFN- γ

Pertenece a la familia de interferón tipo II. Es una glicoproteína homodimérica de 21-24 kD. Es producida por las células T CD4⁺ y CD8⁺ y por las *natural killer*. La transcripción es directamente iniciada como una consecuencia de la activación del antígeno y es aumentada por IL-2 e IL-12. IFN- γ frente a células tumorales activa parcialmente a los macrófagos para matar a las células tumorales.

3.1.4 Enfermedades Hematológicas en el Sistema Hematopoyético:

Por lo mencionado anteriormente, es preciso tomar en cuenta que son muchos los factores que intervienen en la diferenciación y la maduración de las células hematopoyéticas. Cada linaje constituye un espectro continuo celular y en cada uno de los pasos de maduración, la célula puede sufrir una alteración, dando lugar a una neoplasia. Contando con todos los avances biológicos, inmunológicos, moleculares y patológicos, se pueden definir algunas de las enfermedades hematológicas y predecir el sitio donde éstas se inician. Por ejemplo en la leucemia mielocítica crónica y la leucemia linfoblástica, se sabe que hay alteraciones al nivel de las células seminales; en los síndromes mielodisplásicos, policitemia vera y trombocitemia es posible que la alteración se lleve a cabo en las células pluripotenciales; en las leucemias mieloblásticas agudas, es al nivel de los precursores mieloides comprometidos; en la leucemia prolinfocítica y el linfoma la alteración parece llevarse a cabo en precursores linfoides comprometidos.

La organización mundial de la salud (*WHO, World Health Organization*), ha propuesto una clasificación de enfermedades hematológicas, estratificadas de acuerdo con su linaje: a) neoplasias linfoides antes y después del trasplante, b) células cebadas, c) neoplasias histiociticos d) neoplasias mieloides y, e) variantes y subtipos de diversos neoplasias. Las Tablas siguientes representan las principales neoplasias hematopoyéticas.

Tabla 3

Neoplasias Linfoides.

Neoplasias de células B

Neoplasmas de precursores de células B.

Precursor de Células B. Leucemia linfoblástica/linfoma (precursor de células B leucemia linfoblástica Aguda)

Neoplasmas de Células B maduras (periférica)

Leucemia linfocítica crónica de célula B/ linfoma linfocítica de células Pequeñas

Leucemia prolinfocítica de células B

Linfoma linfoplasmacítico

Linfoma de células B de zona marginal del bazo

Leucemia de células peludas

Mieloma de células plasmáticas/plasmacitoma

Linfoma de células B en la zona marginal extraganglionar, tipo MALT (de *mucosa-associated lymphoid tissue*, tejido linfóide asociado a mucosa)

Linfoma de células B en la zona marginal ganglionar

Linfoma folicular

Linfoma de células de manto

Linfoma difuso de células B grandes

Linfoma de células B grandes mediastinal

Linfoma de fusión primaria

Linfoma de Burkitt/ Linfoma de células Burkitt

Neoplasmas de células T y Natural Killer

Neoplasmas de precursores de células T

Precursor de Células T. Linfoma linfoblástico/leucemia (precursor de células T, Leucemia linfoblástica aguda)

Neoplasmas de Células T maduras (periférica)

Leucemia prolinfocítica de células T

Leucemia linfocítica granular de células T

Leucemia de células *Natural Killer* agresivo

Linfoma de células T, adultos/Leucemia (HTLV-1, de *Human T-cell Leucemia virus*, Virus de

Leucemia de células T de humano.

Linfoma de células T/NK extraganglionar

Linfoma de células T. Tipo enteropatía

Linfoma de células T, gama-delta, hepatoesplénica.

Linfoma de células T, igual a subcutáneas paniculitis

Micosis fungoides/Síndrome Sezary

Linfoma de células T grandes anaplásicas/ células *null*, tipo cutáneo primaria

Linfoma de células T periférica, (*no caracterizada de otra manera*)

Linfoma de células T, angioinmunoblástica

Linfoma de células T grandes anaplásicas/ células *null*. Tipo sistémico primaria.

Linfoma Hodgkin (Enfermedad de Hodgkin)

Linfoma Hodgkin, ganglionar, predominantemente linfocítico

Linfoma Hodgkin clásico

Linfoma de Hodgkin, esclerosis ganglionar

Linfoma de Hodgkin clásico, linfocítico

Linfoma de Hodgkin de celularidad mixta

Linfoma de Hodgkin con depleción linfocítica

Categoría de Enfermedades Linfoproliferativas Post-Transplante (ELPT)

Lesiones tempranas

- Hiperplasia plasmática Reactiva
- Infecciones igual a mononucleosis

ELPT, polimórfica

Policlonal (raro)

Monoclonal

ELPT, monomorfica

Linfoma de células B

Linfoma Difuso de células B grandes (inmunoblástico, centroblástico, anaplásico)

Linfoma de Burkitt/ Linfoma igual a Burkitt

Mieloma de células plasmáticas

Linfoma de células T

Linfoma de células T.

Otros tipos (Hepatoesplénico, gama-delta, T/NK)

Otros Tipos raros

Lesiones iguales a la enfermedad de Hodgkin (Asociado con Metotrexate)

Lesiones iguales a plasmacitoma.

Enfermedades de Células Cebadas

Mastocitosis cutánea

Enfermedad Sistémica de células cebadas

Enfermedad Sistémica de células cebadas con Enfermedades Hematológicas Asociadas.

Leucemia de células Cebadas/Sarcoma

Neoplasias de Histiocíticas y Células Dendríticas

Neoplasmas histiocíticos /macrófagos

Sarcoma histiocítico

Neoplasmas de células Dendríticas

Histiocitosis de Células de Langerhans

Sarcoma de Células Langerhans

Sarcoma de Células Dendríticas

Sarcoma de Células Dendríticas Foliculares/Tumor

Sarcoma de Células Dendríticas no específicos.

Leucemias Linfoides Agudas

Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores de Células B

t(9;22)(p34;q11) BCR/ABL

t(v;11q23); rearrreglo MLL

t(1;19) E2A/PBX1

t(12;21) ETV/CBF-alpha

Leucemia Linfoblástica Aguda de Precursores de Células T

Leucemia de Células Burkitt

Linfoma Folicular y Células de Manto: Grados y Variantes

Linfoma Folicular

Grado 1, 2, 3

Variantes: Linfoma Centro Folicular Cutánea

Linfoma Centro Folicular Difuso

Grado 1, 2

Linfoma de células de manto

Variante: Blastoide

Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCG): Variantes Morfológicas y Subtipos

Variantes Morfológicas

- Centrobásticas
- Inmunoblásticas
- Células T/Histiocíticas
- Tipo Granulomatosis linfomatoide
- Células B Grandes Anaplásicas
- Plasmoblásticas

Subtipos

- Linfoma de Células B Grandes Mediastinales, (Tímicas)
- Linfoma de Efusión Primaria
- Linfoma de células B Grandes Intravascular.

Linfoma de Burkitt. Variantes Morfológicas y Subtipos

Enfermedades de Células Plasmáticas: Variantes y Subtipos

Enfermedades Inmunosecretorias (Manifestaciones clínicas de diversos neoplasmas linfoides)

Neoplasias de Células T, Tipos de Leucemia diseminadas: Variantes

Neoplasias de Células T, Tipos Extraganglionar primaria: Variantes y Subtipos

Neoplasias de Células T Periféricas: Predominantemente ganglionar: Variantes

Categorías Propuestas de Enfermedades Malignas no clasificadas:

- Enfermedad Maligna, no clasificable
- Neoplasia mieloides, no clasificable
 - Enfermedades Mieloproliferativas, no clasificable
 - Síndrome Mielodisplásico, no clasificable
 - Leucemia Mieloides Aguda, no clasificable
- Neoplasia Linfoides/Linfoma, no clasificable
 - Linfoma de Células B, no clasificable
 - Linfoma de Células T, no clasificable
 - Enfermedad de Hodgkin, no clasificable
- Neoplasia histiocítica, no clasificable

Clasificación de Neoplasias Mieloides

Enfermedades Mieloproliferativas

- Leucemia Mielogena crónica (Cromosoma Philadelphia)
- Leucemia neutrofila crónica
- Leucemia eosinofila crónica/síndrome hipereosinofílico
- Mielofibrosis idiopática crónica
- Policitemia Vera
- Trombocitemia esencial
- Enfermedades Mieloproliferativas, no clasificable

Enfermedades Mielodisplásicas/mieloproliferativas

- Leucemia Mielomonocítica Crónica
- Leucemia Mielogena atípica crónica
- Leucemia Mielomonocítica juvenil

Síndromes Mielodisplásicos

- Anemia Refractaria: con y sin sideroblastos
- Citopenia refractaria con displasia en todos los linajes
- Anemia refractaria con exceso de blastos (síndrome 5 q-)
- Síndrome mielodisplásico no clasificable

Leucemia Mielóide Aguda (LMA)

- LMA con translocación citogenética recurrente
 - LMA con t(8;21)
 - Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)
 - LMA con eosinófilos anormales en médula ósea inv 16(p13q22) o t(16;16)(p13;q23)
 - LMA con 11q23
- LMA con displasia en todos los linajes
 - Con síndrome mielodisplásico primario
 - Sin síndrome mielodisplásico primario
- LMA y síndromes mielodisplásicos
- Leucemia Mielóide Aguda
 - LMA mínimamente diferenciada
 - LMA sin maduración
 - LMA con maduración
 - Leucemia mielocítica aguda
 - Leucemia monocítica aguda
 - Leucemia eritroide aguda
 - Leucemia megacariocítica aguda
 - Leucemia basofílica aguda
 - Panmielosis aguda con mielofibrosis

Leucemia bifenotípica Aguda

Sin embargo, no se puede poner de relieve que la célula sea la única responsable del evento que provoca la alteración; hay muchos factores que están involucrados en la supervivencia, proliferación y maduración celular, por lo que es difícil esclarecer el problema. Existen fuertes evidencias de que las alteraciones hematopoyéticas no se limitan a las células hematopoyéticas, sino a su microambiente, por ejemplo en leucemia micloblástica existen varios reportes donde las interacciones celulares están alteradas; en linfoma, no solo se justifica con base en la estirpe, sino que también pueden intervenir otros factores, lo que nos sugiere que el microambiente que lo rodea también interviene en el desarrollo de la neoplasia.

El hecho de que las células del microambiente regulan la producción de las células de la sangre sugiere que alteraciones dentro del microambiente hematopoyético pueden ocasionar el desarrollo y progresión de enfermedades hematológicas. Varios estudios *in vitro* han demostrado anomalías funcionales del microambiente hematopoyético en varias hemopatías. Por ejemplo, Bathia, R., *et al.*, 1995, demostraron que en leucemia mieloide crónica el estroma medular tiene una capacidad reducida para sostener el crecimiento normal de progenitores en cultivo. Mayani. y cols, en 1992, demostraron que en leucemia mieloide aguda el microambiente hematopoyético desarrollado en cultivos a largo plazo no tiene la capacidad para sostener la hematopoyesis debido probablemente a la incapacidad de producir y/o responder a M-CSF. También existen otros mecanismos o interacciones que pueden estar alterados. Los estudios de las funciones de los receptores de la ME, en particular de las integrinas β_1 (conocida también como VLA) tiene propiedades fundamentales tales como la transcripción de señales y VLA-4 media la adhesión de célula-célula Kinashi T 1994* y 1994b, Hynes RO 1992. En ausencia de la integrina β_1 existen daños en la migración de las CSH y no pueden colonizar a otros órganos Hirsch 1996. A diferencia de las neoplasias anteriores, el linfoma es una enfermedad de la que poco se sabe en cuanto a su sistema hematopoyético. De aquí nuestro interés en el estudio de esta entidad nosológica.

3.2 GENERALIDADES DE LINFOMA

El linfoma es un grupo heterogéneo de enfermedades de las células B y T, que generalmente se originan en los ganglios linfáticos, pero que se pueden originar en otros órganos del cuerpo por ejemplo, en el bazo, en el tracto gastrointestinal, en la piel, etc. Previamente se refería a esta neoplasia como linfosarcoma, ó linfoma folicular y/o linfoma difuso gigante. Posteriormente, con la formulación operativa de los linfomas (*working formulation*), en 1982 se le empezó a nombrar como Linfoma Maligno o Linfoma No Hodgkin (LNH), actualmente se le conoce como linfoma.

Factores Pronósticos:

Existen varios factores pronósticos adversos, dentro de los que se pueden citar: a) la edad: pacientes mayores de 60 años (tienen una supervivencia más pobre, quizá esto se deba a una menor tolerancia a las drogas quimioterapéuticas); b) dos o más sitios extra-ganglionares, particularmente, en el sistema nervioso central; c) niveles elevados de la deshidrogenasa láctica en suero, d) masa tumoral mayor de 10 cm; e) anormalidades cromosómicas no al azar y por último, f) el subtipo histológico, -que es un factor pronóstico importante-. Tabla 4.

Tabla 4

Factores Pronóstico en Linfoma:		
	Hombre	Mujer
Edad	<60 años	> 60 años
Sitios extranganglionares	< 1	> 1
Masa tumoral	< 10 cm	> 10 cm
LDH	Normal	Incrementada
Hb	baja	baja
Inmunofenotipo	B	T
Involucrado el bazo	no	si
Médula Ósea involucrada	no	si

3.2.1 Etiología:

Diversos agentes ambientales y alteraciones genéticas heredadas podrían participar en la producción de anomalías cromosómicas que se encuentran en el linfoma maligno. Se piensa que ciertas mutaciones, translocaciones, deleciones y sustituciones de pares de bases llevan a la transformación de células malignas. La figura 4 representa un esquema hipotético de la diferenciación linfocítica, donde se muestra la localización anatómica de las diferentes fases de diferenciación de las células B y T.

No existen pruebas concluyentes de qué es lo que ocasiona esta neoplasia. En un principio se creyó que era algún factor endémico, ya que se comprobó la existencia de un cinturón de linfoma en Africa Ecuatorial donde se asociaba a temperaturas, lluvias y altitud. Más tarde se comprobó que correlacionaba con el paludismo endémico; posteriormente, Epstein, Barr, y Achong encontraron partículas virales en las células tumorales derivadas de los pacientes con linfoma ^{Epstein 1979}, sin embargo se ha visto que el virus de Epstein Barr (EBV) es trófico para las células B, induce su proliferación y diferenciación siendo el responsable de la mononucleosis infecciosa. También se asocia al virus de leucemia de células T de humano HTLV (del inglés *human T-cell lymphocyte virus*).

En la década de los setenta se detectó un defecto citogenético y posteriormente se definió la translocación citogenética (8;14). Otros trabajos de genética molecular revelaron que esta translocación yuxtapone el oncogen *myc* del cromosoma 8. A la fecha se han encontrado varias translocaciones y oncogenes involucrados.

3.2.2 Epidemiología:

Su distribución es variable, predominando en los hombres (1.5-3.5:1) Aunque en los países desarrollados los linfomas representan alrededor del 10% de los carcinomas pediátricos, (ocupan el tercer lugar después de las leucemias agudas y los tumores cerebrales), son más comunes en los adultos y su incidencia se incrementa conforme a la edad.

3.2.4 Citogenética y Estudios Moleculares

El análisis citogenético de las neoplasias linfoides, revela translocaciones no al azar que tienden a involucrar los *loci* cromosómicos de los genes Ig y los receptores de las células T (TCR de *T cell Receptor*) y en algunos casos se pueden asociar a oncogenes (Tabla 5).

Tabla 5

Alteración citogenética	Histología	Locí Génicos	Oncogenes
Linfomas de Células B.			
t(8 ;14)(q24 ;q32)	De células pequeñas hendidas	IgH	myc
t(2 ;8)(p11-12 ;q24)	células grandes	IgL	
t(8 ;22)(q24 ;q11)		IgK	
t(14 ;18)(q32 ;q21)	células grandes	IgH	bcl-2
t(11 ;14)(q24 ;q32)	L. de zona de manto	IgH	bcl-1
trisomía 12 , Anomalia 11q, 14q	Linfocito de células pequeñas de células grandes	IgH	bcl-3
t(3 ;22)(q32 ;q13 1)	Difuso de células grandes	IgL	
Otras			
trisomía 7			
anomalías 1q21-23			
anomalías 6q21-25			
Linfomas de Células T.			
t(7 ;9)(q34-36 ;q32)	Linfoma Linfoblástico	RCT-β	tcl-4
t(8 ;14)	Linfoma variable	RCT-β	myc-c
Otras			
t(7 ;7)			
trisomía3			
delección6(p21 ;p23)			

Las alteraciones cromosómicas más frecuentes son las translocaciones: t(8 ;14)(24q ;q32), muy común en el linfoma de células B pequeñas no hendidas McKeithen T.W 1990, Rosenberg SA 1982, así como en el linfoma difuso de células grandes McKeithan TW 1990, Levine EG 1990; la t(14 ;18)(q32 ;q21) común en el linfoma de células B folicular Richardson MF 1987, la t(11 ;14)(q13,q32), frecuente en el linfoma de células intermedias Pelucci PG 1986 y la t(3 ;22) que es menos frecuente. También se ha

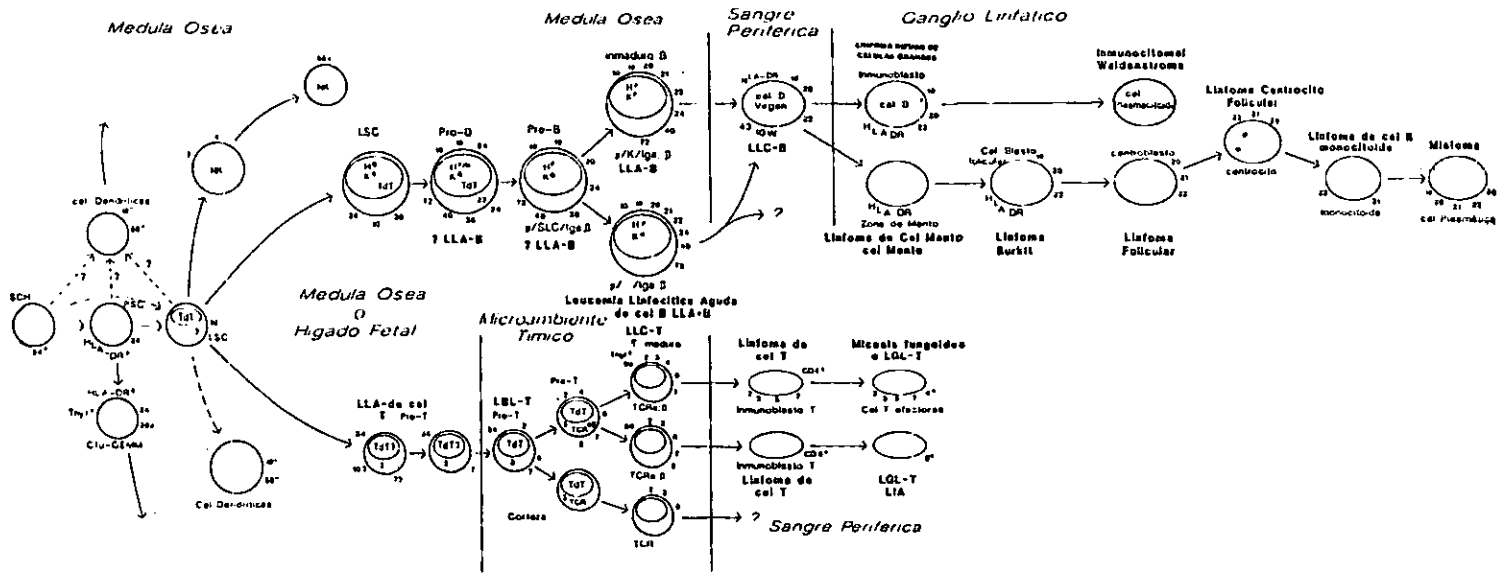
observado trisomía 12 en el linfoma linfocítico de células pequeñas. La translocación t(14;18) -que dirigió los estudios para el descubrimiento de la familia del gen bcl-2- da como resultado la expresión aumentada del proto-oncogene Bcl-2. La familia del gen bcl-2 desregula la respuesta celular de una amplia variedad de estímulos que inducen la muerte celular, incluyendo la privación de factores de crecimiento, glucocorticoides y agentes quimioterapéuticos. Los antagonistas de la muerte celular (dentro de los cuales se encuentran BCL-2, BCL-X_L, MCL y A1), proveen protección celular, mientras que los agonistas de la muerte celular (incluyen BAX, BAK, BAD, y BCL-X_S) aumentan la sensibilidad para inducir las señales apoptóticas. Recientemente se ha identificado la capacidad de la familia de bcl-2 para formar homodímeros o heterodímeros. Esta relación entre los agonistas y antagonistas determinan la susceptibilidad para estimular la apoptosis ^{Yang E. 1996}. Se ha determinado la expresión de la proteína Bax en linfoma difuso de células grandes y se ha visto que la relación de las proteínas Bcl-2-Bax es significativamente superior para el linfoma indolente que para el linfoma agresivo. Esto sugiere que la expresión de bax y bcl-2 puede estar relacionada con el comportamiento biológico de los linfomas.

3.2.5 Clasificación:

Una de las áreas más críticas del estudio de los linfomas, pero también de las más confusas y controvertidas, es su clasificación. A mediados del siglo XX, Rappaport ideó un sistema para la clasificación de estas neoplasias, basado en el patrón de crecimiento (difuso o folicular) y su citología (indiferenciada, bien diferenciada, poco diferenciada e histiocítica) ^{Rappaport 1956, 1966}. Posteriormente, en la década de los 70, Lukes y Collins (USA) y Kiel (Alemania) lo clasificaron de acuerdo con su estirpe linfoide y con la inmunotipificación. En 1982 Rosenberg en un intento de unificar términos entre patólogos y clínicos propuso la formulación operativa (*Working Formulation*), agrupándolos, de acuerdo al riesgo clínico, en grado bajo, intermedio, alto y otros ^{Rosenberg 1982}, y de diferentes estadios, (esta clasificación, sin embargo, tiene la desventaja que no distingue entre las células B y T). A pesar de todo, dominó la clasificación de Kiel en Europa mientras que la

Working Formulation fue el sistema de clasificación para América. Posteriormente, con un mejor conocimiento del sistema inmune y de las anormalidades genéticas asociadas, se ha mejorado la identificación de los distintos tipos de linfoma. En diciembre de 1999 la organización mundial de la salud realizó una nueva clasificación de diversas enfermedades hematopoyéticas y del tejido linfoide. Esta clasificación, del grupo internacional del Linfoma, identifica clínicamente los distintos tipos de linfoma. Tabla 3.

En la figura 5 se muestra la diferenciación celular que va sufriendo la célula desde la célula seminal.



La figura 5 representa un esquema hipotético de la diferenciación celular a partir de la célula seminal hematopoyética (stem cell hematopoietic SCH), enfocada a la estirpe linfóide, tanto en el ambiente medular como en el microambiente tímico y en ganglio linfático.

3.2.6 Tratamiento:

El tratamiento por excelencia en pacientes con linfoma es la quimioterapia. En ella, se emplean diferentes agentes terapéuticos que interfieren en los procesos celulares. Dichos agentes se pueden clasificar en cinco grandes grupos: 1. Los agentes alquilantes. 2. Los alcaloides de la vinca. 3. Las antraciclinas. 4. Los antimetabolitos. 5. Otros

1. Los Agentes alquilantes:

Forman parte de este grupo: Ciclofosfamida, Mostaza Nitrogenada, Ifosfamida, Clorambucil, Busulfán, Melfalán, Nitrosoureas.

Sitio de acción en el Ciclo Celular y su Mecanismo

Son agentes inespecíficos, de la clase I, es decir que atacan cualquier fase del ciclo celular. El anillo de los agentes alquilantes tiene un ion imonio etileno (-N-CH₂CH₂-)⁺ donde el carbono terminal se une al DNA. Son compuestos altamente reactivos, estos agentes interfieren con la síntesis de DNA porque forman uniones covalentes con los ácidos nucleicos. Generan iones de carbono que reaccionan con moléculas nucleofílicas como el DNA, proteínas y nucleótidos. Por lo general el punto principal de acción es la guanosina del DNA, pero otros miembros de la familia provocan alquilación en otras regiones. El resultado final de estos fenómenos es la producción de ligaduras cruzadas dentro y entre las hélices del DNA, provocando inactivación e inhibiendo la replicación produciendo un evento letal. Aunque el espectro antineoplásico de todos los alquilantes es similar, difieren en su aplicación. Algunos como la mecloretamina y la ifosfamida solo se aplican por vía parenteral; otros pueden ser indistintamente por vía oral o parenteral.

Principales Neoplasias hematológicas donde se aplican los Agentes Alquilantes:

La ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo son más útiles en diferentes neoplasias, ^{Colvin M 1981}, en altas dosis, en el tratamiento de las diferentes enfermedades hematológicas como el linfoma maligno, la Enfermedad de Hodgkin,

leucemia, mieloma múltiple, De Vita VT 1970, Alexanian R 1977, Skarin A A 1977, Muggja 1977. La toxicidad de la ciclofosfamida es similar a la de otros alquilantes; produce mielosupresión, principalmente leucopenia y en menor medida trombocitopenia. Esta es una de las principales limitantes colaterales que tiene este fármaco.

2. Los Alcaloides de la Vinca:

Son compuestos naturales o semi-sintéticos derivados de la planta *Catharanthus roseus*. Se han identificado muchos alcaloides de la vinca, sin embargo, desde el punto de vista clínico, solamente tres de ellos han sido aprobados para su uso en los E.U.A.: Vincristina (VCR), Vinblastina (VBL) y vindesine (VDS).

Fórmula Química

Estas moléculas consisten en dos unidades multianilladas, donde un núcleo corresponde al indol (*catharanthine*) y el otro núcleo al dihidroindol (*vindoline*). VCR y VBL son estructuralmente idénticos excepto por la sustitución en el núcleo de vindoline, donde VCR posee un grupo formil a diferencia de VBL que tiene un grupo metil. Esta pequeña diferencia química, les confiere gran diversidad en su espectro antitumoral y tóxico. VCR forma parte esencial para los regímenes de quimioterapia en las leucemias linfoides agudas y juega un papel importante en la Enfermedad de Hodgkin y los linfomas.

Sitio de acción en el Ciclo Celular y su Mecanismo

Son inhibidores mitóticos. El principal mecanismo de acción de los alcaloides de la vinca es la interrupción del ensamblaje de los microtubulos, tanto del citoplasma como los que forman el huso mitótico. Esto hace que causen alteraciones, tanto en las células tumorales como en células normales, en la fase G1 y/o en la fase S del ciclo celular. Esto no es de sorprender ya que los microtubulos están involucrados en muchas funciones no mitóticas. Estos agentes se fijan a la tubulina en un sitio que parece ser diferente al sitio de unión de los taxanes, colchicina, epidofilotoxina y GTP. Estas uniones pueden ser: a) de alta afinidad: interrumpen el proceso de los microtúbulos modificando el equilibrio

dinámico, b) de baja afinidad: inducen un *despliegue* de los microtúbulos para formar un agregado en forma de espiral. El efecto citotóxico de los alcaloides de la vinca se debe a que induce un arresto en la metafase, alterando la dinámica de los microtúbulos al finalizar el huso mitótico.

3. Antibióticos antitumorales :

La fermentación microbiana permite obtener diversos compuestos antitumorales, incluyendo la bleomicina, actinomicina D y mitramicina. La actividad antineoplásica de estas sustancias llevó al desarrollo de análogos sintéticos menos tóxicos, como son las antraciclinas: doxorubicina, daunorubicina e idarubicina.

Doxorubicina	OCH ₃	H	OH	OH
Dunorubicina	OCH ₃	H	H	OH
Idarubicina	H	H	OH	H
Epirubicina				

Sitio de acción en el Ciclo Celular y su Mecanismo de acción.

Su campo de acción es muy amplio, actúan en Fase G1, S y en la frontera de G2.

Mecanismo de acción: Se intercalan entre los pares de bases del DNA. Inhiben a la topoisomerasa II que es la responsable para la modulación de la estructura tridimensional del DNA y determina el super-enrollamiento. La citotoxicidad resulta de dos de los mecanismos de acción de estos fármacos: por un lado, al bloquear la topoisomerasa II, impiden la reparación de las hélices. Por otra parte, generan radicales superóxido por reducción de un electrón de la molécula de la doxorubicina (adriamicina) Deffe AM 1989.

4. Los Antimetabolitos :

Son agentes fraudulentos, que por la misma similitud de su estructura con intermediarios fisiológicos, son reconocidos como substratos para aquellas reacciones bioquímicas vitales y de esta manera interfieren con los procesos celulares. El primer agente de este tipo al que se le dió aplicación clínica, fue la

aminopterina, un análogo del ácido fólico. Posteriormente, fue reemplazado por la ametopterina o metotrexate (MTX). Actualmente existen nuevos compuestos antifolatos, tales como las diaminopirimidinas y quinazolininas. Entre ellos están 6-Mercaptopurina, Arabinosido de citosina, hidroxiurea, fludarabina pentostatin, y el más reciente Trimetoxate.

El Metotrexate es uno de los antimetabolitos más utilizados en el tratamiento de los pacientes con enfermedades malignas.

Sitio de acción en el Ciclo Celular y su Mecanismo de Acción

Intervienen principalmente en la síntesis del DNA.

Mecanismo de acción: Es un inhibidor que se une a la dihidrofolato reductasa (DHFR), una enzima esencial para el mantenimiento de los depósitos de folato intracelular. Se encuentra en su forma reducida como tetrahidrofolato, que es requerido para la síntesis de timidina 5-monofosfato (timidilato, dTMP), un nucleótido de las purinas. La timidilato sintasa cataliza la formación de dTMP y crea los requerimientos necesarios para mantener la DHFR. Si se bloquea esta vía cesa la producción de timidilato y la síntesis de purinas. El metotrexate, junto con los folatos naturales, se almacena como poliglutamatos metotrexate. Esta transformación del metotrexate incrementa su retención celular y potencia su efecto sobre la DHFR, la timidilato sintetasa y otras enzimas necesarias para la síntesis de los precursores purinicos y pirimidinicos del DNA. La influencia múltiple de los antifólicos, sobre la generación de nucleótidos, lleva a la detención de la producción y fragmentación del DNA y a la muerte celular. En sistemas experimentales, la resistencia a antifolatos resulta de varios mecanismos, como por ejemplo; a) una alteración en el transporte de antifolatos y por lo tanto hay una capacidad disminuida a poliglutamato metotrexate. b) la alteración en las enzimas blanco DHFR, incluyendo el aumento de la expresión de proteínas. La amplificación del gen DHFR es una de las principales formas de resistencia Allegra C.J.

1996.

Principales Neoplasias

Estos análogos de los antifolatos fueron utilizados para inducir remisiones en niños con Leucemias agudas, posteriormente se han utilizado en leucemias en general, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, linfomas, sarcomas osteogénicos, en coriocarcinomas y en algunas enfermedades autoinmunes como la artritis Reumatoide, psoriasis.

5. Otros :

L-asparaginasa.

Las células tumorales de origen linfocítico son incapaces de producir este aminoácido y deben obtenerlo de la circulación. La L-asparaginasa disminuye la asparagina, privando a las células tumorales de este aminoácido, impidiendo la síntesis proteica. Existen algunas evidencias donde las células susceptibles parece que se paran en la fase S del ciclo celular.

Los glucocorticoides, parecen tener el mismo espectro de actividad antitumoral que otros agentes, son útiles en ciertas neoplasias linfoides. Se desconocen los mecanismos de acción, pero afectan tanto a las células que están en proliferación como a aquellas que se encuentran en reposo. Los corticoides por regla general son más eficaces cuando se suman a otras drogas, por ejemplo la ciclofosfamida Abramson 1982.

Procarbazina. Se cree que actúa como los agentes alquilantes, provoca fracturas en el DNA, es dependiente de la dosis y el tiempo.

La prednisona. Este corticoide cuando se utiliza como monofármaco en dosis diarias, es efectivo, sin embargo, es más eficaz en neoplasias cuando se suma a otras drogas. Por ejemplo, cuando se aplica prednisona a los agentes alquilantes incrementa la tasa de respuesta en mielomas y en leucemia linfoblástica aguda. En pacientes pancitopénicos, en estadio preterminal, la prednisona ayuda a aumentar la hemoglobina, los granulocitos, y las plaquetas evitando las transfusiones.

En la década de los 80's se implementó el uso clínico de factores estimuladores de colonias de granulocitos y granulo-monocitos, lo que hizo posible utilizar regímenes

de tratamiento más agresivos lográndose un aumento en el porcentaje de remisiones.

La dexametasona, en dosis altas intermitentes, actúa en sujetos refractarios.

Sin embargo, los mecanismos de resistencia que presenta la célula continúan siendo el principal obstáculo para el uso efectivo de estos agentes en la clínica.

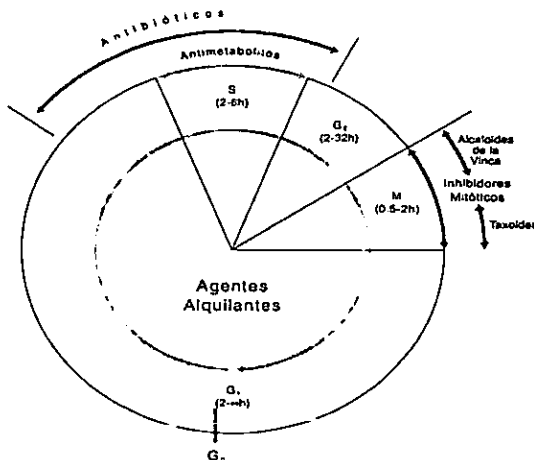
Representación esquemática de la clasificación de los agentes citotóxicos y su sitio de acción en el ciclo celular.

Tabla 6

<i>Agentes Alquilantes</i>	<i>Antimetabolitos</i>	<i>Inhibidores Mitóticos</i>	<i>Antibióticos</i>	<i>Otros</i>
Ciclofosfamida	Metotraxate	Vincristina	bleomicina	Procarbazina
Mostaza Nitrogenada	6-Mercaptopurina	Vinblastina	Actinomicina D	L-asparaginasa
Ifosfamida	Arabinosido de citosina	Vindesina	Mitramicina	Prednisona
Clorambucil	Hidroxiurea	Etoposido	doxorubicina	Dexametasona
Busulfán	Fludarabina	Taxoides	daunorubicina	
Melfalán	Trimetrexato	Navelbine	Idarubicina	

Figura 6.

SITIOS DE ACCIÓN ESPECÍFICOS DE LOS AGENTES CITOTÓXICOS
CICLO CELULAR



4. JUSTIFICACIÓN:

La caracterización de los progenitores hematopoyéticos tanto *in vitro* como *in vivo*, ha sido ampliamente estudiada tanto en condiciones normales como en diferentes neoplasias, principalmente de tipo mielóide. Sin embargo, los reportes, acerca de los progenitores hematopoyéticos de médula ósea, en neoplasias de estirpe linfóide solo se refieren a leucemia linfoblástica aguda ^{Bhavanni et al 1989} y enfermedad de Hodgkin ^{Radford H et al 1990}.

El linfoma puede servir como un modelo biológico para estudiar la relación entre el linaje linfóide y el linaje mielóide, asumiendo, que estos pacientes con enfermedad linfoproliferativa con frecuencia muestran anormalidades tanto cuantitativas como funcionales de los linfocitos B o T. Hasta el momento no existen en la literatura reportes acerca de la estirpe mielóide (incluyendo el linaje eritroide), en este tipo de entidades nosológicas.

Los linfomas son tumores que resultan de la expansión clonal de linfocitos T/NK o B, que son transformados en las diferentes fases de la vía de su proliferación o diferenciación.

Los linfomas se han estudiado ampliamente desde el punto de vista de su etiología, citogenética y tratamiento, sin embargo, no se ha estudiado acerca de la biología y comportamiento de los progenitores del sistema hematopoyético en la médula ósea, aunque se presupone que la hematopoyesis en este órgano es normal.

Como ya se mencionó anteriormente, los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides en el que ya se tienen algunas entidades nosológicas. Nuestro estudio incluyó pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes (LDCG) –entidad clínico patológica más común-, que se origina en las células B. Se incluyeron pacientes menores de 70 años con riesgo clínico de acuerdo al Índice de Pronóstico Internacional IPI, bajo o bajo intermedio, sin infiltración a la médula ósea y en quienes se utilizó quimioterapia estándar sin la administración de factores estimuladores de colonias.

Es factible que al estudiar el LDCG se puedan esclarecer una serie de interrogantes acerca de la integridad biológica del sistema hematopoyético en humanos con trastornos de la línea linfóide, pre y post-quimioterapia.

Con el fin de esclarecer algunos de estos aspectos, en el presente estudio se llevó a cabo la caracterización cuantitativa y funcional de las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) en pacientes con LDCG y el análisis de algunos componentes del microambiente hematopoyético.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el tratamiento por excelencia para esta neoplasia es la quimioterapia, sin embargo, las drogas empleadas son citotóxicas, provocando mielosupresión, por lo que tenemos gran interés en valorar los efectos funcionales post-tratamiento de los progenitores hematopoyéticos de la médula ósea. El linfoma es un modelo que permite valorar a dichos progenitores antes y después de la quimioterapia, una vez que los pacientes han alcanzado la remisión completa.

5. HIPÓTESIS

El Sistema Hematopoyético de pacientes con linfoma difuso de células grandes, se encuentra funcionalmente alterado, tanto en las células progenitoras hematopoyéticas como en algunos componentes del microambiente hematopoyético. Estos pacientes, después de que han recibido el tratamiento con CEOP/bleo y haber alcanzado la remisión completa, el microambiente hematopoyético medular se encuentra abatido, aun después de haberse documentado niveles hematológicos normales en sangre periférica.

6. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el sistema hematopoyético de pacientes con linfoma difuso de células grandes (LDCG) incluyendo a las células progenitoras hematopoyéticas y algunos componentes del microambiente hematopoyético tanto en enfermedad activa como en remisión completa, tratados con el esquema de quimioterapia CEOP/Bleomicina.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los progenitores hematopoyéticos en la Médula ósea de pacientes con LDCG, incluyendo a los diferentes linajes eritroides (CFU-E y BFU-E), mieloides (CFU-G, CFU-M y CFU-GM), y pluripotenciales (CFU-GEMM)

Caracterizar la proliferación celular en cultivos líquidos a largo plazo.

Valorar algunos componentes del estroma medular como son los fibroblastos y macrófagos y la presencia de adipocitos.

Cuantificar la presencia de IL-6, SCF, y TNF- α .

Estudio morfológico de las células a lo largo de los cultivos

Extender este estudio en los mismos pacientes después de la quimioterapia una vez que han alcanzado la remisión completa.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Medios de Cultivos:

Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, del inglés *Iscove's modified Dulbecco's Medium*)

Contiene L-glutamina 25 mM con buffer HEPES -con fenol rojo-, 3.04 g/L de bicarbonato de sodio

Medio de cultivo líquido a largo plazo (LTCM de *Long Term culture medium*), cuyo componentes son los siguientes:

Medio alfa suplementado con 12.5% de suero de caballo, (Contiene dipéptido L-Alanyl-L-Glutamine, Buffer HEPES (*N-2-Hydroxyethylpiperazina N'-2 Ethane Sulfonic Acid*))

12.5% de suero fetal de bovino (FBS),

0.2 mM de inositol,

20mM de ácido fólico,

10^{-4} de 2-Mercaptoetanol,

2 mM de L-glutamina,

Hidrocortisona. 10^{-6} M (Concentración final)

Medio de Cultivo Semisólido de Metil Celulosa. El medio de cultivo consiste en:

0.9% de metil-celulosa,

30% de FBS,

1% de albumina de suero de bovina,

10^{-4} M de 2 Mercaptoetanol,

2 mM L glutamina, complementado con 50ng/mL de rhSCF,

10 ng/mL de rHuIL-3,

10 ng/ mL de rhGM-CSF

3 U/mL de rhEritropoyetina.

Pacientes Incluidos en el estudio

Se estudiaron un grupo de 10 pacientes con LDCG, de edad promedio de 50 años (con valores límite de 48-69 años) Tabla 8.

6 pacientes que recibieron el siguiente esquema de quimioterapia: CEOP/bleo, (Ciclofosfamida 600 mg/m², Epirrubicina 70 mg/m² día 1, Vincristina 1.4 mg/m², día 1 (sin exceder a 2 mg dosis total) y Prednisona 50 mg/m² via oral los días del 1-5 y bleomicina 10 U/m² (día 14) sin exceder 15 U. Este esquema se repitió cada 21 días por seis ciclos.

Muestras de Médula ósea de Pacientes con Linfoma

En este estudio se incluyeron 10 muestras de pacientes con Linfoma Maligno, con los siguientes parámetros a) pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes (LDCG) en enfermedad activa, b) 6 muestras de pacientes que alcanzaron la remisión completa, entre 6-12 meses post-quimioterapia, con los parámetros de laboratorio normales y c) sin el suministro de factores estimuladores de colonias (CSF).

Muestras de Médula Ósea Normal:

Como controles se incluyeron 10 muestras de médula ósea de donadores sanos para trasplante de médula ósea. Las muestras fueron gentilmente proporcionadas por el Hospital de Especialidades, Bernardo Sepúlveda, del CMN S. XXI.

Recolección de las Muestras Medulares:

La médula ósea es semiliquida y puede extraerse por aspiración o biopsia. Pueden realizarse en varios huesos: en la cresta iliaca anterior o posterior, en el esternón a la altura del segundo espacio intercostal, y muy rara vez en la tibia. En estos pacientes se realizó por medio de aspiración en la cresta iliaca postero-superior con un trocar que posea mandril para evitar la obstrucción, con jeringas de 20 mL con 0.1 mL de heparina, bajo anestesia local. Se recolectaron alrededor de 5 a 7 ml de médula ósea.

Procesamiento de las muestras de médula ósea

La obtención de las células mononucleadas tanto de médula ósea normal (MO N) como de LDCG fue mediante un gradiente de ficoll hypaque por centrifugación a 400 g durante 20 minutos ^{Boyum A 1964, 1968} y resuspendidas en IMDM suplementado con 2 % de suero fetal de bovino.

Técnica de Conteo celular.

Una vez obtenidas las células mononucleadas, se realiza una suspensión con el líquido de Turck (causa lisis a los eritrocitos). El procedimiento se realiza utilizando 10 µl de la suspensión y mezclándola perfectamente con 90 µL de líquido de Turck. Se deja reposar aproximadamente tres minutos para que se lleve a cabo la lisis de la serie roja. El recuento de las células mono-nucleadas se determinó utilizando un hemocitómetro, se lee en un microscopio óptico a 10X. Se cuentan todas las células que caigan dentro del campo. La fórmula para el conteo celular utilizando el hemocitómetro es la siguiente:

$$\text{N}^\circ \text{ de Células} = (\text{Vol. De suspensión de la muestra}) (\text{factor de dilución}) (\text{n}^\circ \text{ de células}) (\text{Constante de la Cámara de New Bauer}).$$

La viabilidad se determinó con el colorante azul de Tripán. (El procedimiento es el mismo, aforando a 100 µL de azul de Tripán, solo que en este caso no se deja reposar a las células, la lectura se realiza inmediatamente).

Cultivos de Colonias Hematopoyéticas.

Diferentes poblaciones de células hematopoyéticas pueden desarrollarse en cultivos celulares semisólidos (como puede ser gelatina, agar o metil-celulosa). En estos cultivos, que son altamente enriquecidos se desarrollan diferentes tipos de progenitores hematopoyéticos -mieloides, eritroides y pluripotenciales-, conocidos CFU (de *Colony forming unit*) por su capacidad de formar colonias en cultivo. En este estudio se realizaron cultivos en metil-celulosa (*Stem Cell Technologies, Inc*), para poder llevar a cabo la cuantificación de los progenitores hematopoyéticos. En un tubo eppendorff que contiene 1.3 ml. de metil-celulosa se le adicionan las células mononucleadas de la médula ósea y las células provenientes de los cultivos líquidos a largo plazo tipo Dexter, (D-LTC). Se ajustaron a una concentración final

de 50 000 cél/mL y se agita en vortex para homogeneizar. Se extrae 1 mL con una jeringa con aguja de punta roma estéril y se coloca en cajas petri de 35 mm de diámetro, luego son incubadas a 37°C en 5% de CO₂. Después de 14-17 días de cultivo, las colonias fueron contadas en la misma caja utilizando un microscopio invertido. Las colonias hematopoyéticas fueron clasificadas como se describe en (Mayani H y cols 1992): Unidades formadoras de Colonias pluripotenciales (CFU-Mix por sus siglas en inglés), colonias que contienen tanto células eritroides como mieloides; las colonias mieloides comprenden subpoblaciones puras de granulocitos (CFU-G), colonias puras de Macrófagos (CFU-M), y colonias que contienen granulocitos y macrófagos -bipotenciales-, (CFU-GM).

Finalmente colonias del linaje eritroide: CFU-eritroides (CFU-E) racimos de células eritroides hemoglobinizadas (entre 50-100 células por colonia); BFU-E colonias mayores de 100 células hemoglobinizadas agrupadas en uno o varios racimos.

Cultivos Líquidos a Largo Plazo.

Los cultivos líquidos de médula a largo plazo tipo Dexter (D-LTC del inglés *Long Term-Marrow Cultures*) se establecieron de acuerdo al método descrito por C. Eaves y cols 1991; y Mayani y cols., 1992. Las células mononucleadas se resuspendieron en LTCM, (*Stem Cell Technologies, Inc*) en pozos con un mL de medio. La suspensión celular previamente ajustada a 3×10^6 cél/mL se cultivó en placas de 24 pozos (1ml/pozo) e incubaron a 37°C, en una atmósfera de 5 % de CO₂. A las 72 hr los cultivos fueron transferidos a 33°C. Siete días después de iniciado el cultivo se retiraron 500 µl del sobrenadante con las células no adherentes. Este volumen se reemplazó con medio fresco. Cada semana los cultivos se trataron de igual manera. Las células no adherentes fueron contadas y cultivadas en metilcelulosa para identificar a los progenitores hematopoyéticos.

Cultivos de la Capa Adherente

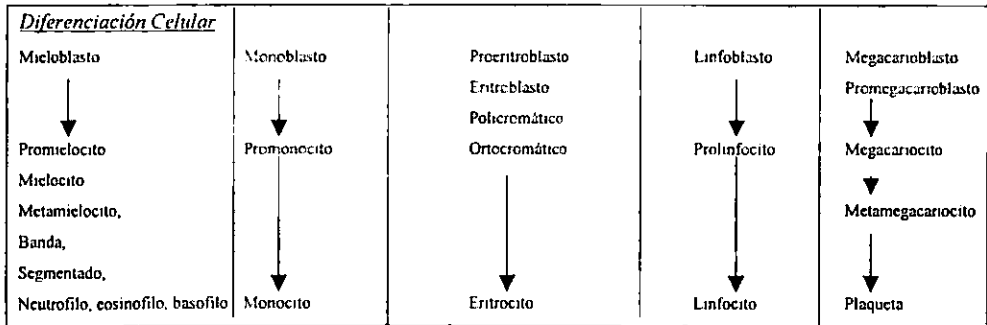
A lo largo del cultivo, las células que forman parte del estroma tienen la capacidad de adherirse e ir formando una capa de células adherentes. En los días 21, 35, y 49, fueron despegadas empleando tripsina (0.25% de tripsina conteniendo 0.1mM EDTA, se incubaron los cultivos durante 10' a 37°C, la reacción se paró con la mitad del volumen con Suero Fetal de Bovino), fueron contadas y cultivadas en metilcelulosa para identificar a los progenitores hematopoyéticos de la fracción adherente.

Análisis Morfológico de las Células Nucleadas:

En términos generales, las células primitivas suelen ser grandes y se vuelven progresivamente más pequeñas al adquirir madurez. Los núcleos de células jóvenes en la secuencia de maduración son grandes y voluminosos con relación al citoplasma, al madurar el núcleo disminuye en términos absolutos y relativos. En la serie eritrocítica, el núcleo es expulsado de las células maduras.

El citoplasma de las células primitivas es esencialmente azul y contiene grandes cantidades de RNA que tiene afinidad para el azul de metileno. En la tabla n° 7 se puede apreciar los pasos de diferenciación celular en los distintos linajes.

Tabla 7



El análisis morfológico fue llevado a cabo según los criterios internacionales de la morfología de las células. Se utilizó el colorante Wright-Giemsa.

El recuento diferencial se efectúa identificando por lo menos 500 células a gran aumento con aceite de inmersión.

Cultivos de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)

Los cultivos de unidades formadoras de colonias de fibroblastos se llevaron a cabo a partir de 300 000 cel/ml de médula ósea, (células mononucleadas) en IMDM más 20% de suero fetal de bovino. Fueron incubadas a 37°C en 5% de CO₂ en cajas Petri de 35 mm. A los 5 días se cambia el medio por medio fresco. Después de 10 días el sobrenadante es descartado, y las células adherentes son lavadas con buffer de fosfatos Castro Malaspina 1960. Se tiñen con Wright-Giemsa. Son contadas en un microscopio invertido.

Cuantificación de Citocinas:

Los niveles de citocinas de SCF, IL-6 y TNF- α presentes en el sobrenadante de los cultivos fueron determinados por kits de ELISA (*R&D Systems*).

ELISA: Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (de *Enzyme Linked Immunoabsorbent assay*). Es una técnica muy sensible y no requiere de inmunofluorescencia y/o métodos inmunoradiactivo. El método depende de la conjugación de una enzima con un antígeno o con un anticuerpo y posteriormente se utiliza la actividad de la enzima como una marca cuantitativa. Para medir anticuerpo un antígeno se fija a una fase sólida, se incuba con diluciones del suero de prueba, se lava y posteriormente se incuba con una anti-inmunoglobulina marcada con una enzima.

La actividad enzimática se mide mediante la adición del sustrato específico. La reacción de color se mide por colorimetría, la actividad enzimática está en función directa con la cantidad de anticuerpo ligado.

Estadística

El análisis estadístico fue llevado a cabo usando la prueba de U de Mann Whitney y la W de Wilcoxon

ASPIRADO DE MEDULA OSEA

OBTENCION DE LAS CELULAS MONONUCLEADAS

CONTEO DE LAS CELULAS MONONUCLEADAS

D-LTC

DIFERENCIAL

CULTIVOS SEMISOLIDOS

CULTIVOS PARA CFU-F

Día 14: lectura de cultivo

3er día cambio de cultivo

Día 10: lectura de CFU-F

FRACCION ADHERENTE

Los días 21, 35, 49
CONTEO CELULAR Y DIFERENCIAL
Cultivos semisólidos
CUANTIFICACION DE CITOCINAS: SCF, IL-6, TNF- α

FRACCION NO ADHERENTE

Los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49
CONTEO CELULAR Y DIFERENCIAL
Cultivos semisólidos
CUANTIFICACION DE CITOCINAS: SCF, IL-6, TNF- α

8. RESULTADOS

8.1. Datos Clínicos y Hematológicos de los Pacientes:

Introducción:

La hemoglobina es una proteína que se encuentra en el interior de los eritrocitos. Su concentración normal es de 12 a 18 g/100 ml de sangre entera, dependiendo del sexo del sujeto, con variaciones normales. Se forma en la fase final de maduración del eritrocito, solo se identifica plenamente en las fases de eritroblasto y eritrocito. Cada molécula de hemoglobina está formada por cuatro cadenas peptídicas que llevan unido un grupo hemo cada una.

Hematocrito: Es la proporción del volumen total de eritrocitos respecto al volumen sanguíneo. Normalmente es de 40-45%.

Leucocitos: Se toma en cuenta toda la línea blanca:

Neutrófilo en banda	0-5%	$0.18 \times 10^3 \mu\text{l}$
Neutrófilos segmentados	40-60%	$4.22 \times 10^3 \mu\text{l}$
Linfocitos	20-40%	$2.56 \times 10^3 \mu\text{l}$
Eosinófilos	1-3%	$0.16 \times 10^3 \mu\text{l}$
Basófilos	0-1%	$0.05 \times 10^3 \mu\text{l}$
Monocitos	4-8%	$0.41 \times 10^3 \mu\text{l}$
Linfocitos total		1,500 – 4000/ μl
Células B	5-25%	
Células T	60-88%	
Supresoras	10-43%	
Cooperadoras	32-66%	

Plaquetas: 150 000 – 400 000/ μl

Valores hematológicos de los pacientes:

Diez pacientes con LDCG fueron estudiados antes de la quimioterapia. Este grupo incluyó 7 personas del sexo masculino y 3 del femenino. Su edad promedio fue de 50 años. La mayoría de los pacientes se encontraron dentro de los niveles hematológicamente normales. Después de la quimioterapia no hubo cambios significativos. Solo el paciente 10 mostró niveles por debajo de lo normal

en la cantidad de leucocitos y el paciente 8 un aumento significativo en el número de plaquetas.

Tabla 8 Datos clínicos de 10 pacientes incluidos en este estudio.

Paciente	Sexo	Edad años	Hemoglobina (g/dL)	Hematocrito (%)	Leucocitos $\times 10^9/\text{mL}$	Plaquetas $\times 10^3/\text{ml}$
1	F	69	12	46	4.5	180
2	M	48	11.6	40	6.5	272
3	M	48	16.3	50	5.7	207
4	F	58	10.4	33	6.0	330
5 ^a	M	69	14.4/13.6 ^a	42/44	5.5/6.1	267/272
6 ^a	F	50	13.1/12.5	40/42	7.6/2.6	267/196
7 ^a	M	51	12.0/13.0	37/40	5.5/6.0	164/120
8 ^{a, b}	M	48	13.8/13.0	41/41	7.4/8.5	150/620
9 ^a	M	50	14.0/14.0	47/46	5.0/5.0	250/250
10 ^a	M	57	13.0/13.8	41/40	3.2/3.1	114/101
Valores Normales	F	50	12-16	37-47	5-10	150-400
Valores Normales	M	50	14-18	40-52	5-10	150-400

- a. Indica los datos antes/después de la quimioterapia
- b. Todos los pacientes recibieron CEOP/bleo más radioterapia 40 Gy excepto el paciente 8
- c. Las muestras de MO después de la quimioterapia se obtuvieron en la fase de remisión completa
- d. F = Femenino, M = Masculino

8.2. Progenitores Hematopoyéticos en Médula Ósea:

Introducción

Los cultivos semisólidos se desarrollaron entre los años 1965-1970. En estos cultivos, las CPH son capaces de formar colonias, lo que permite la cuantificación y caracterización de los progenitores hematopoyéticos [(mieloides, eritroides y pluripotenciales, (de manera especial facilitan el crecimiento del

linaje mieloide]). Los cultivos de colonias contienen nutrientes (ver material y métodos) que favorecen el crecimiento y desarrollo celular y están suplementados con factores estimuladores hematopoyéticos. Estos cultivos permiten evaluar tanto el fenotipo como la fisiología de los progenitores *in vitro*. Consisten en cultivar una suspensión de células de la médula ósea (células mononucleadas), algunas de las cuales, pueden formar racimos de células o colonias. La auto-renovación de progenitores inmaduros es muy limitada. El crecimiento de progenitores muy primitivos es muy bajo, pero esto es debido a la proporción tan baja que se encuentra en la médula ósea (MO) y por ende en un aspirado de MO.

Si el tamaño de la colonia es grande, se puede inferir que el progenitor que le dio origen es más inmaduro. El período de cultivo varía entre los 8-14 días en la estirpe eritroide y entre 14-21 días para el linaje mieloide y pluripotencial. Este tipo de cultivos ha sido de gran utilidad para estudiar los distintos progenitores y los factores de crecimiento hematopoyético.

Los progenitores mieloides comprenden CFU-G, CFU-M, CFU-GM (granulocitos, monocitos y bipotenciales, [granulo-monocitos], respectivamente) y los progenitores eritroides CFU-E y BFU-E (eritroides y eritroides más primitivos). Los progenitores pluripotenciales forman colonias que contienen células tanto de la línea mieloide como eritroide.

En este estudio los progenitores hematopoyéticos fueron determinados en tres grupos diferentes: **Grupo 1:** sujetos hematológicamente sanos. **Grupo 2:** los pacientes con LDCG y **Grupo 3:** los mismos pacientes después de la quimioterapia; considerando como día cero, el día del aspirado de la médula ósea. De cada una de las muestras se realizan diferentes experimentos de acuerdo al diagrama de flujo.

8.2.1 Médula Ósea Normal (Control)

En el día cero la proporción de progenitores hematopoyéticos en la médula ósea proveniente de sujetos hematológicamente sanos (10 muestras de MO control) fue la siguiente: 50% para los progenitores mieloides, 49% para los progenitores eritroides y 1% para los progenitores pluripotenciales. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Tabla 9).

Si se consideran números absolutos, se obtuvieron 446 unidades formadoras de colonias (CFU) por cada 10^5 células nucleadas, con una mediana para los progenitores mieloides de $241/10^5$ (valores límite 129-422), para los progenitores eritroides de $201/10^5$ (56-285) y finalmente, para los progenitores pluripotenciales de $4/10^5$ (1-22) (Tabla 10). Si analizamos los diferentes subtipos dentro del linaje mielode, el 62% correspondió a CFU-G, 32% a CFU-M y 6% a CFU-GM (Tabla 11). En el linaje eritroide, los progenitores más maduros (CFU-E) correspondieron a un 36% y los progenitores más inmaduros, (BFU-E) a un 64% (Tabla 12).

8.2.2 CFU en pacientes con LDCG en Enfermedad Activa.

En los pacientes con LDCG en la etapa activa (EA), el tamaño de las colonias hematopoyéticas fue menor al observado en cultivos de MO N, En esta etapa se presentó una disminución en los niveles de los progenitores hematopoyéticos el número de CFU-C en los pacientes con LDCG se encontró reducido un 35%. La relación de las CPH fue similar a la MO Normal. (54% de progenitores mieloides, 45% de progenitores eritroides y 1% de progenitores pluripotenciales). No hubo diferencia significativa.

Si consideramos los números absolutos en las CPH de LDCG hubo una disminución considerable con respecto a MO N: de 241 progenitores mieloides que se encontraron en MO N a 156 progenitores en LDCG; de 201 progenitores eritroides a 132 y finalmente solo se encontraron el 50% de progenitores pluripotenciales en relación con el control. Hubo una diferencia significativa en el linaje mielode. ($P < 0.025$; Tabla 10).

Con respecto a los progenitores mieloides en EA, el 70% fue CFU-G, 22% CFU-M y 8% CFU-GM, siendo estadísticamente significativo para CFU-G y CFU-M con respecto al grupo 1 ($p < 0.030$; Tabla 11). Para el linaje eritroide, los progenitores de la médula ósea no variaron en porcentajes con respecto a la médula ósea control, con un 36% para los progenitores más maduros y un 64% para los BFU-E. (Tabla 12).

8.2.3. CFU en pacientes con LDCG en Remisión Completa

A los pacientes que recibieron quimioterapia con el esquema CEOP/bleo, y que alcanzaron la remisión completa, se les realizó un segundo aspirado de médula ósea, donde se analizaron los progenitores hematopoyéticos, considerándose como día cero, el día de la toma de la muestra.

Los porcentajes en los tres linajes (mieloides, eritroides y pluripotenciales) fueron similares a los de la muestra control, 50, 49, 1% respectivamente. Sin embargo el tamaño y el número de las células de las colonias fue mucho más pequeño.

Los números absolutos de las CPH cuantificadas en los cultivos semisólidos fueron de 144 CPH mieloides, 75 CPH para la estirpe critroide y en algunos cultivos no se encontraron progenitores pluripotenciales, siendo estos resultados estadísticamente diferentes con respecto a los dos grupos anteriores ($p < 0.025$; Tabla 10).

Con respecto a los progenitores mieloides, se observó un incremento del 13 % para los CFU-G, con respecto al control, es decir el 75% correspondió a los CFU-G, 23% a los CFU-M y 2% para los progenitores bipotenciales. (Tabla 11).

En cuanto al linaje eritroide, después de la quimioterapia se observó una proporción superior para los progenitores más primitivos, 46% a diferencia de 65% en la MO control y 64 % en LDCG de la fase activa. Encontrando una diferencia significativa ($p < 0.025$) En la mayoría de los cultivos no se encontraron progenitores pluripotenciales en remisión completa. Tabla 10.

Tabla 9

Muestra	Mieloide	Eritroide	Mix
Control (10)	50 (56.52)	49 (58.69)	1 (6)
Enfermedad Activa (10)	54 (38.35)	45 (51.59)	1 (6)
Remisión Completa (6)	50 (32.08)	49 (40.09)	1 (3)

Porcentaje de Unidades Formadoras de Colonias en personas sanas y en pacientes con LDCG en el día cero. Control y Enf. Activa 10 muestras, en remisión completa 6 muestras. Enfermedad Activa: Pacientes con LDCG en Enfermedad Activa. Remisión Completa: Pacientes con LDCG que recibieron el tratamiento de Quimioterapia y alcanzaron la remisión completa. Los paréntesis indican el rango percentil. En el linaje meloide la tendencia que muestra tiene una $p < 0.025$

Tabla 10

Muestra	Mieloide	Eritroide	Mix
Control	241 (129-422)	201 (56-285)	4 (1-22)
Enfermedad Activa	156 (23-218) ^a	132 (16-290)	2 (0-17)
Remisión Completa	144 (18-300) ^a	75 (24-290) ^{a,b}	1 (0-6) ^a

Números absolutos de las unidades Formadoras de Colonias en sujetos sanos y en pacientes con LDCG.

Los resultados representan la mediana y los paréntesis los valores limite de CFU/10⁵ células mononucleadas

Para la Médula Ósea de sujetos sanos se realizaron 10 experimentos, para Enfermedad Activa 10 experimentos y después de la quimioterapia se realizaron 6 experimentos.

a. $p < 0.025$ Remisión Completa vs Medula Ósea Normal (MO N)

b. $p < 0.025$ Remisión Completa vs linfoma en Enfermedad Activa (EA)

Tabla 11

Progenitores mieloides	CFU-G	CFU-M	CFU-GM
Control	62 (75)	32 (31)	6 (7.61)
Enfermedad Activa	70 (43)	22 (25)	8 (23.18) ^a
Remisión Completa	75 (83)	23 (31)	2 (10.23) ^b

Porcentaje de cada uno de los componentes del linaje mieloides en el día cero.

CFU-G= Unidades formadoras de colonias de granulocitos, CFU-M= monocitos, CFU-GM= granulomonocitos.

Para la Médula Ósea de sujetos sanos se realizaron 10 experimentos, para Enfermedad Activa 10 experimentos y después de la quimioterapia se realizaron 6 experimentos.

Los paréntesis representan el rango percentil.

a $p < 0.030$ EA vs control

b $p < 0.010$ RC vs control

Tabla 12

Progenitores eritroides	BFU-E	CFU-E
Control	65 (43)	35 (41.17)
Enfermedad Activa	64 (67.08)	36 (26.36)
Remisión Completa	46 (79.94) ^a	54 (35.46)

Porcentaje de cada uno de los componentes del linaje eritroide en el día cero.

BFU-E= Unidades formadoras de colonias de eritroides más primitivos, CFU-E= eritroides

Los resultados representan la mediana de 10 experimentos tanto en MO control como en EA y 6 experimentos para RC. Los paréntesis representan el rango percentil.

a $p < 0.025$ RC vs control

8.2.4. Discusión

Estas primeras observaciones muestran que los niveles de progenitores hematopoyéticos en pacientes con LDCG se encuentran disminuidos con respecto al control. Esto es de importancia, ya que hasta ahora no existían reportes acerca de la caracterización de las CPH en pacientes con linfoma, particularmente en enfermedad activa. Existen varios reportes acerca de la caracterización de las células progenitoras de la serie granulomonocítica en diferentes neoplasias, incluyendo Linfoma, pero todos ellos son después de que han recibido un tratamiento mielo-ablativo. Lin J.S y colaboradores (1998) demostraron que en pacientes con diferentes neoplasias, después de haber sido tratados con la quimioterapia convencional, los niveles de CFU-GM, se encontraron significativamente por debajo de los niveles normales reportados en la literatura, sin embargo este estudio lo realizaron en sangre movilizada. En otro reporte demostraron números reducidos de CFU-C en pacientes con linfoma, después de un transplante autólogo de células seminales Soligo D A 1998.

En este trabajo donde se analizaron muestras de la MO antes y después de la quimioterapia *versus* personas sanas, las CPH neoplásicas se encontraron reducidos, estos resultados preliminares nos sugieren que el sistema hematopoyético en estos pacientes se encuentra alterado ya sea solamente los progenitores hematopoyéticos *per se* o por la presencia de ciertas proteínas inhibitorias que impiden una proliferación y diferenciación adecuada. Después del tratamiento se acentúa este fenómeno. Lo que indica que la alteración no fue corregida por la quimioterapia. Existen reportes donde se demuestra que estos agentes citotóxicos pueden provocar daños irreversibles en el estroma medular Greengberg JS 1991, de manera que impide un desarrollo adecuado de las células seminales, dando lugar a alteraciones en las CPH, aún cuando los pacientes presenten niveles hematológicos normales y se encuentren en remisión completa.

8.3 Caracterización de Progenitores hematopoyéticos en LTMC

Introducción

Los cultivos líquidos a largo plazo (LTMC), fueron desarrollados entre 1973 y 1980. ^{N Testa A 1993}. La característica más importante de estos cultivos, es que se puede sostener la hematopoyesis por varias semanas, aún cuando no se adicionen factores de crecimiento; sin embargo es absolutamente necesaria la presencia de la capa adherente derivada de las células estromales de la médula ósea, que se empieza a formar desde la primera semana de cultivo, logrando una confluencia a partir de la tercera semana. Las células del estroma sostienen la hematopoyesis proveyendo un ambiente apropiado para promover la supervivencia, auto-renovación, proliferación y diferenciación de las células seminales. La funcionalidad de este sistema es probablemente resultado de la combinación: a) de las moléculas de adhesión que permiten la unión de las SCH y su progenie con el estroma, b) de la comunicación intercelular entre diferentes tipos de las células del estroma y entre este tipo de células y las células hematopoyéticas, c) de la síntesis, secreción y presentación de ciertos factores de crecimiento y de factores inhibitorios que son responsables para la proliferación de la regulación y el desarrollo de las CPH, d) de la síntesis de las moléculas de la matriz extracelular por las células del estroma, que juegan un papel importante para la integridad del microambiente hematopoyético.

En estos cultivos se produce una hematopoyesis prolongada, que en humanos puede ser de 8-12 semanas, con la producción de la estirpe mieloide (incluyendo eritroide) en todos los estadios de desarrollo ^{Eaves C. 1991}. Para valorar algunos aspectos de la integridad funcional de las Células Progenitoras Hematopoyéticas de los pacientes con LDCG, antes y después de la quimioterapia, se llevó a cabo la cinética de los progenitores mieloides, eritroides y pluripotenciales en LTMC durante siete semanas de cultivo.

8.3.1. Fracción del Sobrenadante

Cinética de los Progenitores Hematopoyéticos en cultivos a largo Plazo en Médula Osea Normal.

Progenitores Mieloides

Los progenitores mieloides de la MO control de la fracción no adherente, presentaron un descenso marcado durante los primeros 14 días de cultivo. Entre la segunda y la quinta semana, la pendiente de la cinética disminuyó, lo que sugiere una mayor proliferación de las CPH. En el día 42 se observó un ligero descenso y entre la sexta y séptima los niveles de CPH se mantuvieron constantes (Figura 7).

La proporción que guardaron dichos progenitores, a lo largo de los cultivos, fue diferente a lo observado en el día cero. Es decir los CFU-M fueron aumentando y tanto los CFU-G y CFU-GM tendieron a disminuir, principalmente los progenitores bipotenciales.

Progenitores Eritroides

La cinética de los progenitores eritroides en MO control, presentó una pendiente muy marcada durante las primeras semanas, incluso, en el día 35 de cultivo ya no se detectaron dichos progenitores (Figura 8). A lo largo del cultivo, la relación que guardaron los progenitores hematopoyéticos fue la siguiente: CFU-E = 35% y BFU-E 65%. En la quinta semana, el porcentaje de los progenitores más maduros disminuyó a un 22%.

Progenitores Pluripotenciales

De los diferentes tipos de progenitores hematopoyéticos, detectados en D-LTC a través de varias semanas de cultivo, los progenitores pluripotenciales (CFU-GEMM) son los que mostraron los niveles más bajos y su desaparición fue la más rápida. Así, en el control dichos progenitores solo fueron detectados en los días 0, 7 y 14.

Cinética de los Progenitores Hematopoyéticos en Pacientes con LDCG Progenitores mieloides

Durante las dos primeras semanas de cultivo, la mediana de los progenitores mieloides fue muy similar a la muestra control (Figura 7). Sin embargo, de la tercera semana hasta el final del cultivo la mediana de los progenitores mieloides de los pacientes con linfoma fue más baja que en los cultivos de MO control, $p < 0.003$.

Con respecto a la proporción que guardan dichos progenitores a lo largo del cultivo ésta es a la inversa de lo que se observa en MO control, es decir, son los CFU-G y no los CFU-M los que incrementan su frecuencia.

Progenitores eritroides

La cinética de los progenitores eritroides es muy similar a la observada en los cultivos control, ($p > 0.05$) sin embargo en el día 28 ya no se detectan CFU-E. Interesantemente, la proporción que guardan los CFU-E y BFU-E se invierte con relación al control (Figura 8).

Cinética de los Progenitores Pluripotenciales

La proliferación de los progenitores pluripotenciales en LTMC fue muy deficiente, encontrándose estas células únicamente en el día 7.

Cinética de los Progenitores de pacientes con LDCG Post-Quimioterapia

Progenitores Mieloides

Los Progenitores mieloides en cultivos a largo plazo de pacientes con LDCG después del tratamiento, se comportaron de manera muy similar a la cinética de los progenitores del grupo en EA, sin embargo, a partir del día 35 cayeron abruptamente, $p < 0.003$ Post-quimioterapia la tendencia y el grado de dispersión fue similar a lo obtenido en EA, $p < 0.001$. En el día 42 ya no se detectaron CFU (Figura 7). Si comparamos la tendencia entre los dos grupos estudiados no hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

Si valoramos cada uno de los sub-tipos del linaje mieloides, en el día cero los CFU-G se encontraron ligeramente elevados con relación al grupo control; en los días 21 y 35 aumentaron todavía más.

Progenitores Eritroides

Como se ha mencionado anteriormente, en el día cero, los niveles de progenitores eritroides se encuentran disminuidos, a partir del día 7 de cultivo, los valores de estas células bajaron notablemente, aproximadamente 10 veces, en el día 14 ya no se detectaron, existiendo una diferencia significativa con respecto a los otros dos grupos. (MO control vs RC $p < 0.030$ y EA vs RC $p < 0.004$). Después del tratamiento, en estos progenitores fue difícil seguir la trayectoria de diferenciación en los LTMC ya que solo detectamos progenitores en la primera semana, sin embargo la mayoría de las colonias eran muy pequeñas Figura 8.

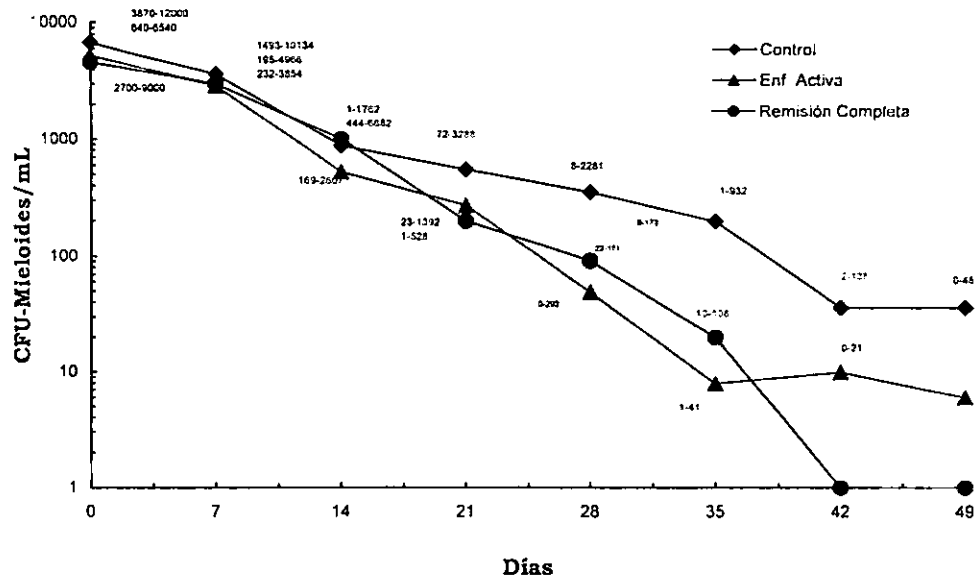


Figura 7. Cinética de las células progenitoras Mieloides en Cultivos a Largo Plazo tipo Dexter, en la Fracción del Sobrenadante.

Los progenitores mieloides incluyen los CFU-G, CFU-M y CFU-GM.

Los datos representan la mediana de 10 muestras y los números representan los valores límite.

$p < 0.003$ Control vs Enf Activa

$p < 0.001$ Control vs Remisión completa

$p > 0.05$ Enf. Activa vs Remisión completa

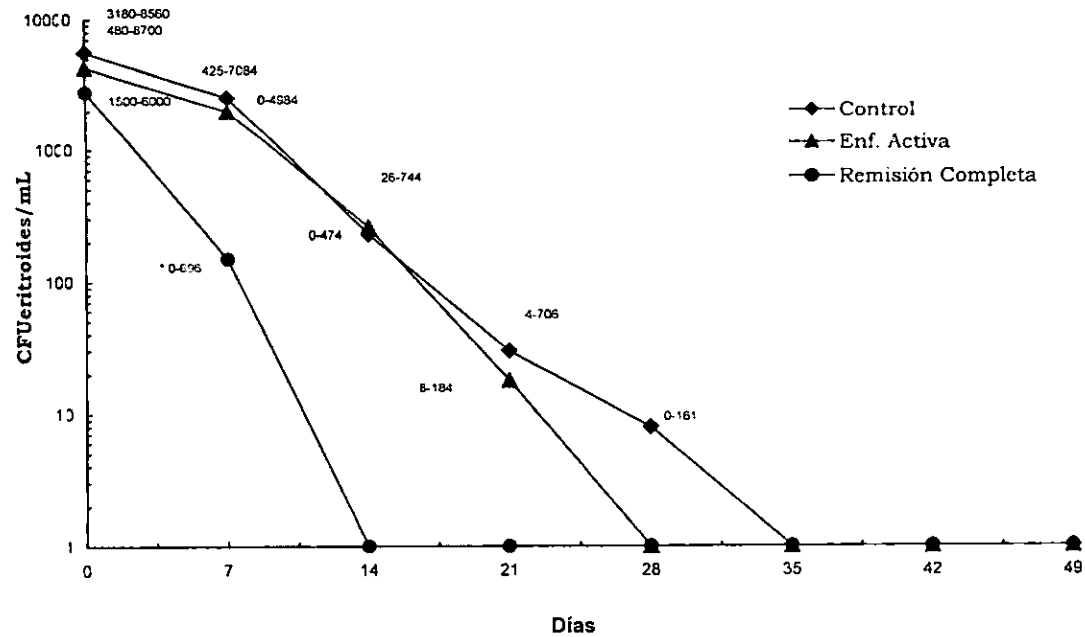


Figura 8. Cinética de los Progenitores Eritroides en Cultivos a Largo Plazo Tipo Dexter (D-LTC). Se tomaron a consideración tanto los progenitores muy inmaduros como los más maduros (BFU-E y CFU-E). Los datos representan la mediana y los números que se representan son los valores límite.

$p > 0.05$ Control vs Enf. Activa
 $p < 0.030$ Control vs Remisión completa
 $p < 0.004$ Enf. Activa vs Remisión completa

8.3.2 Fracción Adherente

Cinética de los Progenitores en cultivos a largo Plazo en Médula Ósea Normal.

Progenitores Mieloides

La capa del estroma en la MO control se empezó a formar desde la primera semana, sin embargo entre los 7 y 14 días todavía no alcanzó la confluencia. En el día 21 de cultivo, se detectó un estroma confluyente. A partir de este momento, es muy probable que las interacciones entre la capa del estroma y las células hematopoyéticas se lleven a cabo de una manera más completa, de igual forma la producción adecuada de citocinas y otros componentes que favorecen la hematopoyesis, por lo que cuantificamos a los progenitores hematopoyéticos unidos al estroma a partir del día 21.

Los progenitores mieloides de la fracción adherente fueron examinados los días 21, 35 y 49. En el día 21, la mediana de las CPH para el linaje mioide fue de 946, en el día 35, sufrieron un pequeño descenso manteniéndose así hasta el día 49 (Figura 9).

Progenitores Eritroides

Los progenitores eritroides en la MO control presentaron una pendiente negativa muy marcada. En el día 21 la mediana fue de 98; en el día 35 bajaron sus valores al 10% del número inicial y para el día 49 ya no se detectaron. (Figura 10).

Progenitores pluripotenciales,

Estos solo fueron detectados en el día 21 y a muy bajos niveles. (6 CFU-mix/100 000 células MNC).

Cinética de los Progenitores en cultivos a largo Plazo en LDCG

Progenitores Mieloides

Aunque la tendencia de la cinética fue similar a la observada en los cultivos control, los niveles de CFU-mieloides fueron aproximadamente 10 veces más bajos que en LTMC de sujetos sanos el control, ($p < 0.001$, Figura 9).

Progenitores Eritroides

Al igual que los progenitores mieloides, los progenitores eritroides de la capa adherente fueron analizados en las semanas 3, 5 y 7. En la tercera semana, los niveles de las CPH en EA fueron significativamente reducidos respecto al control. En la quinta y séptima semana los niveles de las CPH fueron semejantes tanto en la MO control como en LDCG (Figura 10).

Los progenitores Pluripotenciales

No se detectaron CFU-mix en EA. (No se muestran los datos).

Cinética de los Progenitores en cultivos a largo Plazo en LDCG Post-Quimioterapia

Progenitores Mieloides

En los LTMC de pacientes con LDCG que alcanzaron la remisión completa, los niveles de los CFU-mieloides fueron 100 veces más bajos que en los cultivos control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los cultivos de los pacientes antes y después de la quimioterapia (Figura 9).

Progenitores Eritroides

En Remisión Completa, los CFU-E en el día 21 se encontraron 10 veces más abajo que los niveles del grupo control. En el día 35 ya no se detectaron estos progenitores ($p > 0.05$, Figura 10).

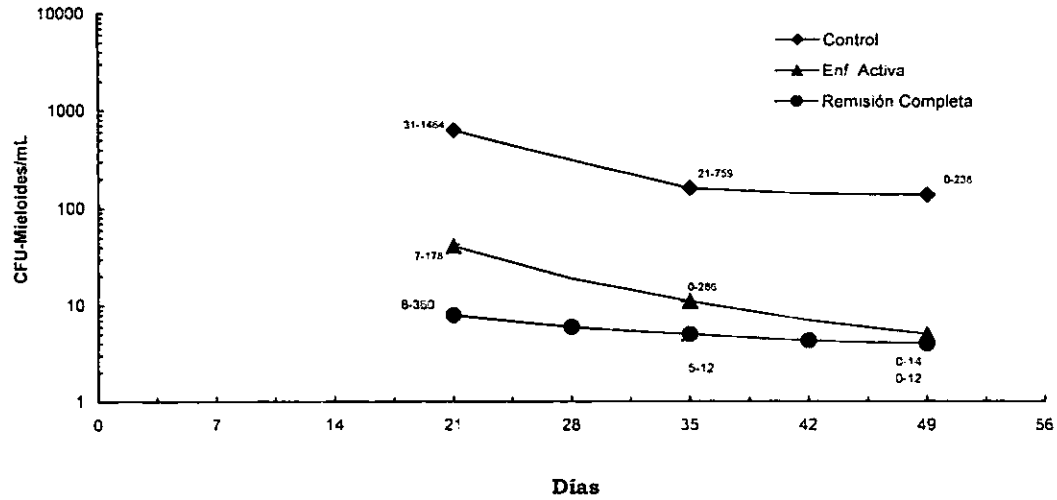


Figura 9. Cinética de los Progenitores Mieloides en Cultivos a Largo Plazo tipo Dexter en la Fracción Adherente.

En los Progenitores Mieloides hemos incluido a los CFU-G, CFU-M y CFU-GM.

Los datos representan la mediana de 10 experimentos y los números representan los valores llmite.

$p < 0.001$ Control vs Enf. Activa.

$p < 0.001$ Control vs Remisión completa.

$p > 0.05$ Enf. Activa vs Remisión completa

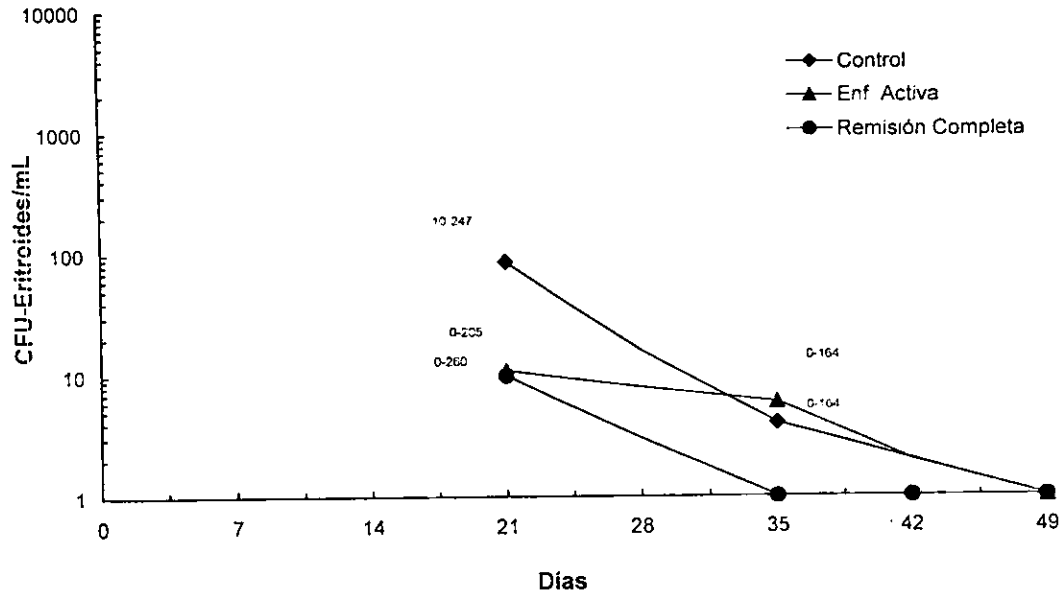


Figura 10. Cinética de los Progenitores Eritroides en Cultivos a Largo Plazo tipo Dexter en la fracción Adherente. Los datos representan la mediana y los números que se representan son los valores límite.

$p > 0.05$ Control vs Enf. Activa

$p > 0.05$ Control vs Remisión completa

$p > 0.05$ Enf. Activa vs Remisión completa

Al considerar el número total de progenitores mieloides desarrollados a lo largo del cultivo, (Fracción adherente + Fracción no Adherente) se observó un número extremadamente reducido en LDCG antes del tratamiento (de 3.4 a 18.8 veces) menor al observado en los cultivos de la MO control. Tabla 15). En los pacientes en Remisión completa, el número total de progenitores fue todavía más bajo. Interesantemente, también hubo diferencias en cuanto a la proporción de los CFU-G, CFU-M y CFU-GM a lo largo de las siete semanas de cultivo. Mientras que en los cultivos de la médula ósea normal la proporción de CFU-M va aumentando del 32% en el día cero, hasta el 72% en el día 49. En los cultivos de linfoma (antes y después del tratamiento), los CFU-G fueron siempre los más abundantes dentro del linaje mieloides (> 80% después de la quinta semana de cultivo Tabla 13).

Tabla 13

Día	Medula Ósea Control			Enfermedad Activa			Remisión Completa		
	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	CFU-G	CFU-M	CFU-GM
0	62	32	6	70	22	8	75	23	2
21	43	53	3	88	12	nd	54	42	4
35	30	67	1	100	nd	nd	83	17	nd
49	29	72	nd	86	14	nd	nd	nd	nd

Porcentaje de los progenitores mieloides en D-LTC de 7 semanas de la fracción no Adherente y adherente

Control vs EA $p < 0.025$ en los CFU-G y CFU-M

Control vs RC $p < 0.025$ en los CFU-GM

Los resultados representan la mediana y los paréntesis los valores límite de 10 experimentos de MO control, 10 experimentos de LDCG y 6 experimentos de RC.

Tabla 14

Día	Medula Ósea Control		Enfermedad Activa		Remisión Completa	
	CFU-E	BFU-E	CFU-E	BFU-E	CFU-E	BFU-E
0	35	65	36	64	54	46
21	35	65	68	32	16	84
35	22	78	nd	nd	nd	nd

Porcentaje de los progenitores eritroides en D-LTC de 7 semanas de la fracción del sobrenadante y adherente.

nd: no detectable. Los resultados representan la mediana y los paréntesis los valores límite de 10 experimentos de MO control, 10 experimentos de LDCG y 6 experimentos de RC.

Tabla 15

Día	CONTROL	LDCG Enf. Activa	LDCG Remisión comp.
0	6780 (3870-12000)	5260 (640-6540) ^a	4620 (2700-9000) ^a
21	1168 (72-3288)	344 (23-1392) ^a	208 (1-528) ^a
35	358 (96-932)	19 (0-292) ^a	24 (1-41) ^a
49	172 (12-138)	11 (0-48) ^a	4 (0-12) ^a

Numero Total de Progenitores mieloides (adherentes + no adherentes) en Cultivos a Largo plazo.

Los resultados representan la mediana y los paréntesis los valores límite de CFU-C/pozo a = significativamente menor ($p < 0.025$) comparada con MO N en el mismo día de cultivo. Se realizaron 10, 10 y 6 experimentos para Médula Ósea Normal, en Enfermedad Activa y en Remisión Completa respectivamente.

Si valoramos el número total de progenitores eritroides tanto en la fracción adherente como de la fracción no adherente, el total de progenitores es significativamente más bajo ($p < 0.025$) en LDCG antes de tratamiento que en la MO control. Nuevamente observamos que en pacientes en RC, los niveles de progenitores eritroides fueron aun más bajos. (Tabla 16). En el día cero fueron iguales, pero a lo largo del cultivo, la proporción se invierte en los pacientes con

Enfermedad activa, es decir se encuentra una mayor proporción de los progenitores más maduros y en remisión completa si se formaron mayor número de las células progenitoras más inmaduras, sin embargo, el porcentaje de los BFU-E es superior en comparación con la MO control, (84% versus 65%).

Tabla N° 10

Día	CONTROL	LDCG EA	LDCG RC
0	5640 (3180-8560)	4320 (180-8700)	2760 (1500-6000) ^{a,b}
21	116 (10-240)	29 (8-184) ^a	10 (0-260) ^a
35	4 (0-164)	6 (0-164)	nd
49	nd	nd	nd

Número Total de Progenitores eritroides (adherentes + no adherentes) en cultivos a largo Plazo. Los resultados representan la mediana y los paréntesis los valores límite de CFU-E/pozo

a. $p < 0.025$ comparada con la MO control en el mismo día de cultivo

b. $p < 0.05$ comparado con LDCG antes de la quimioterapia en el mismo día de cultivo.

8.3.3. Discusión

Los cultivos líquidos a largo plazo tipo Dexter (D-LTC) han permitido caracterizar la hematopoyesis *in vitro* en sistemas murinos y/o humanos, lo que ha permitido estudiar la composición y funcionalidad del sistema hematopoyético en diferentes neoplasias, sin embargo, en la mayoría de ellos se trata de neoplasias de la estirpe mielóide ^{Webb 1996, Lin JS, 1998}, hasta la fecha, no se han realizado estudios longitudinales de las CPH en pacientes con linfoma. Los experimentos realizados en este estudio demostraron que en los cultivos D-LTC de pacientes con LDCG las CPH de Médula Ósea se encontraron por debajo de los niveles normales. Esto confirma nuestras primeras observaciones, donde encontramos los niveles disminuidos de las CPH en el día cero. Lo anterior sugiere que existe una alteración a nivel de las CPH. Recientemente se publicó un estudio donde se reportan anomalías hematopoyéticas después del trasplante autólogo de células seminales en pacientes con linfoma. Los autores encuentran disminuidos los niveles de CFU-C y de otras células progenitoras más primitivas como son las células iniciadoras de cultivo; (de long term culture-

initiating cell LTC-IC), sin embargo, se trata de un grupo heterogéneo de pacientes con linfoma y el estudio corresponde a células CD34⁺ de sangre movilizada. Soligo DA 1993. En nuestros cultivos de pacientes con LDCG se observó que los progenitores de la fracción adherente estuvieron muy por debajo de los cultivos controles. Al analizar cada uno de los componentes dentro de cada uno de los linajes, la proporción que guardan es diferente. Es decir la proporción que encontramos entre los CFU-G, CFU-M y CFU-GM es diferente en los tres grupos estudiados (Tabla 15). Probablemente sea debido a una menor producción de factores que intervengan en la proliferación, diferenciación y maduración de estos progenitores, como puede ser GM-CSF, G-CSF o IL-3.

En el linaje eritroide en los cultivos con células de pacientes con LDCG se invierte la relación entre los CFU-E y BFU-E. Para el día 21 se encontraron en mayor proporción los CFU-E lo que nos sugiere que los niveles de IL-3 se encuentran alterados y/o la ausencia o presencia de algunas otras proteínas inhibitorias.

En el linaje pluripotencial sólo se observan CFU-Mix en el día cero en enfermedad activa. Lo que nos sugiere que los progenitores (CFU-Mix) que tienen un mayor grado de proliferación, se encuentran alterados, de la misma forma de lo que sucede en los BFU-E, sugiriendo que estos cultivos no tienen la capacidad de sostener una hematopoyesis primitiva. Esto puede ser debido a que la concentración de factores estimuladores de colonias se encuentra disminuida, provocada por el número reducido de las células estromales y/o por un efecto inhibitorio ocasionado por proteínas que integran la matriz extracelular.

8.4 Caracterización del Microambiente Hematopoyético

Análisis del Microambiente hematopoyético

Para valorar posibles alteraciones en el microambiente hematopoyético de pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes, antes y después de la quimioterapia se determinó: a) la proliferación y diferenciación de las células nucleadas, b) el desarrollo de la formación de las capas del estroma en los cultivos a largo plazo, c) se cuantificaron los progenitores de fibroblastos en el momento de la muestra y en cultivos líquidos en el día 21 y, d) la producción de las citocinas SCF, IL-6 y TNF- α en este sistema.

8.4.1 Caracterización de Células Nucleadas no adherentes en LTMC

Cinética de Células Nucleadas:

Los D-LTC permiten el seguimiento de la proliferación y diferenciación tanto de las células no adherentes como adherentes. En este estudio se analizaron las cinéticas de dichas células tanto de médula ósea normal como de los pacientes con LDCG en fase activa y en la etapa de remisión completa.

Fracción no adherente.

En los tres grupos estudiados, los cultivos fueron mantenidos hasta la séptima semana. Las células de la fracción no adherente mostraron la misma tendencia en todos ellos, aunque el número de células nucleadas tanto en EA como en RC fue menor (Figura 11). Cabe aclarar que en las muestras de las células neoplásicas, durante la obtención de las células mononucleadas, siempre se observó una capa de fibrina que impedía obtener las CMN puras.

Células Nucleadas Adherentes

Las células adherentes de la médula ósea normal formaron un estroma confluyente. Al igual que para las CPH, determinamos el número de las células mononucleadas (CMN) en los días 21, 35 y 49. Se observó un ligero descenso en el día 35, sin embargo en la observación microscópica la capa formada fue confluyente. Los valores límite oscilaron entre los 240,000 y 450,000 células adherentes por pozo de cultivo.

En enfermedad activa el estroma que se forma es muy escaso, la tendencia refleja variabilidad con respecto a la MO control ($p < 0.004$) La capa confluyente se lograba observar hasta el día 35 sin embargo para el día 49, el número de células descendió abruptamente, encontrando la tendencia de la curva diferente al control. (Figura 12). En la etapa de RC, el número de células adherentes ascendió con respecto a lo que se observó en enfermedad activa y aunque se observó la misma tendencia que en la MO control, las células adherentes, no alcanzaron los valores normales, ni llegaron a formar un estroma confluyente ($p < 0.01$; Figura 12).

8.4.2 Morfología de las Células Nucleadas.

A lo largo de los cultivos a largo plazo, se realizó el análisis Morfológico de las Células Nucleadas presentes en el sobrenadante tanto en la médula ósea normal como en aquellas células provenientes de pacientes con LDCG (Figura 11). En los cultivos de la MO control las células granulocíticas y monocíticas mostraron cinéticas diferentes. Los granulocitos en la primera semana fueron los más numerosos (el 66%), a partir de la tercera semana empezaron a descender y en la séptima semana su proporción llegó cerca del 20%. Por otro lado, en el día cero, los monocitos estaban en un 12% y al finalizar el cultivo su proporción correspondió al 70% de la población celular. La proporción de las células linfoides, en el día cero fue del 16% y para el día 49 descendieron ligeramente a un 10%. Finalmente, los eritroblastos fueron la población menos abundante del 8% al 1%. En contraste, las cinéticas de las poblaciones mencionadas en pacientes con LDCG antes y después del tratamiento se comportaron de manera diferente. Los niveles de células granulocíticas al inicio del cultivo correspondió a un 40% del total de células. Durante las siguientes semanas se observó un ascenso de tal suerte que en la semana séptima los granulocitos fueron de un 76% ($p < 0.05$). Las células del linaje monocítico tuvieron niveles entre 15-25%. Los niveles de las células linfoides fueron superiores a los encontrados en la MO control (dos veces más) y fueron descendiendo hasta la séptima semana. Los eritroblastos no mostraron diferencia con respecto a los cultivos de la MO control (Figura 13).

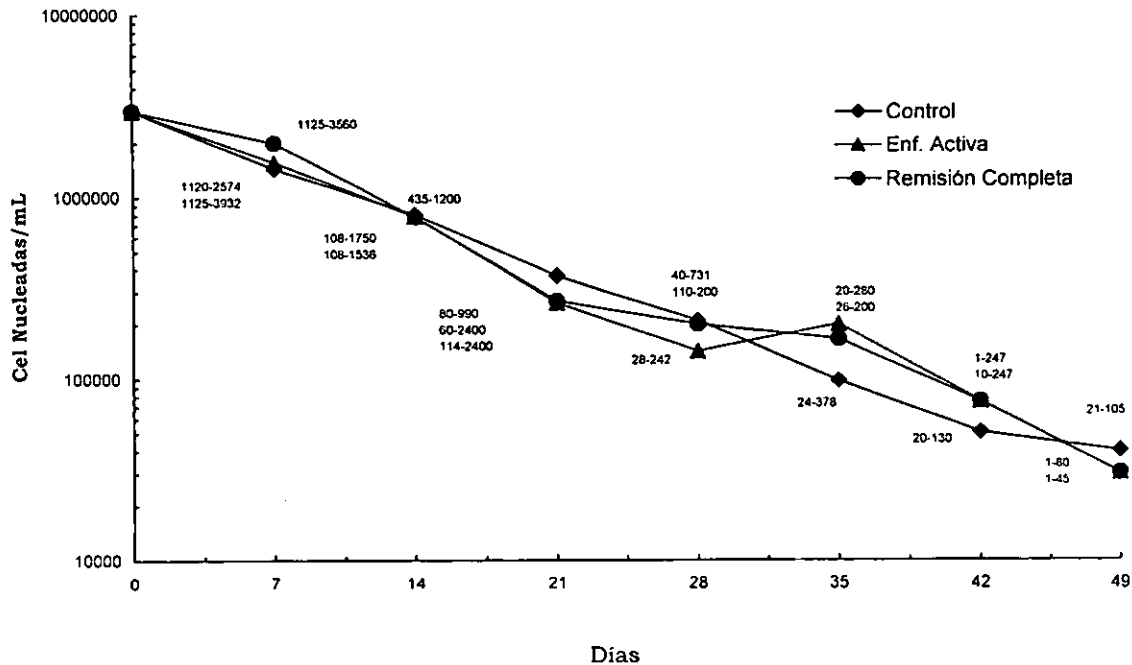


Figura 11. Cinética de las células nucleadas en Cultivos a Largo Plazo tipo Dexter. En la Fracción del Sobrenadante
 Los datos representan la mediana y los números representan los valores límite.
 $p > 0.05$

ESTA TESIS NO DEBE
 CAIR DE LA BIBLIOTECA

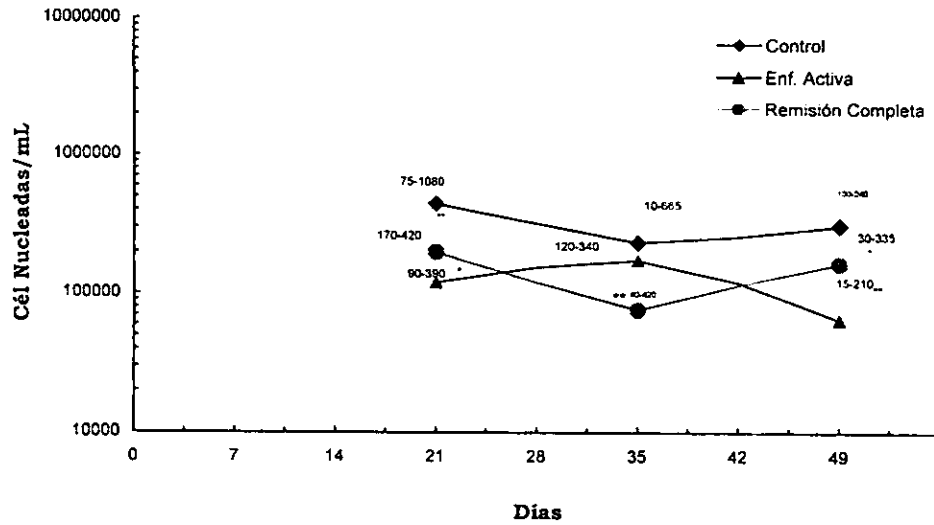


Figura 12. Cinética de las Células Nucleadas en Cultivos a Largo Plazo tipo Dexter en la fracción Adherente. Los datos representan la mediana de 10 experimentos y los números representan los valores límite.

$p < 0.004$ Médula ósea control vs Enfermedad Activa

$p < 0.01$ Médula ósea control vs Remisión completa

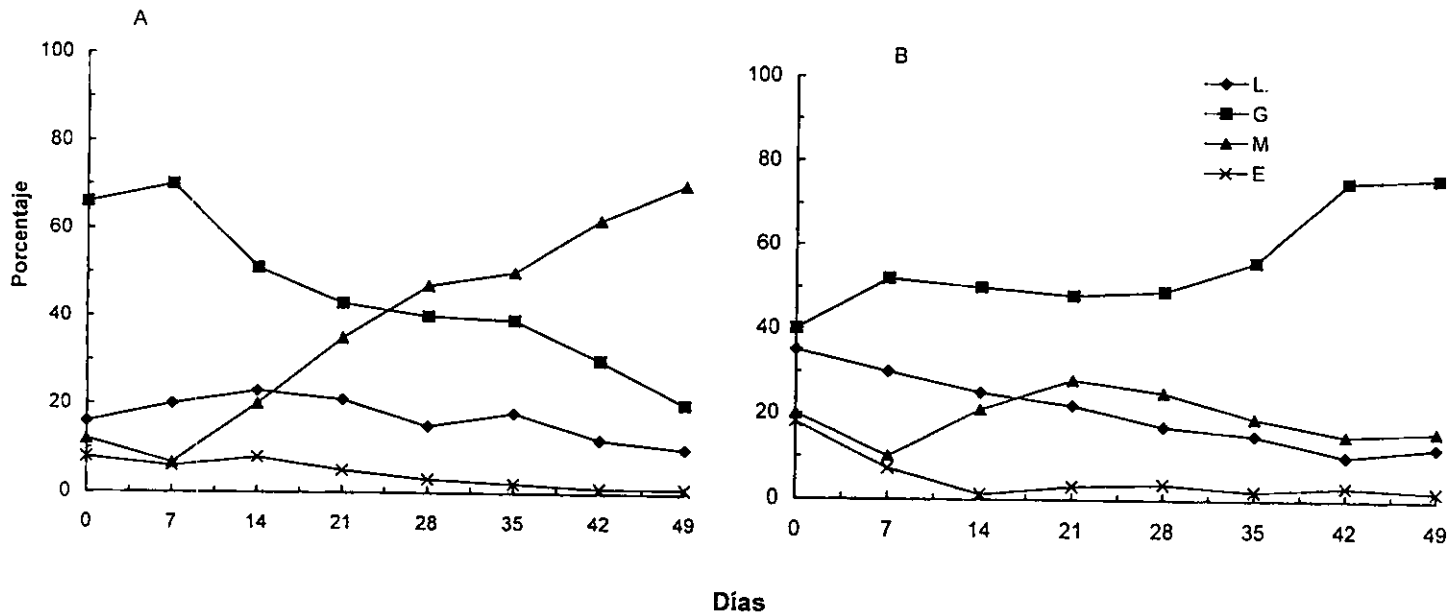


Figura. 13 Cinética de las células de la fracción No adherente en Cultivos a largo Plazo.
 Porcentaje de las células linfoides, L, Granulocitos G, monocitos/macrofagos (M), y eritroblastos (E)
 Panel A: Células de médula ósea de sujetos sanos (10 muestras), Panel B: Médula ósea de pacientes con LDCG (10 muestras)

8.4.4 Unidades Formadoras de Fibroblastos (CFU-F)

Los progenitores de los fibroblastos (CFU-F) es uno de los componentes del MH que pueden ser valorados directamente *in vitro*. Aún no está claro el origen de las células estromales, conocidas inicialmente como células no hematopoyéticas y que forman parte del microambiente medular. El fibroblasto es una de las células mejor caracterizadas. Existen varias evidencias que han ayudado a esclarecer que los fibroblastos derivan de progenitores no fagocíticos capaces de formar colonias en cultivo, conocidas como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) Friedenstein et al, 1970, Castro-Malaspina 1980. La población de los fibroblastos de la médula ósea incluye células precursoras clonales las cuales no son migratorias, son células altamente adherentes Testa NG 1993. *In situ*, más del 90% de CFU-F permanecen quiescentes en la fase G₀ del período del ciclo celular, mientras que en cultivo empiezan a proliferar y forman colonias de células adherentes (Fibroblastos). Las CFU-F realizan hasta 15 duplicaciones aproximadamente e *in vitro* pueden realizar hasta 22 duplicaciones aproximadamente. La incidencia de los CFU-F en humanos *in vitro* es de 6-9 por 10⁵ CMN. Mayani et al 1993

En la MO control, se observó una mediana de 7 CFU-F/10⁵ CMN (Figura 14). Dichas colonias consistieron de racimos de células limpias y bien diferenciadas. En las muestras de médula ósea de pacientes con LDCG la media fue de 3 CFU-F/10⁵ CMN (MO N vs EA p < 0.03, Figura 14). Los niveles de CFU-F disminuyeron de manera muy marcada en los pacientes que presentaron remisión completa después de la quimioterapia, MO N vs RC p < 0.001 (sólo en un paciente se observaron progenitores de fibroblastos).

COLONIAS DE CFU-F EN 100 000 Células

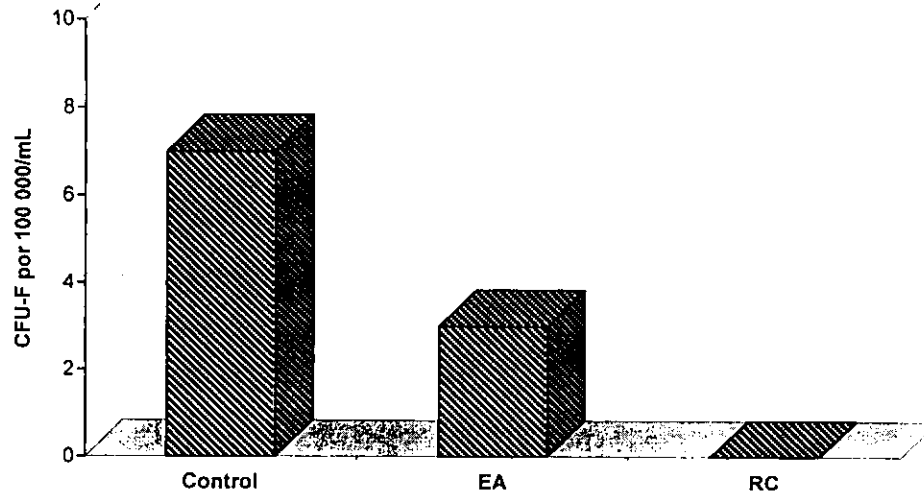


Figura 14. Niveles de progenitores de fibroblastos (unidades formadoras de Fibroblastos CFU-F) en médula ósea de 10 sujetos sanos (Control), en 10 pacientes con LDCG con Enfermedad Activa (EA) y 6 pacientes después de que recibieron el tratamiento con quimioterapia una vez que habían alcanzado la Remisión Completa (RC).

$p < 0.03$ MO Control vs Linfoma EA

$p < 0.001$ MO Control vs Linfoma RC

$p < 0.03$ Linfoma EA vs Linfoma RC

8.4.5 Medición de Citocinas en el Microambiente Hematopoyético

Para valorar ciertos aspectos funcionales del microambiente hematopoyético desarrollado *in vitro*, se determinaron los niveles de SCF, IL-6 y TNF- α , tanto en la médula ósea como en los sobrenadantes de los cultivos.

SCF es una citocina que es producida principalmente por los fibroblastos. Es una citocina relativamente selectiva para las células progenitoras hematopoyéticas más primitivas, aunque también tiene un pequeño efecto estimulador sobre los progenitores comprometidos de los diferentes linajes. TNF- α es producida principalmente por macrófagos, es una citocina pleiotrópica, que juega un papel central en la respuesta inflamatoria e inmune. También exhibe una actividad citotóxica frente a ciertos tumores. Esta citocina no queda exenta de su contribución en la regulación de la hematopoyesis. Su actividad biológica es inhibitoria en la hematopoyesis y particularmente en la eritropoyesis *in vitro*.

Niveles de SCF, IL-6 y TNF- α en plasma

Los niveles de estas citocinas se determinaron en la MO Normal, los valores que se obtuvieron fueron considerados como el 100%.

En cuanto a los niveles de SCF nuestros resultados estuvieron conforme a lo reportado para la concentración del plasma en sujetos normales 1-1.3 ng/mL McNiece IK and Briddell RA 1996. Los niveles de SCF en el plasma de estos pacientes (pacientes con EA) se encontraron dentro de los niveles normales con una media de 1.0 ng/mL. Sin embargo, después de la Quimioterapia (en RC), los niveles de SCF en plasma se encontraron muy por encima del grupo control (tres veces más elevados).

Los niveles de IL-6 en los dos grupos de pacientes estudiados fueron similares a los niveles observados en el plasma de sujetos sanos.

Los niveles de TNF- α en EA fueron similares al control. Solo en un paciente que tenía una actividad tumoral muy marcada con una deshidrogenasa láctica muy por arriba de los niveles normales, se observaron niveles más elevados de TNF- α . Después de la quimioterapia aumentaron los niveles hasta un 44% (Tabla 17).

Tabla 17

(pg/mL)	SCF	IL-6	TNF α
Control	1000 (94)	3.99 (0.50)	11(0.99))
Enf. Activa	1,183 (104)	3.27 (1.49)	13.5 (1.06)
Remisión Completa	3,133 (802)	4.01 (0.84)	16 (1.27)

Niveles de Citocinas en el plasma de Médula Ósea. Los datos representan la media de 5 experimentos. $P > 0.05$

Medición de las citocinas en los LTC.

Se cuantificaron los niveles de SCF en el sobrenadante de los cultivos a largo plazo en los días 21, 35 y 49. No hubo mucha variabilidad a lo largo del cultivo. Los niveles se encontraron ligeramente por debajo del control, en los dos grupos estudiados, antes y después de la quimioterapia, (24% y 16 % menos de la concentración de esta citocina respectivamente). Estos datos nos sugieren que los niveles bajos de las células del estroma sí afectaron la concentración de *stem cell factor* en estos cultivos.

Los niveles de IL-6 en el sobrenadante se encontraron disminuidos a un 58.3% en EA y un 56.13% en RC. TNF- α disminuyó a un 88 y 86% en EA y RC respectivamente (Tabla 18)

Tabla 18

Muestra	Células Adherentes x 10 ³ /pozo	SCF pg/ml	IL-6 pg/ml	TNF- α pg/ml
Control	235 (100-665)	486 (450-550)	26.9 (24.4-28.9)	11.3 (3.9-16.0)
Enf. Activa	175 (120-340)	370 (360-390)	15.7 (13.7-17.0)	9.8 (1.2-26.0)
Remisión Completa	76 (40-420)	410 (340-350)	15.1 (13.8-18.0)	7.7 (1.0-15.9)

Numero Total de células adherentes y los niveles de citocinas en Cultivos a Largo Plazo Resultados representan la mediana de 5 experimentos y los paréntesis representan los valores limite

8.4.6 Discusión

Cuando valoramos los componentes del microambiente hematopoyético podemos observar alteraciones cuantitativas y cualitativas que provocan un cambio en el comportamiento del estroma.

Las alteraciones encontradas en los progenitores de fibroblastos (CFU-F) puede ser motivo de un cambio en la producción de citocinas ya que los fibroblastos son fuente de una gran cantidad de citocinas, así como también de la presencia o ausencia de proteínas de la matriz extracelular ya que no se observaban CFU-F, sino que se formaban aglomerados de progenitores de fibroblastos impidiendo la formación de un estroma confluyente.

En la cuantificación de la concentración de SCF, IL-6 y TNF- α encontramos algunas diferencias con respecto a lo reportado en la literatura. Los niveles de SCF estuvieron ligeramente por arriba del control, aunque el número de células que conforman el estroma era significativamente menor, lo que nos sugiere que podría haber un efecto compensatorio, para sacar a las células de la fase S. Respecto a IL-6 y TNF- α se ha reportado en diferentes neoplasias hematológicas que estas citocinas se encuentran en mayor concentración ^{Kato H et al 1996}, sin embargo, hay que hacer notar que dichos trabajos los han realizado con un grupo heterogéneo de neoplasias incluyendo tumores sólidos o mieloma múltiple ^{Salleo G et al 1996}.

Al estudiar la morfología de las células nucleadas, encontramos en enfermedad activa mayor diferenciación hacia los granulocitos, a diferencia de lo que sucede en médula ósea control, lo que nos sugiere cierta variabilidad en los factores estimuladores de colonias favoreciendo el linaje granulocítico.

9. DISCUSIÓN GENERAL

En las últimas décadas el linfoma ha sido ampliamente estudiado, desde el punto de vista citogenético y molecular. Sin embargo, la composición y funcionalidad del sistema hematopoyético en pacientes con linfoma todavía no han sido plenamente entendidos. Para poder esclarecer un poco sobre la biología de este grupo de enfermedades hematológicas, en el presente estudio hemos cultivado células mononucleares de médula ósea de diez pacientes con linfoma. Se ha determinado el número de progenitores hematopoyéticos en médula ósea, caracterizado la cinética de diferenciación y proliferación de estas células en cultivos a largo plazo, y se estudiaron algunos aspectos relacionados con el desarrollo del microambiente hematopoyético *in vitro*. Se extendió este trabajo a pacientes que habían recibido 6 ciclos de quimioterapia y en los que se documentó remisión completa.

El linfoma comprende una gran variedad de enfermedades linfoides con diferentes grados de malignidad. Por esto y para lograr un estudio más específico, este trabajo abarcó solamente aquellos pacientes con linfoma difuso de células grandes (Células B). De hecho, este es el primer estudio dirigido a la caracterización del sistema hematopoyético en linfoma maligno difuso de células grandes. Los pacientes incluidos en este reporte fueron adultos entre los 48 y 69 años de edad. Casi todos ellos mostraron parámetros hematológicos normales en sangre periférica (hemoglobina, hematocrito, leucocitos y plaquetas) antes y después de la quimioterapia. Sin embargo, lo anterior, no correlaciona con lo encontrado en médula ósea. Las muestras de médula ósea de los pacientes con LDCG mostraron una reducción cerca del 33% en los niveles de los progenitores hematopoyéticos, (en los tres linajes: mieloide, critroide y pluripotencial) En otras enfermedades hematológicas (leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásicos Mayani H et al 1992, Flores-Figueroa E et al 1998), los niveles de los progenitores de médula ósea se han encontrado drásticamente disminuidos. En los cultivos semi-sólidos de linfoma, la disminución fue menos drástica, sin embargo, fue proporcional para los tres linajes. Esto nos sugiere que existen diferencias cuantitativas y cualitativas al nivel de los progenitores hematopoyéticos de pacientes con LDCG con respecto a otras patologías hematológicas.

Por otra parte, también se observaron alteraciones en los patrones de diferenciación. Es decir, mientras que en cultivos de la MO control la tendencia fue hacia el incremento de los progenitores monocíticos (CFU-M) y de macrófagos maduros, en cultivos de LDCG siempre hubo un predominio de CFU-G y granulocitos.

Tomando en consideración todos los resultados anteriores, se podría afirmar que existen deficiencias en la proliferación y diferenciación de las CPH en pacientes con LDCG. Una posible explicación a esto es que existan alteraciones intrínsecas en dichas células. Esto coincide con la mayoría de los reportes donde han demostrado alteraciones en las CPH de pacientes con diversas enfermedades hematológicas. Por ejemplo se ha reportado una disminución en progenitores de la Leucemia linfoblástica aguda Noben et al 1993, Bhavnani et al 1989. En leucemia mielóide crónica los progenitores mieloides "leucémicos" presentan una alteración *per se*. Estos progenitores muestran una reducida adherencia a las capas del estroma normal, las CPH están continuamente proliferando aún cuando se encuentran en contacto con el estroma Laves AC 1986. En pacientes con eritroleucemia, tanto los progenitores del linaje eritroide (CFU-E) como del linaje mielóide (CFU-GM) se encuentran por debajo de lo normal Suda, Mura 1982. El número reducido de las CPH y las alteraciones en la proliferación y diferenciación de los progenitores derivados de LDCG también podrían deberse a deficiencias en el microambiente hematopoyético. Los resultados de nuestro estudio indican que sí existen alteraciones significativas en el microambiente hematopoyético en esta neoplasia.

En los cultivos de MO control, se observó una correlación entre los CFU-F y el número de células adherentes. En los cultivos de LDCG, la capa adherente del estroma fue deficiente, probablemente debido al bajo número de progenitores de fibroblastos y esto quizá ocasionó una baja actividad estimuladora de citocinas que intervienen en la proliferación y diferenciación o una disminución de la concentración de ciertos factores esenciales para la formación de fibroblastos en la médula ósea, como PDGF, FGF β , TGF- β como han reportado Massague 1990. Podrían contribuir también la presencia de otras moléculas inhibitorias que puedan estar interactuando como puede ser la fibrina u otras moléculas que impiden la formación de un microambiente hematopoyético adecuado para que se lleve a cabo la proliferación y diferenciación de dichos

progenitores. Existen varias patologías donde las células del estroma se encuentran funcionalmente alteradas: en anemia aplásica las células del estroma medular presentan una baja actividad estimuladora de colonias Juneja and Gahrner 1985. En leucemia mieloide crónica está relacionada, al menos en parte, por fallas al nivel de las células hematopoyéticas *per se* Bathia et al 1995 por lo que se producen alteraciones en las interacciones entre los progenitores leucémicos y el estroma. Además el estroma medular tiene una menor capacidad para sostener el crecimiento normal de progenitores en cultivo Bathia R et al 1995. En Leucemia mieloide aguda el microambiente desarrollado en cultivos a largo plazo no puede sostener la hematopoyesis debido probablemente a la incapacidad de producir y/o responder a M-CSF Mayani et al 1992. Se ha reportado que la molécula de adhesión de la célula vascular (VCAM-1) es constitutivamente expresada en las células del estroma de la médula ósea Kincade LW 1992. Cuando se utilizan anticuerpos contra VCAM se inhibe la formación de unidades formadoras de colonias de blastos. En experimentos con las células del estroma, con anticuerpos dirigidos contra VCAM se inhibe la adhesión de BFU-E y GM-CFU Oostendorp RAJ 1995. Esto sugiere que probablemente existen alteraciones en estas proteínas en los D-LTC en pacientes con LDCG. En nuestros cultivos encontramos una diferencia significativa en las cinéticas de la fracción adherente tanto de los progenitores eritroides como del linaje mieloide.

La mielotoxicidad es una respuesta invariable en todos los pacientes que han recibido quimioterapia, que en algunos casos resulta ineficaz o conduce a complicaciones hematológicas que retardan el tratamiento. Sin embargo, una vez concluido el tratamiento, los niveles de las células de sangre periférica, de manera usual, se recuperan rápidamente y son aparentemente normales. Sin embargo, post-quimioterapia, en las muestras de médula ósea de los pacientes con LDCG en remisión completa, no se observan CFU-F, lo que indica que el tratamiento afecta también a estas células que forman parte del estroma medular. Esto concuerda con lo reportado en los CFU-F de pacientes con la Enfermedad de Hodgkin (otra neoplasia de origen linfóide), donde los pacientes recibieron MVPP (mostaza nitrogenada, Vinblastina, Procarbazona y Prednisona), el número de estos progenitores mesenquimales fue significativamente más bajo

Otros reportes donde analizan diferentes neoplasias, han demostrado que el daño causado (disminución del número de CFU-C) persiste después de un año o más de haber recibido la quimioterapia ^{Del Canizo C. y col. 1999 Radford y col. 1990}. Nuestros hallazgos correlacionan con lo reportado en la literatura, donde las CPH aún en RC se encuentran por debajo de los niveles normales. En las cinéticas de progenitores en los cultivos a largo plazo de pacientes post-quimioterapia se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con CEOP/bleo y el control (tanto en los CFU-eritroides, CFU-mieloides y CFU-pluripotenciales). Esto sugiere que la quimioterapia afecta a las CPH aún cuando la valoración se lleve a cabo después de 5-12 meses de haber recibido la quimioterapia. Aún en remisión completa los progenitores de MO de pacientes con LDCG no llegan a recuperarse cuantitativamente. Algo similar ha sido reportado en la enfermedad de Hodgkin, en donde se observó que los CFU-GM están significativamente más bajos que el grupo control, incluso aún después de varios años de haber recibido la quimioterapia ^{Radford JA 1990}. Recientemente se ha reportado en pacientes con linfoma que han sido sometidos a trasplante autólogo anormalidades hematopoyéticas mostrando un número reducido de CFU-C y CFU-F ^{Soligo et al 1998}. También reportan una proliferación deficiente de dichas células en cultivos líquidos suplementados con citocinas.

En nuestro estudio, los resultados indicaron que después de la quimioterapia, (esquema CEOP/bleo), se afectó, no solo, la mielopoyesis, sino también a la eritropoyesis y a los progenitores pluripotenciales. En pacientes con diferentes neoplasias que han recibido quimioterapia se ha descrito una hematopoyesis anormal que persiste por varios años y aún en aquellos pacientes que han sido trasplantados de manera autóloga, reportando únicamente un número deficiente de progenitores mieloides en la médula ósea ^{Al Fiar F et al 1997, Heralut O et al 1998, del Canizo C et al 1999}. También existen algunos reportes donde se ha caracterizado a los progenitores hematopoyéticos en pacientes que se les ha realizado trasplante autólogo o halogénico, sin embargo, en todos ellos se llevaron a cabo en sangre movilizada ^{Salles G et al 1995}.

Con relación a la concentración de las citocinas IL-6 y TNF- α , se encontró cierta variabilidad con lo reportado en la literatura. En LDCG en EA los niveles de estas citocinas se encontraron ligeramente por debajo de los niveles normales,

a diferencia de lo que se ha reportado en linfomas malignos, donde los niveles de estas citocinas en el plasma se encuentran incrementados (Kato H et al 1996, Salles G et al 1996). Sin embargo, hay que recalcar que en estos estudios, los pacientes corresponden a diferentes estadios (II, III y IV y de los tres grados). Los niveles de *Stem cell factor* en plasma se encontraron dentro de los estándares normales (1.1 ng/mL (McNiece IK & Briddell 1996)). Sin embargo, después de la quimioterapia aumentó la concentración de SCF en la Médula Ósea, por lo que inferimos que pueden existir mecanismos compensatorios donde haya mayor producción de SCF para sacar a las células de la fase G₀ del ciclo celular.

Estas observaciones resultan de importancia, si se considera que la hematopoyesis tanto *in vivo* como *in vitro*, se lleva a cabo en un microambiente complejo, compuesto de varios tipos de células del estroma que ejercen control sobre el crecimiento celular y la diferenciación y que, por lo tanto, cualquier daño a este nivel debe tener importantes implicaciones para la regulación de la hematopoyesis. Estos resultados indican que la quimioterapia no solo afecta la capacidad proliferativa de las CPH sino también a las células que forman el estroma. En los cultivos a largo plazo encontramos una correlación entre las CPH y el n° disminuido de células adherentes en la capa del estroma, tanto en enfermedad activa como en Remisión Completa. Esto sugiere que hay un defecto en las células del estroma y/o como consecuencia alteraciones en la producción de la concentración de citocinas. Esto lleva consigo alteraciones en el sostenimiento de la proliferación de los progenitores y en la diferenciación y mantenimiento en las células hematopoyéticas muy primitivas, ya que encontramos alteraciones cuantitativas y cualitativas en los tres linajes, granulomonocítico, eritroide y las células más primitivas (pluripotenciales) y en los CFU-F. Después de la quimioterapia estas deficiencias se acentúan y las alteraciones se prolongan por periodos de tiempo bastante largos. Probablemente se trate de un daño permanente.

Hasta el momento, no se conoce el origen de las alteraciones hematopoyéticas que ocurren durante la enfermedad activa. De todos los pacientes incluidos en este estudio ninguno mostró evidencias de médula ósea infiltrada. Sin embargo, las células del linfoma podrían estar implicadas en tales alteraciones a través de la secreción de citocinas que ejercen una inhibición en el

crecimiento normal de las células progenitoras, o bien que estas citocinas actúen sobre el estroma induciendo una modificación en el patrón de la producción de citocinas.

10. CONCLUSIONES

En este estudio, se caracterizó la hematopoyesis *in vitro* en pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes antes y después de la quimioterapia. Nuestros resultados indican que existen deficiencias cuantitativas y cualitativas tanto en las células progenitoras hematopoyéticas como en el estroma medular de estos pacientes, con respecto a la médula ósea normal. Estas alteraciones se acentúan después de la quimioterapia y permanecen aún en pacientes que han alcanzado la remisión completa.

Progenitores Hematopoyéticos en la Médula Ósea

Los progenitores hematopoyéticos de la Médula Ósea en pacientes con LDCG en enfermedad activa y después de la quimioterapia (en remisión completa), se redujeron un 36 y 54%, respectivamente, respecto a la médula ósea normal.

Progenitores Hematopoyéticos en Cultivos a Largo Plazo

Fracción no Adherente

En los cultivos a largo plazo, los progenitores hematopoyéticos mieloides mostraron una cinética similar con respecto al control; sin embargo, sus números absolutos fueron menores. Después de la quimioterapia, el número y el tamaño de las colonias fueron marcadamente más pequeños que en la MO control. En cuanto a los progenitores eritroides, las alteraciones más drásticas se observaron en cultivos de pacientes post-quimioterapia. De igual forma sucede con los progenitores pluripotenciales.

Fracción Adherente

Los progenitores hematopoyéticos mieloides se encontraron significativamente más bajos ($p < 0.025$) que en la MO control. Después del tratamiento citotóxico, aun en remisión completa, sus niveles se encontraron por debajo de lo observado en enfermedad activa.

Los niveles de los progenitores hematopoyéticos eritroides se encontraron 10 veces por debajo de lo normal. Post-quimioterapia, solo se observaron en el día 21 y en números muy reducidos.

Microambiente Hematopoyético

Las CFU-F se encontraron significativamente por debajo de lo normal en enfermedad activa y no se detectaron post-quimioterapia tanto en el día cero como a lo largo de los cultivos.

En los D-LTC de los grupos de los pacientes con enfermedad activa y en remisión completa no se observaron adipocitos.

Los niveles de las citocinas analizadas en el plasma de la Médula Ósea de los pacientes se observaron ligeramente incrementados en remisión completa.

A lo largo de los cultivos hubo un descenso en la concentración de estas citocinas tanto en EA como en RC, excepto en SCF.

Morfología de las Células a lo Largo de los Cultivos

La cinética de las células nucleadas en la médula ósea control los monocitos/macrofagos tiende a incrementar y la curva de los granulocitos tiende a disminuir. En LDCG las cinéticas se comportaron a la inversa.

11. PERSPECTIVAS

Estos resultados son relevantes para el entendimiento de la biología de las células hematopoyéticas y estromales en la médula ósea de esta entidad nosológica y poder esclarecer la etiología de esta neoplasia. Este estudio nos sugiere que además de la alteración al nivel de los ganglios linfáticos y de los sitios extraganglionares del linfoma, existen alteraciones en las células seminales y/o en el estroma medular.

Para poder realizar una reconstitución hematopoyética y poder esclarecer algunos de los mecanismos que están influyendo en la hematopoyesis de estos pacientes se podrían realizar cultivos quiméricos de células de progenitores hematopoyéticos de sujetos sanos con estroma medular proveniente de pacientes con linfoma y viceversa. Si la alteración proviene de las células progenitoras hematopoyéticas, se podría hacer un análisis con una población pura de células CD34+ Thy-1+ lin- para poder valorar la capacidad de proliferación sostenida y la diferenciación y el mantenimiento de células con un alto potencial proliferativo.

Este trabajo también se podría extender hacia aquellas moléculas que participan en las interacciones celulares como pueden ser ciertos receptores de la matriz extracelular, por ejemplo CD44, que pueden estar alterando ciertas interacciones y/o si existe una mayor o menor expresión de los receptores de integrina β -1. Recientemente se ha reportado que bajo ciertas condiciones fisiológicas de SCF, e IL-3, el compromiso de las integrinas impide que las células CD34+ entren en la fase S, que a su vez está asociado con niveles elevados de los inhibidores de las ciclina-cinasas dependientes p27. Esto a su vez nos conduce a valorar los niveles de apoptosis que están sucediendo en este tipo de pacientes, como puede ser el gene de la familia Bcl-2 o bien determinar tanto los antagonistas incluyendo BCL-2 BCL-X_L MCL-1 A1 o los agonistas como son BAX, BAK, BAD y BCL-X_S, es decir valorar la formación de heterodímeros de estas moléculas y medir los niveles de muerte celular o supervivencia celular.

También se podría determinar la capacidad de migración de las células CD34+ ya sea de sangre periférica a médula ósea o viceversa, a través de los factores derivados de las células estromales 1 (SDF-1 de *Stromal cell-derived*

factor -1) que es una quimocina producida por las células estromales de la médula ósea que inducen la migración de las células seminales a su "homing". Estos mecanismos todavía no están bien comprendidos, pero esta entidad nosológica puede ayudar a esclarecer estos mecanismos.

12. REFERENCIAS

1. Abramson N. 1982. Phase III study of intermittent carmustine BCNU) cyclophosphamide and prednisone versus melphalan and prednisone in multiple myeloma. *Cancer Treat. Rep* 66:1273
2. Agglicetta M., Piacibello W., Sanavio F. 1989. Kinetics of human hematopoietic cells after in vivo administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J. Clin. Invest.* 83:551-557.
3. Akira S, Taga T, Kishimoto T. 1993. Interleukina-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol*; 54 :1-78
4. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Biology and Molecular Cell.* 3th Edition. 1996.
5. Alexanian R., Salmon S., Bonnet J. 1977. Combination therapy for multiple myeloma. *Cancer.* 40:2765
6. Al-Fiar F., Prince HM., Imrie K., Stewart AK., Crump M., Keating A. 1997. Bone marrow mononuclear cell count does not predict neutrophil and platelet recovery following autologous bone marrow transplant: value of the colony-forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) assay. *Cell Transplant.* 6 (5): 491-5.
7. Allegra CJ. Antifolates In: Chabner BA. Eds. *Cancer Chemotherapy and radiotherapy: principles and practice.* Philadelphia. Lippincott-Raven 109.
8. Andrews R.G., Singer JW. and Bernestein ID. 1990. Human hematopoietic precursors in long term culture: Single CD34+ cells that lack detectable T cell, B cells, and myeloid cell antigens produce multiple colony forming cells when cultured with marrow stromal cells. *J. Exp. Med.* 172: 355-360
9. Anklesaria P, FitzGerald TJ, Kase K, Ohara A, Greenberger JS. 1989. Improved hematopoiesis in anemic Sl/Sd mice by therapeutic transplantation of a hematopoietic stem cells in continuous mouse bone marrow culture. *Blood* 1989 Aug 15;74(3):1144-1151
10. Armitage J.O. 1997. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non Hodgkin's Lymphoma. By the Non Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood.* Vol. 89. N° 11. 3909-3918.
11. Armitage J.O. 1986. Chemotherapy for diffuse large cell lymphoma : Rapidly responding patients have more durable remissions. *J. Clin. Oncol.* 4 :160.

12. Armitage J.O. 1984. Long Term remission durability and functional status of patients treated for diffuse histocytic lymphoma with the CHOP regimen. *J. Clin. Oncol.* 2 :898
13. Ashman L.E., Cambareri AC, To LB, Levinsky RJ., Juttner CA. 1991. Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow *Blood* 78:30
14. Bachur NR., Gordon SL., Gee MV. 1977. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res.* 38 :1745.
15. Bartley T.D., Bogenberger J., Hunt P., Li YS., Lu HS., Martin F., Chang MS., Samal B., Nichol J.L, Swift S. 1994. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell.* 77: 1117-24.
16. Bathia R., McGlave PB., Dewald GW., Blazar DB., Verfaillie M. 1995. Abnormal Function of the Bone Marrow Microenvironment in Chronic Myelogenous Leukemia: Role of Malignant Stromal Macrophages. *Blood* 85: 3636-3645.
17. Baum C.M., Weissman IL., Tsukamoto AS., Buckle AM. Peault B. 1992. Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc. Natl Acad Sci, USA.* 89:2804-2809
18. Bentley S.A. 1982. Bone marrow connective tissue and the haemopoietic microenvironment. *Br. J. Haematol.* 50(1):1-6.
19. Beutler B & Huffer C. 1994. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 264. 667-668
20. Bhavnani M., Morris Jones PH., Testa NG. 1989. Children in long-term remission after treatment for acute lymphoblastic leukaemia show persisting haemopoietic injury in clonal and long-term cultures. *Br. J. Haematol.* 71: 37-41.
21. Birg F., Coucoul M., Rosnet O., Bardin F., Pebusque MJ., Marchetto S., Tibilio A., Mannoni OP., Birnbaum D. 1992. Expression of the *fms/kit* like gene FLT3 in human acute leukemia of the myeloid and lymphoid lineages *Blood* 80:2584-2595

22. Boyd DB., Coleman M., Aish SW. 1988. CEOP-BLAM III infusions combination chemotherapy for diffuse large cell lymphoma *J. Clin Oncol.* 6: 425-433.
23. Boyum A. 1964. Separation of white blood cells *Nature* 204: 793-794.
24. Boyum A. 1968 Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 21 Suppl 97: 77-89
25. Broxmeyer HE., Williams DE., Lu L., Cooper S., Anderson SL., Beyer GS., Hoffman R., Rubin BY. 1986. The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitors cells from normal donors and patients with leukemia: Synergism of tumor necrosis factor and interferon γ . *J. Immunol.* 136: 4487-4492
26. Broxmeyer HE., Cooper S., Williams DE., Hangoc G., Gutterman JU and Vadhan S. 1988. Effects of purified recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor on growth characteristics of bone marrow hematopoietic progenitor cells in patients on a phase I clinical trial. *Exp. Hematology*: 16: 594-602.
27. Broxmeyer HE., Sherry B., Lu L., Cooper S., Carow C., Wolpe SD., Cerami A. 1989. Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells. *J. Exp. Med.* 170:1583.
28. Bühring HJ, Ullrich A., Schaudt K., Muller CA., Busch FW. 1991. The product of the proto-oncogene c-kit (p145 ^{ckit}) is a human bone marrow surface antigen of hematopoietic precursors cells which is expressed on a subset of non-lymphoblastic leukemic cells. *Leukemia* 5:854-859
29. Burges AW., Camakaris J., Metcalf D. 1977. Purification and properties of colony stimulating factor from mouse lung conditioned medium. *J. Biol. Chem.* 252: 1998-2003.
30. Burkitt D.P. 1983. The discovery of Burkitt's Lymphoma. *Cancer* 51, 1777-1781.
31. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. 1980. Characterization of Human Bone Marrow Fibroblast Colony forming Cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 56. 289-301

32. Caux AC., Moreau I., Sacland S., Banchereau J. 1992. Interferon γ enhances factor dependent myeloid proliferation of human CD 34⁺ hematopoietic progenitor cells *Blood* 79:2628-2638
33. Caux C., Sacland S., Favre C., Duvert V., Mannoni P., Banchereau J. 1990. Tumor necrosis Factor α strongly potentiates interleukin 3 and granulocyte macrophage colony stimulating factor induced proliferation of human CD 34⁺ hematopoietic progenitors cells. *Blood* 75:2292-2301
34. Civin Ci, Strauss L.C. Brovall C., Fackler M.J. Schwartz J.F., Shaper J.H. 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitors cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG1a cells. *J. Immunol.* 133: 157-165
35. Cordingley FT., Hoffbrand A.V., Heslop HE., Turner M., Bianchi A. Reitte JE., Vyakarna A & Brenner MK 1988. Tumor necrosis Factor as an autocrine growth factor for chronic B-Cell malignancies. *Lancet* 969-971
36. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March. CJ 1990. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci.* 15:265-70.
37. Cosman D. 1993 The hematopoietin receptor superfamily *Cytokine* 5 (2):95-106.
38. Craig W., Kay R., Cutler RL., Lansdorp PM: 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177: 1331
39. Chang C, 1996. BCL-6 a POZ/Zin Finger protein is a sequence specific transcriptional repressor. *PNAS* 93: 6947
40. Cheifetz S., Weatherbee JA., Tsang MLS. Andersen J.K. Mole J.E. Lucas R. and Massagué J. 1987. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48, 409-415
41. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature.* Jun 16, 369 :533-8.
42. De Vita VT. Jr. 1989. Lymphocytic lymphomas. In *cancer Principles and Practice of Oncology*. Lippincott.

32. Caux AC., Moreau I., Saeland S., Banchereau J. 1992. Interferon γ enhances factor dependent myeloid proliferation of human CD 34⁺ hematopoietic progenitor cells *Blood* 79:2628-2638
33. Caux C., Saeland S., Favre C., Duvert V., Mannoni P., Banchereau J. 1990. Tumor necrosis Factor α strongly potentiates interleukin 3 and granulocyte macrophage colony stimulating factor induced proliferation of human CD 34⁺ hematopoietic progenitors cells. *Blood* 75:2292-2301
34. Civin Ci, Strauss L.C. Brovall C., Fackler M.J. Schwartz J.F., Shaper J.H. 1984. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitors cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG1a cells. *J. Immunol.* 133: 157-165
35. Cordingley FT., Hoffbrand A.V., Hcslop HE., Turner M., Bianchi A. Reitte JE., Vyakarna A & Brenner MK 1988. Tumor necrosis Factor as an autocrine growth factor for chronic B-Cell malignancies. *Lancet* 969-971
36. Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG, March. CJ 1990. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci.* 15:265-70.
37. Cosman D. 1993 The hematopoietin receptor superfamily *Cytokine* 5 (2):95-106.
38. Craig W., Kay R., Cutler RL., Lansdorp PM: 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177: 1331
39. Chang C, 1996. BCL-6 a POZ/Zin Finger protein is a sequence specific transcriptional repressor. *PNAS* 93: 6947
40. Cheifetz S., Weatherbee JA., Tsang MLS. Andersen J.K. Mole J.E. Lucas R. and Massagué J. 1987. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48, 409-415
41. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al 1994. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature.* Jun 16, 369 :533-8.
42. De Vita VT. Jr. 1989. Lymphocytic lymphomas. In *cancer Principles and Practice of Oncology*. Lippincott.

43. Deffie AM, Batra JK, Goldenberg GJ : 1989. Direct Correlation between topoisomerase II Activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res.* 49:58-65
44. Del Canizo C, Lopez N, Caballero D, Fernandez E, Brufau A, Vazquez L, Mateos V, Gutierrez N, San Miguel JF. 1999. Hematopoietic damage persists 1 year after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation.* 23(9): 901-905.
45. Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., Asoian R.K., Roberts A.B., Sporn M.B. and Goeddel D.V. 1985. *Nature* 316, 701-705
46. Derynck Rik. 1994. *The cytokine Handbook* 2nd Edition.
47. Dexter T.M., Allen T.D., Lajtha L.G. 1977. Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* 91:335-344
48. Dexter, T.M., Spooncer E., 1987. Growth and differentiation in the hematopoietic systems *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:423-441
49. Digel W, Stefanic M., Schoniger W, Buck C., Raghavachar A, Frichofen N., Heimpel H & Porzsolts 1989. Tumor Necrosis Factor induces proliferation of neoplastic B-cells from chronic lymphocytic leukemia *Blood.* 73. 1242-1246
50. Eaves C.J., Cashman J., Eaves A.C. 1991. Methodology of Long-term culture of human hematopoietic cells. *J. Tiss. Cult. Meth.* 13:55-64
51. Eaves A.C. Cashman J.D., Gaboury L.A., Kalousek D.K., Eaves C.J. 1986. Unregulated proliferation of primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in the presence of normal marrow adherent cells. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 83:5306-5315
52. Emilie D., Wijdenes J., Gisselbrecht C., Jarrousse B., Billaud E, Blay J, Gabarre., Gaillard J.P. Brochier J. Raphael M., Boue F. Galanaud P 1992. IL-6 production in high grade B lymphomas: correlation with the presence of malignant immunoblast in acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect of lymphoma growth and on B clinical Symptoms. *Blood* 84. 2472-2479.
53. Epstein M.A., Achong B.G. : 1979. Discovery and general biology of the virus : In the Epstein Barr, eds. M.A. Epstein, Berlin : Spring.
54. Fisher R.I. 1989. Diffuse large cell lymphoma with discordant bone marrow histology. *Cancer* 64:1879-1883

55. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chávez J, Mayani H. 1999 Hematopoietic progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: in vitro colony growth and long-term proliferation. *Leuk Res* 23:385-94
56. Fukuhara S. et al., 1979. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res.* 39 :3119-3123
57. Galli SJ., Zsebo KM., Geissler EN. 1994. The kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunol.* 55:1-34
58. Gauldie J., Richards C., Harnish D. Landsorp P & Baumann H 1987. Interferon 32 B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte derived hepatocyte stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7251-7255.
59. Golde DW. 1991. The stem Cell. *Sci. Am.* 265 (6)86-93.
60. Graham GJ., Wright EG., Hewick R., Wolpe SD., Wilkie NM., Donaldson D., Lorimore S., Pragnell IB. 1990. Identification and Characterization of an inhibitor of hematopoietic stem cell proliferation. *Nature.* 344: 422-425
61. Grant SM, Heel R.C. 1992. Recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in the management of myelosuppression. *Drugs* 43: 516-560.
62. Greengberg J.S. 1991. Toxic Effects on the Hematopoietic Microenvironment. *Exp. Hematol.* 19: 1101-1109
63. Gupta P. McCarthy JB and Verfaillie CM. 1996. Stromal Fibroblast Heparan Sulfate is Required for Cytokine Mediated Ex vivo Maintenance of Human Long Term Culture Initiating cells. *Blood* 87. 3229-3236.
64. Gurney A.L., Gurney AL., Wong SC., Henzel WJ., de Sauvage FJ. 1995. Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5292-6
65. Gurney AL Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. 1994. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 265:1445-7
66. Hamum C., Culpepper J., Campbell D. McClanahan T., Zurawski S., Bazan JF., Kastelein R., Hudak S., Wagner J., Mattson J., Luh J., Duda G. Martina N., Peterson D., Menon S., Shanafelt A., Muenche M., Kelner G., Namikawa R.

- Rennick D., Lee F: 1994. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368: 643-645
67. Herauld O, Binet C, Degenne M, Desbois I, Heraud N, Colombat P, Domenech J. 1998. In vitro effect of stem cell factor on human clonogenic marrow progenitors after myeloablative treatments. *Eur. J. Haematol.* 61; 113-8.
68. Hiddermann W. Longo D.L. Coiffier B., Fisher RI., Cabanillas F., Cavalli F., Nadler LM., DeVita V. Lister A., Armitage JAO., 1996. Lymphoma Classification -The Gap Between Biology and Clinical Management is Closing. *Blood.* 88; 4085-4089
69. Hirano T. 1986. Interleukine-6 *Nature* 324:73-76
70. Hirano T. 1990. In *Peptide Growth Factors and their Receptors I*, Sporn M.B. and A.B. Roberts eds. Springer Verlag. NY p. 663.
71. Hirano T. Taga T. Nakano N. 1985. Purification to homogeneity and characterization of human B cell differentiation Factor (BCDF o BSFp-2) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 5490-4
72. Hirayama F. , Lyman SD., Clark SC, Ogawa M: 1995. The flt3 ligand supports proliferation of lymphohematopoietic progenitors and early B lymphoid progenitors. *Blood* 85: 1762-1772
73. Hirsch E. Iglesias A. Potocnik J., Hartmann & Fassler R. 1996. Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of B1 integrins. *Nature.* 380. 87-89
74. Huang E., Nocka K., Beier D., Chu T. U., Buch J., Lahm H.W. Wellner D., Leder P., Besner P. 1990. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor the gene product of the W locus. *Cell* 63: 225-235
75. Hynes RO. 1992. Integrins. Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-20
76. Ihle JN. IL-3 Peptide growth factors and their receptors. Sporn MB Roberts AB. Eds Springer-Verlag Berlin 1990 95/I 545-75
77. Ihle JN, Keller J., Oroszlam S., et al. 1983. Biological properties of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell stimulating activity and histamine producing cell factor activity. *J. Immunol.* 131: 282-287.

78. Jacobsen S.E.W., Veiby O.P. Myklebust J., Okkenhaug C., Lyman S.D. 1996. Ability of flt-3 ligand to Stimulate the in Vitro Growth of Primitive Murine hematopoietic Progenitors Is Potently and directly Inhibited by Transforming Growth Factor- β and Tumor Necrosis Factor- α . *Blood*, 87, 5016-5026
79. Juneja & Gardner. 1985 Functionally Abnormal Marrow Stromal Cells in Aplastic Anemia. *Exp. Hematol* 13 :194-199.
80. Kato H Kinoshita T., Suzuki S., Nagasaka T. Murate T., Saito H and Jotta T. 1996. Elevated serum interleukin-6 is derived from neoplastic lymphoid cells in patients with B-cell non Hodgkin's Lymphoma: correlation with extent of IL-6 expression and serum concentration. *Br. J. Haematology* 92:1014-1021
81. Keller JR., Jacobsen SEW., Dubois CM., Hestdal K., Ruscetti FW. 1992. Transforming growth factor β : A bi-directional regulator of hematopoietic cell growth. *Int. J. Cell Cloning* 10:2-9
82. Keller JR., Jacobsen SEW., Sill KT., Ellingsworth LR., Ruscetti FW. 1991 Stimulation of granulopoiesis by transforming growth factor B; Synergy with granulocyte/macrophage colony stimulating Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:7190-95.
83. Keller JR., Jacobsen SEW., Sill KT., Ellingsworth LR., Ruscetti FW. 1991. Transforming growth factor β stimulates the growth of primitive hematopoietic progenitors and inhibits the growth of LO-3 dependent myeloid leukemia cell lines. *J. Exp. Med.* 168:737.
84. Kinashi T., Springer TA. 1994b. Adhesion molecules in hematopoietic cells. *Blood Cells* 20:25.
85. Kinashi T., Springer TA. 1994a Steel Factor and c-kit regulate cell matrix adhesion. *Blood* 83: 1033-1043
86. Kinkade PW. 1992. Cell interaction molecules and cytokines which participate in B lymphopoiesis. *Baillieres Clin Haematol*. Jul; 5 (3): 575-598.
87. Kishimoto T. 1989. The biology of IL-6. *Blood* 74 1-10
88. Klark S.C. and Kamen R. 1987. The Human Hematopoietic Colony Stimulating Factors. *Science* 236 :1229-1230
89. Krantz SB. 1991. Erythropoietin. *Blood* 77: 419-434

90. Kuter D.J., Beeler D.L. and R.D. Roscner 1994. The purification of megapoeitin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 11104-8
91. Kuznetsov SA 1997. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. Br. J. Haematol. 97: 561-569
92. Lanotte M., Metcalf D. Dexter M. 1982. Production of monocyte/macrophage colony stimulating factor by preadypocyte cell lines derived from murine marrow stroma. J. Cell Physiol 112: 123-127.
93. Lansdorp P. Dragowska W. 1992. Long Term erythropoiesis from constant numbers of CD34+ cells in serum free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. J. Exp. Med. 175: 1501-1507
94. Lansdorp P. Dragowska W. Mayani H. 1993. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. J. Exp. Med. 178:787
95. Lansdorp P. Sutherland H. Eaves CJ. 1990. Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hematopoietic cell from human bone marrow. J. Exp. Med. 172: 363-372
96. LeBien Tucker W. Lymphopoiesis Chapter 5. Leukemia 1997.
97. Lcc F., Yokota T., Otsuka T. 1985 Isolation of a cDNA for human granulocyte-macrophage colony stimulating factor by functional expression in mammalian cells. Proc. Natl Acad. Sci. 82: 4360-4364
98. Lee R. et al 1986. 10 year update of CHOP/bleo in the treatment of diffuse large cell lymphomas. J. Clin. Oncol. 4 : 1455-1460
99. Levine E.G. 1990. Cytogenetics of non Hodgkin's Lymphomas. JNCI 10 :7
100. Lin HY, Moustakas A, Knaus P, Wells RG, Henis YI, Lodish HF. 1995 The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. J Biol Chem 10;270(6):2747-54.
101. Lin JS, Tzeng CH, Hu HY, Yung CH. 1998. Factors affecting progenitor cell yields using three tandem leukaphereses in previously treated malignancies. Chung Hua I Hsueh Tsa Chih (Taipei). 1998 61:700-7.
102. Lok. S, Kaushansky K., Holly RD., Kuijper JL., Lofton-Day Ce, Oort PJ., Grant FJ., Heipel MD., Burkhead SK., Kramer JM., Bell LA., Sprecher CA., Blumberg H., Johnson R., Prunkard D., Chin AFT, Mathews SL., Bayley MC., Forstrom JW, Buddle MM., Osborn SG., Evans SJ., Sheppard PO., Presnell

- SR., O'Hara PJ.; Hagen FS., Roth GJ., and Foster DC., 1994. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369: 565-568
103. Lopez-Karpovitch X., Cardenas MR., Lobato-Mendizabal E., Piedras J. 1989 Granulomonopoiesis and Production of Granulomonopoietic Regulator Factors in Hodgkin's Disease and Non Hodgkin's Lymphomas.. *Annal New York Academy of Sciences*. 241-247.
104. Lowell Clifford. *Fundamentals of Blood Cell Biology*. Chapter 1. Stites DP. Terr AI., Parslow TG. 1998. *Medical Immunology*. 9th Ed. Appleton & Lange. Stamford Connecticut.
105. Lyman SD, James L., Bos TV, deVries P., Brasel K., Gliniak B., Hollingsworth LT., Picha Ks., McKenna HJ., Splett RR, Fletcher FA. Maraskovsky E., Farrah T., Foxworthe D., Williams DE., Beckman MP. 1993. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor. A proliferative factor for primitive haematopoietic cells. *Cell* 75: 1157-1167
106. Lyman SD, James L., Johnson L., Brasel K., deVries P., Escobar SS. Downey HSplett RR, Beckman MP ., McKenna HJ. 1994. Cloning of the human homologue of the murine flt-3 ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of hematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368: 643-645
107. Magrath IT. 1991. African Lymphoma. History, Biology, Clinical Features, and Treatment. *Am. J. Pediatric Hematol. Oncol.* 13 : 222-26
108. Marchall E.K. 1964. Historical Perspectives in Chemotherapy in Goldin A. Hawking IF., eds. *Advances in Chemotherapy Vol. 1* NY. Academic Press.
109. Massague J. 1990 The transforming growth factor β family. *Annu Rev. Cell Biol.* 6:597-620
110. Massagué J. 1992. Receptors for the TGF- β family. *Cell Jun* 26; 69: 1067-1070
111. Mayani H, Dragowska W, and Lansdorp 1993. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursors cells. *Blood* 81:3252-3258.

112. Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. 1993. Functional characterization of fibroblastic cells in long-term marrow cultures from patients with acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 7(10):1564-9
113. Mayani H, Guilbert L., Janowska-Wieczorek A. 1992. Biology of the hematopoietic microenvironment *Eur. J. Hematol.* 49 :225-233
114. Mayani H., Guilbert LJ., Janowska-Wieczorek A. 1990. Modulation of erythropoiesis and myelopoiesis by exogenous erythropoietin in human long term marrow cultures. *Exp. Hematol.* 18 :174-177
115. Mayani H., Lansdorp P. 1994. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitors cells from human cord blood. *Blood.* 83. 2410-7.
116. Mc Gee. JOD., Isaacson, P.G., Wright N.A., eds *Oxford Textbook of Pathology* Vol. 1 pp 236-258, y 321-347. Oxford 1992.
117. Mc Niece BIK Langley KE., and Zxebo KM., 1991b. The role of recombinant stem cell factor in early B cell development: Synergistic interaction with IL-7. *J. Immunol.* 146: 3785-3790.
118. McKeithan T.W. 1990. *Molecular Biology of non Hodgkin's lymphomas.* *Semin. Oncol* 17, 30.
119. McNiece BIK and Robert A 1996. *Briddell Blood Cell Biochemistry Volume 7: Hematopoietic Cell Growth Factors and their Receptor*, edited By A.AD.
120. McNiece BIK., Langley KE. and Zsebo KM 1991^a. Recombinant human stem cell Factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp. Hematol* 19: 226-231.
121. McNiece I., Glaspy J., Le Maistre., F. Briddell R., Menchaca D., and Shpall EJ., 1993. Effect of recombinant methionyl human stem cell Factor (rhSCF) and rh(G-CSF) on mobilization of peripheral blood progenitors cells: Preliminary laboratory results from a phase I/II study. *Blood* 82 (Suppl:84)
122. Metcalf D., and Moore MAS 1971. *Haemotopietic Cells.* North-Holland Publishing Co. Amsterdam pp.550.
123. Metcalf D. 1993. Hematopoietic regulators: Redundancy or subtlety. *Blood* 82: 3515-21
124. Miyazono K., Hellman U. Wernstedt C, and Heldin C H. 1988. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification

- from human platelets and structural characterization *J. Biol. Chem.* 263 6407-6415
125. Moore MAS: 1991. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulator. *Blood* 78:1-15
126. Moscow JA., Cowan KH: 1988 Multidrug resistance. *JNCI* 80: 14
127. Muggia FM., Chia G., Reed LJ., Rommcy SL., 1977. Doxorubicin-cyclophosphamide effective chemotherapy for advanced endometrial adenocarcinoma. *J. Obstet Gynecol.* 128:314-17
128. Nagata Y., Nagahisa H., Nagasawa T., Todokoro K. 1997. Regulation of Megaryocytopenesis by thrombopoietin and stromal cells. *Leukemia* April 11 Suppl.: 435-438.
129. Namen A.E. Widmer MB., Voice R. Christenesen S., Braddy S., Lyman SD., and Williams DE. 1991. A ligand for the c-kit proto-oncogene (MGF) stimulates lymphoid progenitor cell in vitro. *Exp. Hematol.* 19: 497-501
130. Ogawa M: 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844-2854
131. Ole P. Veiby, Jacobsen FW., Cui L., Lyman SD., Jacobsen SEW. 1996. The flt-3 Ligand Promotes the survival of primitive hematopoietic Progenitors Cells with myeloid as Well as B Lymphoid Potential. *The J. Immunology.* 157:2953-2960.
132. Pelicci P-G et al. 1986. Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Lymphomas. *P.N.A.S. U.S.A.* 83 :2984-2989
133. Polotskaya A. Zhao Y, Lilly MB AND Kraft A.S 1994. Mapping the intracytoplasmic regions of the alpha granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor necessary for the cell growth regulation, *J. Biol. Chem.* 269: 14607-13
134. Radfordd J.A. Testa NG & Crowther D. 1990. The long term effects of MVPP chemotherapy for Hodgkin's disease on bone marrow function. *British J. Cancer* 62 127-132
135. Ramsfjell V., Borge OJ., Cui L., Jacobsen SE. 1997. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34+ CD38-) human bone marrow progenitor cells: distinct

- and key interactions with the ligands for c-kit and flt-3, and inhibitory effects of TGF-beta and TNF-alpha. *J. Immunol.* 158: 5169-77.
136. Rappaport H. 1956. Follicular Lymphoma. A reexamination or its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer* 9 :792-795
 137. Rappaport H. 1966 Tumors of the hematopoietic-lymphoid system. Atlas the tumor Pathology Section 3, Fascicle 8 Arm. Forced Inst. of Pathology, Washington. DC.
 138. Rice A, Reiffers J, Bernard P, Foures C, Bascans E, Lambe F, Marit G, Broustet A. 1992. Incomplete stroma formation after allogenic marrow or autologous blood stem cell transplantation. *Nouv Rev Fr Hematol.* 34: 167-174.
 139. Richardson M.E. et al. 1987. Intermediate to high grade histology of lymphomas carryng t(14;18) is associated with additional nonrandom chromosome changes. *Blood.* 70 :444-454
 140. Rosenberg S.A. et al., 1982. National Cancer Institute sponsored study classifications of non Hodgkin's Lymphomas : *Cancer* 49 : 2112-2116
 141. Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S., Rappold I., Lavagna C., Santy D., Arnoulet C., Chabannon C. 1996. FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells *Leukemia* 10:238-243
 142. Sakamoto KM, Fraser J.K, Lee H.J, Lehman E, y Gasson JC. 1994 Granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human egr 1 promoter. *Mol. Cell Biol.* : 14: 5975-85.
 143. Salles G., Bievenu J., Bastion Y., Barbier Y., Doche C., Warzocha K., Gutowski M. Rieux C., Coiffier B., 1996. Elevated circulating levels of TNF-a and its p55 soluble receptor are associated with an adverse prognosis in lymphoma patients. *Br J Haematol.* 93; 352-9.
 144. Sautois B. Fraipont V, Baudoux E., Fassotte MF., Hermanne J.P. Jerusalem G. Bours V. Bosquee L. Schaaf-Lafontaine N., Paulus JM., Sondag D., Fillet G., Beguin Y. 1999 Peripheral blood progenitor cell collections in cancer patients: analysis of factors affecting the yields *Haematologica.* 84:342-9

145. Schimpl A., Wecker E. 1972. Replacement of a T cell function by a T cell product. *Nature*; 237: 15-17
146. Shaklai M. Cellular components of stroma *in vivo* in comparison with *in vitro* systems, In Tavassoli M. ed. *Handbook of the hematopoietic microenvironment*, Human Press Inc, 1989. 219-251.
147. Sherr C.J. Rettenmeier CW., Sacca R., Roussel R., Look At. Stanley E.R., 1985. The *c-fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor *Cell*. 41:665-676
148. Shipp MA., Harrington DP, Klatt MM. 1986. Identification of major prognostic subgroups of patients with large cell lymphoma treated with m-BACOP or M-BACOD. *Ann Intern Med.*: 104: 757-765
149. Sieff C.A. 1987 *Hematopoietic Growth Factors*. *J. Clin Invest.* Vol. 79. 1549-1557.
150. Silvennoinen MD. 1996. *Signaling by The hematopoietic Cytokine Receptors*. De. Chapman & Hall U:S and Canada
151. Silvennoinen Olli. *Signaling by The Hematopoietic Cytokine Receptors*. Chapman&Hall. Ed. 1996
152. Skarin AT., Rosenthal DS., Moloney WC., Frei E. 1977. Combination chemotherapy of advanced non Hodgkin's Lymphoma with bleomicina, Adriamycin, cyclophosphamide, vincristine and prednisone (BACOP) *Blood*. 29: 759-765
153. Soligo DA, Lambertenghi Deliliers G, Servida F, Quirici N, Campiglio S, Tagliaferri E, Oriani A, Romitti L, Della Volpe A, Annaloro C. 1998. Hematopoietic abnormalities after autologous stem cell transplantation in lymphoma patients. *Bone Marrow Transplant*. 21:15-22.
154. Sutherland D.R. Keating A. 1992. The CD34 antigen: Structure, Biology and potential clinical applications. *J. Hematotherapy* 1:115-118
155. Sutherland H.J. Lansdorp P. M., Henkelman D.H. Eaves A.C. Eaves C.J. 1990. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 87:3584-90
156. Takatsu AK., Tominanga A., Hamaoka T. 1980. Antigen-induced T cell replacing Factor (TRF) I. Functional characterization of a TRF producing

- helper T cell subset and genetic studies on TRF production. *J. Immunol.* 124: 2414-2422.
157. Takatsu K, Takaki S., Hitoshi Y. 1994. Interleukin-5 and its receptor system: implication in the immune system and inflammation. *Adv. Immunol;* 57: 145-90
158. Tavassoli M. 1991 Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells* 17:269-74
159. Tavassoli M., Friedenstein A. 1983. Hemopoietic stromal microenvironment. *Am. J. Hematol*, 15: 196-203
160. Tertappen LW. Huang S., Safford M., Lansdorp P., Loken M. 1991. Sequential generation of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 77: 1218-1221
161. Testa N.G. and Molineux G. Haemopoiesis. 1993. A practical Approach Series. Oxford University.
162. Till J.E and McCulloch E.A. 1961 A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells *Rad. Res.* 14:213-17
163. Till J.E., McCulloch E.A. Siminivitch L. 1964. A stochastic model of stem cell proliferation bases on the growth of spleen colony-forming cell. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 51: 29-32
164. Tracey KJ. 1994. Tumor Necrosis Factor -Alpha. *The Cytokine Handbook.*
165. Tsujimoto Y. Et al. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic cells with the t(14 ;18) chromosome translocation. *Science* 226 : 1098-1099
166. Udomsakdi C., Eaves C. Sutherland H.J. Lansdorp PM: 1991. Separation of functionally distinct subpopulations of primitive human hematopoietic cells using rhodamine 123. *Exp. Hematol.* 19:338-41
167. Ullrich A., Schelessinger J. 1990. Signal Transduction by receptors with tyrosine kinase activity *Cell* 61:203-213
168. Vadhan Raj S., Brroxmeyer HE., Hittelman WN. 1992. Abrogating chemotherapy induced myelosuppression by recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor: protection at the progenitor level. *J. Clin Oncol.* 10: 1266-1277.
169. Verfallie C., Blakolmer K., Mc Glave P. 1990. Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long term in vitro repopulating capacity

- adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J. Exp. Med.* 172: 509-15.
170. Vigon I, Florindo C, Fichelson S, Guenet JL, Mattei MG, Souyri M, Cosman D, Gisselbrecht S. 1993. Characterization of the murine Mpl proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. *Oncogene* 8:2607-15
171. Vittolo U. 1997 *Cancer Genetic Cytogenetic Sep.*(2) 114-118
172. Vrhovac R., Kusec R., Jaksic B. 1993. Myeloid hemopoietic growth factors. *Int. J. Clin. Pharmacology Therapy and Toxicology.* 31: 241-252
173. Wathen LM. 1982 Residual injury to the hematopoietic microenvironment following sequential radiation and busulfan. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8:1315-1319
174. Webb IJ Eickhoff CE, Elias AD., Ayash LJ, Wheeler CA, Schwartz GN, Demetri GD, Anderson KC 1996. Kinetics of Peripheral blood mononuclear cell mobilization with chemotherapy and/or granulocyte-colony stimulating factor: implications for yield of hematopoietic progenitor cell collections. *Transfusion.* 36: 160:7
175. Weiss L., de. *Cell and Tissue Biology. A textbook of histology 6th de.* Pp. 423-478. Baltimore. Urban and Schwarzenberg 1988
176. Wendling F., Maraskovsky E., Debili N., Florindo C., Teepe M., Titeux M., Methia N., Breton-Gorius J., Cosman., Vainchenker W., 1994. C-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 369;571-573
177. Williams DE., Eisenman J., Baird A., Rauch C., Van Ness K., March CJ., Park LS., Martin U., Mochizuki DY, Boswell HHS., Burgess GS., Cosman D., Lyman SD. 1990. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* 63: 167-177
178. Wintrobe MM *Clinical Hematology.* 9th de. USA 1996.
179. Wintrobe MM. *Blood, Pure and eloquent* New York. McGraw Hill 1980.
180. Wu. H. Liu X., Jaenisch R. 1995. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or erythropoietin receptor. *Cell.* 83: 59-67
181. Yang E and Korsmeyer S.J. 1996. Molecular Thanatopsis: A Discourse on the BCL-2 Family and Cell Ceath. *Blood.* 88: 386-401

182. Young MR, Halpin J. Hussain R. 1993. Inhibition of tumor production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by 1 alpha 25 dihydroxvitamin D3 reduces tumor motility and metastasis. *Invasion Metastasis*; 13: 169-77.
183. Yunis J.J. et al., 1989. bcl and other genomic alterations in the prognosis of large cell lymphoma. *New England. J. Med.* 320 :1047-1053
184. Zeigler F. Bennet B., Jordan C., Spencer S., Baumheuter S., Carroll K., Hooley J., Bauer K., Matthews W. 1994. Cellular and molecular characterization of the role of the FLK2/FLT3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells *Blood* 84:2422-2432
185. Zsebo KM., Wypych J., McNiece IK., Lu HS., Smith KA., Karkare SB., Sachdev RK., Yuschenkoff VN., Birkett NC, Williams LR., Satyagal VN., Tung W., Bosselman RA., Mendiaz EA., Langley KE., 1990. Identification purification and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver conditioned medium. *Cell* 63: 195-201
186. Zucker M.B. 1980. The functioning of blood platelets. *Sci. Am.* 242: 86-103.
187. Zuckerman K.S. et al 1989. The hematopoietic extracellular matrix. In *The Handbook of the hematopoietic microenvironment.* Tavassoli M. De Human Press Inc 399.

13. APENDICE

In Vitro Hematopoiesis in Patients with Malignant Lymphoma During Active Disease and at Complete Clinical Remission After Chemotherapy

ALEJANDRA HUERTA-ZEPEDA^a, ALEJANDRA TALAVERA^b, AGUSTÍN AVILÉS^b, NATIVIDAD NERI^{1b} and HECTOR MAYANI^{1a*}

^aOncological Research Unit and ^bDepartment of Hematology, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Mexico City

(In final form May 30, 2000)

Malignant lymphomas are neoplastic diseases of lymphoid cells, which usually originate in the lymph nodes. During the last two decades, significant progress has been made in the characterization of chromosomal and molecular alterations in these malignancies. To date, however, the composition and function of the hematopoietic system in this group of hematological disorders is still not fully understood. In the present study, we have determined the progenitor cell content in 10 patients with diffuse large-cell lymphoma (DLCL) and characterized the proliferation of these cells in long-term marrow cultures. We have also addressed some issues regarding the composition and function of the hematopoietic microenvironment in this malignancy. All the patients included in this study showed normal hematological parameters in peripheral blood, both before and after chemotherapy, however, significant hematopoietic alterations were consistently observed. As compared to normal subjects, lymphoma patients showed a 35% reduction in progenitor cell numbers, including myeloid, erythroid and multipotent progenitors. The in vitro proliferation of these cells was also deficient, since their levels in long-term marrow cultures were significantly lower than those observed in normal bone marrow cultures. Fibroblastic progenitors were reduced by >50% and this correlated with a deficient adherent cell layer development in culture. A reduction was also seen in the levels in culture supernatant of the stimulatory cytokines Stem Cell Factor and Interleukin-6. Interestingly, all the hematopoietic alterations mentioned above were still present in patients at complete clinical remission after chemotherapy. Thus, in the present study we have demonstrated significant in vitro deficiencies in the composition and function of the hematopoietic system in patients with diffuse large-cell lymphoma, both during active disease and at the time of complete clinical remission.

Keywords: Bone Marrow, Hematopoiesis, In Vitro, Lymphoma, Progenitors, Stroma

* Correspondence: Hector Mayani, PhD, Oncological Research Unit, Oncology Hospital, National Medical Center, IMSS, Av. Cuauhtemoc 330 Col. Doctores, Mexico, D.F. 06720 MEXICO. Phone (52-5) 578 6174 Fax (52-5) 761 0952 e-mail: hmayani@conacyt.mx

INTRODUCTION

Malignant lymphomas are a heterogeneous group of hematological disorders of B or T cells, that usually originate in the lymph nodes. The majority of lymphomas are derived from B lymphocytes; less than 10% are derived from T cells and a similar proportion have neither B- nor T-cell markers.^[1,2] The tumor consists of a clone of lymphoid cells in which maturation is blocked at a particular stage of development with an inability to proceed beyond it. Thus, lymphoma cells are the neoplastic counterpart of naive, activated or memory normal B cells.^[3] Patients with malignant lymphoma are usually treated with combination chemotherapy, as the main type of treatment,^[4,5] sometimes supplemented with colony-stimulating factors,^[6] interferon- α ^[7,8] or hematopoietic cell transplantation.^[9]

Cytogenetic and molecular alterations are commonly observed in patients with malignant lymphoma.^[10] These alterations may involve the *c-myc* and *bcl-6* proto-oncogenes,^[10,11] the *p16* tumor suppressor gene,^[12] and other genes that directly participate in the apoptotic process. Indeed, the t(14;18)(q32;q21) chromosomal translocation can be observed in the vast majority of patients with malignant lymphoma. This results in increased transcription and expression of the *bcl-2* protein, a molecule involved in preventing apoptosis.^[13] Alterations in the *Fas/CD95* membrane protein and its ligand (*Fas-L*) have also been documented in a significant proportion of patients.^[14,15]

To date, however, information on the status of the hematopoietic system (i.e., hematopoietic progenitors and microenvironment) in malignant lymphoma is still scanty. Thus, in order to gain new insights into the biology of this group of hematological disorders, in the present study we have characterized the composition and functional integrity in vitro of the hematopoietic system from 10 lymphoma patients, both during active disease and at the time of complete clinical remission after chemotherapy. Since malignant lymphoma comprises a variety of clinical subtypes with different grades of severity,^[1,2] in this study we have only included patients with similar clinical sta-

tus. Accordingly, all 10 patients analyzed were patients with intermediate-grade Diffuse Large Cell Lymphoma (DLCL).

MATERIALS AND METHODS

Cell collection

Bone marrow (BM) cells, collected according to institutional guidelines, were obtained at the Oncology Hospital, National Medical Center, Mexico City, from 10 newly diagnosed patients with Diffuse Large Cell Lymphoma (DLCL), with no evidence of marrow infiltration (as determined by aspirate/biopsy analysis). Diagnosis was established according to both the Working Formulation and REAL criteria.^[1,2] Patients were treated with combination chemotherapy (CEOP/bleo, 6 cycles), as described in detail elsewhere.^[16] One of the patients died from disease complications, another one moved outside Mexico City, and two more never came back to the Hospital, so we were not able to obtain BM samples from any of them after treatment. From the other six patients, BM samples were obtained at the time of complete clinical remission after chemotherapy. Table I shows the clinical and hematological parameters of the patients before and after treatment. Normal BM samples were also obtained from the iliac crest of 8 BM transplant donors (20–45 years old), at the "Bernardo Sepulveda" Hospital, National Medical Center, and from the sternum of two hematologically normal patients (52 and 57 years old, respectively) undergoing cardiac surgery at the Cardiology Hospital, National Medical Center, Mexico City.

Cell processing

Buffy coat cells from BM were obtained by centrifugation (400 g for 7 min.) and low-density mononuclear cells (<1.077 g/ml) were isolated using Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Cells were then resuspended in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with

2% Fetal Bovine Serum (FBS; StemCell Technologies Inc. [STI], Vancouver, BC, Canada). Total numbers of nucleated and viable cells were determined with a hemocytometer, using Turck's solution and trypan blue stain, respectively.

Hematopoietic colony assays

Hematopoietic progenitor cells were assayed in methylcellulose-based semisolid cultures (STI, Vancouver, Canada). The culture medium consisted of 0.9% methylcellulose, 30% fetal bovine serum (FBS), 1% bovine serum albumin, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 50 ng/ml recombinant human (rh) stem cell factor (SCF), 10 ng/ml rh Interleukin-3 (IL-3), 10 ng/ml rh granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and 3 U/ml rh erythropoietin (EPO). Low-density mononuclear cells were plated at a final concentration of 5×10^4 cells/ml and the cultures were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. Non-adherent and adherent cells from long-term cultures were also cultured in this manner; however, the plating cell concentration varied from 5×10^4 to 1×10^4 cells/ml, depending on the cell number recovered from the cultures. After 14 – 17 days of culture, colonies were scored in the same dish using an inverted microscope. Hematopoietic colonies were classified as follows: CFU-MIX, colonies containing both erythroid and myeloid cells; CFU-E, erythroid clusters of 20 – 50 hemoglobinized cells; BFU-E, erythroid colonies of more than 50 hemoglobinized cells grouped in one or several clusters. Myeloid colonies comprised the identifiable subpopulations of pure granulocytic colonies (CFU-G), pure macrophagic colonies (CFU-M), and colonies containing both granulocytes and macrophages (CFU-GM). The criteria for colony identification was based on previous studies.^[17,18]

Long-term marrow cultures

Dexter-type long-term marrow cultures (LTMC) were established as previously described.^[18] Low-density mononuclear cells were resuspended in LTMC

medium (STI, Vancouver, Canada) at a final concentration of 3×10^6 cells per ml. The LTMC medium composition is as follows: Alpha medium supplemented with 12.5% horse serum, 12.5% FBS, 0.2 mM inositol, 20 μM folic acid, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, and freshly dissolved hydrocortisone to yield a final concentration of 10^{-6} M. The cell suspension was loaded into 24-well plates (1 ml/well) and incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. After 3 days, cultures were transferred to a different incubator and maintained at 33°C. Four days later (7 days after initiation of the culture) one-half of the supernatant and nonadherent cells were removed from the wells and replaced with fresh culture medium. The cultures were processed in this manner at weekly intervals. The nonadherent cells, obtained weekly during medium change, were counted, morphologically analyzed and assayed for hematopoietic progenitors. At weeks 3, 5 and 7 one of a number of parallel cultures was sacrificed for evaluation of the adherent cells. These were detached with a cell scraper after trypsinization (i.e., 0.25% trypsin containing 0.1 mM EDTA was added and the cultures were incubated at 37°C for 10 min; the action of trypsin was stopped by adding one-half volume of FBS). The cells were then resuspended in IMDM with 2% FBS and processed in the same way as the nonadherent cells.

Fibroblast colony-forming unit (CFU-F) assay

BM-derived fibroblast colony-forming units (CFU-F) were assayed according to the method described by Castro-Malaspina et al.^[19] BM mononuclear cells were inoculated, at 3×10^5 cells/ml, in 35-mm petri dishes, containing 1 ml of IMDM and 20% FBS. The cultures were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air. After 3 days, the non-adherent cells were removed and the medium was changed. The cultures were returned to the incubator for a further 7 days. At the end of the period, the medium was discarded and the adherent cells were stained with Wright-Giemsa. Clones of >50 fibroblasts were scored as fibroblastic colonies.

TABLE I Clinical data on the 10 patients with diffuse large cell lymphoma included in this study

Patient	Sex	Age (years)	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dl)	Leukocytes ($\times 10^9/l$)	Platelets ($\times 10^9/l$)
1	F	69	46	12.0	4.5	180
2	M	69	42/44 ^a	14.4/13.6	5.5/6.1	267/272
3	F	50	40/42	13.1/12.5	7.6/2.6	267/196
4	M	51	37/40	12.0/13.0	5.5/6.0	164/120
5	M	48	40	11.6	6.5	272
6	M	48	50	16.3	5.7	207
7	M	48	41/41	13.8/13.0	7.4/8.5	150/620
8	F	58	33	10.4	6.0	330
9	M	50	47/46	14.0/14.0	5.0/5.0	250/250
10	M	57	41/40	13.0/13.8	3.2/3.1	114/101

a. Indicate parameters before/after chemotherapy. Data after chemotherapy correspond to the time when the patients were in complete clinical remission and were obtained 6 - 12 months after chemotherapy.

Cytokine levels

The levels of Stem Cell Factor (SCF), Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), present in LTMC supernatants, were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; using commercial kits from R&D Systems, Minneapolis, MN). The limit of detection of each ELISA kit was as follows: SCF = 4.0 pg/ml; IL-6 = 0.09 pg/ml; TNF- α = 0.18 pg/ml.

Statistics

Statistical analysis was performed by using the Mann-Whitney U test and the Wilcoxon W test.

RESULTS

Hematological status of patients

A total of 10 patients with DLCL were studied before chemotherapy. This series included 7 males and 3 females, aged 48 - 69 years. Most of them showed hematological values within the normal range (Table I). Only patient 8 showed reduced hematocrit and hemoglobin levels, and patient 10 showed subnormal levels of leukocytes and platelets. After chemother-

apy treatment, no significant changes were observed in the hematological parameters of most patients. Only patient 3 showed a significant reduction in leukocyte counts and patient 7 showed a significant increase in platelet numbers

Colony-forming cell (CFC) content

Hematopoietic progenitors capable of forming colonies in semisolid cultures (CFC) were determined in normal subjects and DLCL patients (before and after chemotherapy) at the time of marrow sampling. As compared to normal BM, a 35% reduction in relative CFC numbers was observed in DLCL patients before treatment (Table II). Such a reduction was similar for myeloid, erythroid and multipotent progenitors, thus the relative proportions of these cells were similar to those in normal subjects (i.e., myeloid progenitors = 54%; erythroid progenitors = 45%; multipotent progenitors = 1%). Among myeloid progenitors, 70% of them corresponded to CFU-G, 22% corresponded to CFU-M and 8% corresponded to CFU-GM. These proportions were similar to those observed in normal BM. In terms of erythroid progenitors, 36% of them corresponded to CFU-E and 64% corresponded to BFU-E. These proportions were also similar to those in normal BM.

TABLE II Colony-forming cell content* in normal subjects and in patients with diffuse large cell lymphoma

Marrow Sample	Myeloid	Erythroid	Multipotent
Normal Bone Marrow (n=10)	238 [129-422]	188 [106-285]	4 [1-22]
Lymphoma Before chemotherapy (n=10)	156 ¹ [23-218]	132 [16-290]	2 [0-17]
Lymphoma After chemotherapy (n=6)	144 ¹ [18-300]	75 ^{1,2} [24-290]	1 ¹ [0-6]

*Results represent median [range] of the indicated number of samples and correspond to the number of progenitor cells per 10^5 mononuclear cells.

¹p<0.025 as compared to normal BM

²p<0.05 as compared to lymphoma before chemotherapy

TABLE III Total number of myeloid progenitors (non adherent + adherent) in LTMC from normal subjects and patients with diffuse large-cell lymphoma

Day	Normal Bone Marrow (n=10)	DLCL before Chemotherapy (n=10)	DLCL after Chemotherapy (n=6)
0	7150 [3870-12660]	4680 [690-6540] ^a	4320 [540-9000] ^a
21	1168 [72-3288]	344 [23-1392] ^a	208 [1-528] ^a
35	358 [96-932]	19 [0-292] ^a	24 [1-41] ^a
49	172 [12-138]	11 [0-48] ^a	4 [0-12] ^a

Results represent median [range] of the indicated number of samples and correspond to the number of progenitor cells per well.

a. p<0.025 as compared to normal BM cultures on the same day.

In patients at complete remission, myeloid progenitor levels were similar to those observed during active disease (Table II). The relative proportions of CFU-G, CFU-M and CFU-GM also remained with no significant changes (75%, 23% and 2%, respectively). In terms of erythroid progenitors, there was a 44% reduction in the median numbers of these cells, as compared to those in active disease (Table II). There were also changes in the relative proportion of early (BFU-E) and late (CFU-E) progenitors, since the former corresponded to 46% (as compared to 64% in active disease) and the latter corresponded to 54% (36% in active disease). Finally, the total numbers of multipotent progenitors at complete remission were slightly lower, although not statistically significant, than those observed during active disease (Table II).

Progenitor cell kinetics in LTMC

In order to assess some functional aspects of hematopoietic progenitor cells (HPC) from DLCL patients, both before and after chemotherapy, we followed the

proliferation kinetics of myeloid, erythroid and multipotent progenitors in LTMC for a 7-week culture period.

Myeloid progenitors

During weeks 2 and 3 of culture, the median levels of non-adherent myeloid progenitors were similar both in normal and DLCL cultures (Figure 1A). However, from week 3 and throughout the rest of the culture period, the levels of myeloid progenitors in the cultures of lymphoma patients were significantly lower than in normal LTMC. It is noteworthy that from week 1 to week 5, no significant differences were observed between LTMC from patients before and after chemotherapy. However, on weeks 6 and 7 we could not see any progenitor cells in cultures of patients after chemotherapy, whereas these cells were still present -at very low levels- in LTMC from patients before treatment (Figure 1A).

Adherent myeloid progenitors were evaluated on weeks 3, 5 and 7. At all time points analyzed, progenitor levels in lymphoma cultures were significantly

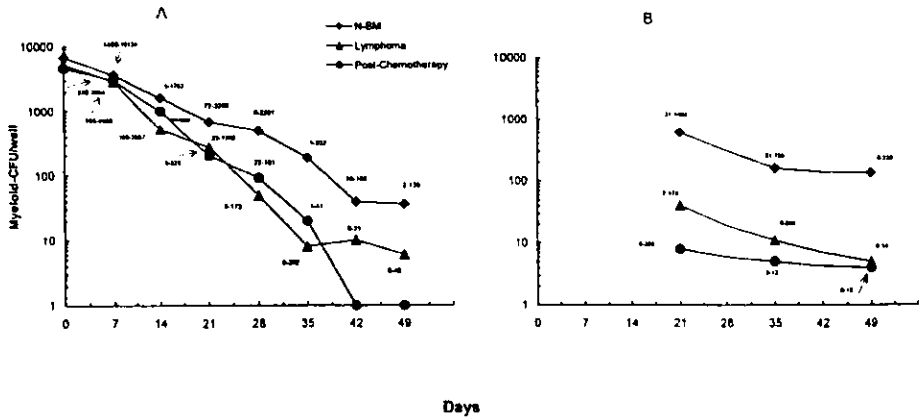


FIGURE 1 Kinetics of myeloid progenitor cells (CFU-G + CFU-M + CFU-GM) in the nonadherent (A) and adherent (B) fractions of long-term marrow cultures from normal bone marrow (N-BM; n=10) and BM from patients with diffuse large-cell lymphoma during active disease (lymphoma; n=10) and at the time of complete clinical remission after chemotherapy (post-chemotherapy; n=6). Points indicate median levels; numbers indicate upper and lower limit values. Note that the Y-axis is in logarithmic scale

lower than in their normal counterparts (Figure 1B). No significant differences were observed between cultures from patients before and after chemotherapy. When both non-adherent and adherent myeloid progenitors were taken together, their levels in LTMC from DLCL patients before therapy were extremely reduced (3.4- to 18.8-fold), as compared to normal LTMC (Table III). In LTMC from patients at complete remission, total myeloid progenitor levels were further reduced. Interestingly, major differences were observed in terms of the relative proportions of CFU-G, CFU-M and CFU-GM throughout the seven weeks in LTMC. Whereas in normal cultures the proportion of CFU-M increased from 32%, on day 0, to 72%, on day 49; in lymphoma cultures (both before and after treatment), CFU-G were always the most abundant type of myeloid progenitor (>80% after 5 weeks in culture).

Erythroid progenitors

In LTMC from DLCL patients before chemotherapy, non-adherent erythroid progenitors were observed for only three weeks. During this culture period, the lev-

els of these cells were similar to those observed in normal BM cultures (Figure 2A). In cultures from patients at complete remission, non-adherent erythroid progenitors were detected only on week 1 and at levels significantly lower than in cultures from normal BM and DLCL before therapy (Figure 2A). As for myeloid progenitors, adherent erythroid progenitor levels were determined on weeks 3, 5 and 7. On week 3, their levels in DLCL (both before and after chemotherapy) cultures were significantly reduced, as compared to normal cultures. On week 5, DLCL-before treatment cultures showed only a mild decrease in these cells, so that their levels were similar to those in normal LTMC. In contrast, these cells were undetectable in DLCL-after treatment cultures (Figure 2B). On week 7, erythroid progenitors could not be detected in any of the LTMC studied. Similar patterns were observed when both non-adherent and adherent erythroid progenitors were taken together (Table IV). Interestingly, the relative proportions of CFU-E and BFU-E throughout the culture period were similar in normal and DLCL-after treatment cultures (CFU-E, 16-35%; BFU-E, 65-84%). In con-

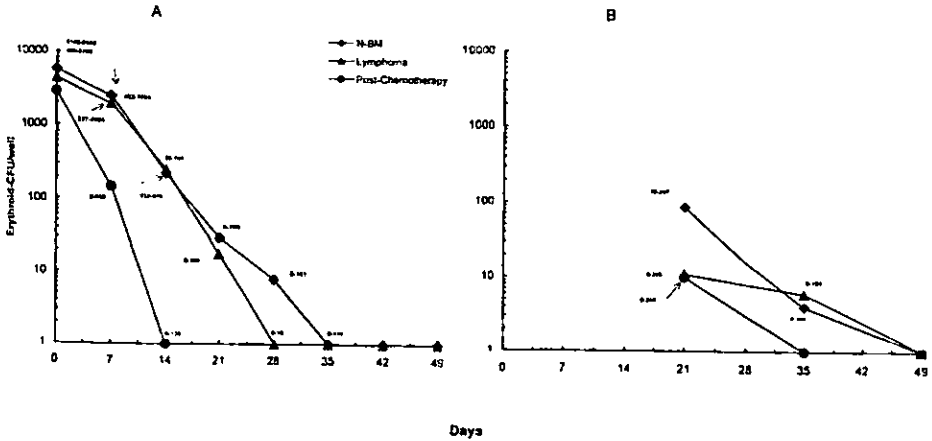


FIGURE 2 Kinetics of erythroid progenitor cells (CFU-E + BFU-E) in the nonadherent (A) and adherent (B) fractions of long-term marrow cultures from normal bone marrow (N-BM; n=10) and BM from patients with diffuse large cell lymphoma during active disease (lymphoma; n=10) and at the time of complete clinical remission after chemotherapy (post-chemotherapy; n=6). Points indicate median levels, numbers indicate upper and lower limit values. Note that the Y-axis is in logarithmic scale

trast, in DLCL-before treatment cultures, CFU-E comprised almost 70% of the total numbers of erythroid progenitors after the first week of culture.

Multipotent progenitors

In contrast to normal BM cultures, in which multipotent progenitors were detected for three weeks, these cells were not detected in any of the lymphoma LTMC studied, either before or after chemotherapy (not shown).

Analysis of the hematopoietic microenvironment

In order to assess possible alterations in the hematopoietic microenvironment of DLCL patients, both before and after chemotherapy, we determined their content of fibroblastic progenitors at the time of marrow sampling, the development of stromal cell layers in LTMC and the production of certain cytokines in LTMC.

The levels of fibroblast colony-forming cells (CFU-F) in the marrow of DLCL patients before chemotherapy were significantly lower than those

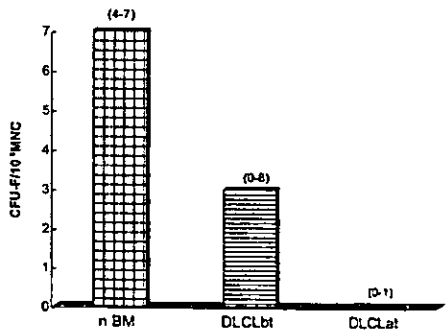


FIGURE 3 Number of fibroblast progenitor cells (CFU-F) in bone marrow from normal subjects (nBM; n=10) and patients with diffuse large cell lymphoma before therapy (DLCLbt; n=10) and after therapy (DLCLat; n=6). Results indicate median levels. Numbers in brackets indicate upper and lower limit values

observed in normal subjects (median numbers were 3 CFU-F/10⁵ MNC in DLCL before chemotherapy vs 7 CFU-F/10⁵ MNC in normal BM; Figure 3). Such levels were further reduced in patients at complete hema-

tological remission. Indeed, CFU-F were observed in only one patient (1 CFU-F/ 10^5 MNC) after chemotherapy (Figure 3).

In keeping with the lower numbers of CFU-F in DLCL patients, as compared to normal subjects, the development of stromal cell layers in LTMC from such patients was also deficient. After 5 weeks of culture, the numbers of adherent cells in DLCL-before chemotherapy cultures were about 74% of those observed in normal LTMC (Table V). These numbers were further reduced in LTMC from DLCL patients after chemotherapy (32% of the levels observed in normal cultures; Table V). It is also noteworthy that in LTMC from lymphoma patients -both before and after chemotherapy- there was a total absence of adipocytes, even after 7 weeks of culture. This is in sharp contrast to normal LTMC, in which adipocytes developed in all of them after 5 weeks of culture (not shown).

In order to assess some functional aspects of the hematopoietic microenvironment developed *in vitro*, the levels of SCF, TNF α and IL-6 were measured in LTMC from normal subjects and lymphoma patients, after 5 weeks in culture. As shown in Table V, the median levels of SCF were reduced by 24% in DLCL-before chemotherapy cultures, as compared to normal LTMC. These levels were slightly increased at the time of complete remission, but were still lower (by 16%) than in normal LTMC. IL-6 levels were also reduced (by 42%) in LTMC from DLCL patients, both before and after chemotherapy (Table V). Finally, TNF α levels showed great variability, both in normal and lymphoma cultures; however, their median levels observed in DLCL cultures, both before and after chemotherapy, were not significantly different from those in normal BM cultures (Table V). In all the cases, the cytokine levels observed before and after chemotherapy were not significantly different.

DISCUSSION

For the last two decades, malignant lymphoma has been widely studied in terms of its cytogenetics and molecular genetics. To date, however, the composition and function of the hematopoietic system in lym-

phoma patients is still not fully understood. In order to gain some new insights into the biology of this group of hematological disorders, in the present study we have cultured BM mononuclear cells from ten lymphoma patients and (i) determined their content of hematopoietic progenitors, (ii) characterized the proliferation kinetics of these cells in long-term marrow cultures, and (iii) studied some aspects related to their hematopoietic microenvironment developed *in vitro*. We further extended our study to patients that have achieved complete clinical remission after chemotherapy.

It is clear that malignant lymphoma comprises a variety of lymphoid disorders with different grades of severity.^[1,2] Thus, in order to avoid further variability in our study, due to different clinical conditions of the patients, we focused only on patients with diffuse large-cell lymphoma (DLCL). To our knowledge, this is the first study devoted to the *in vitro* characterization of the hematopoietic system in malignant lymphoma, in which all patients studied corresponded to the same type of lymphoma (DLCL).

All ten patients included in this study were adults between 48 and 69 years old. Most of them showed normal hematological parameters in peripheral blood (i.e., hemoglobin, hematocrit, leukocyte and platelet levels) both before and after chemotherapy. Interestingly, our results indicate that in spite of this, all the patients showed alterations in their hematopoietic system, both in terms of progenitor cells and their microenvironment.

As compared to normal BM, DLCL patients showed a 35% reduction in their median relative levels of progenitor cells, including myeloid, erythroid and multipotent progenitors. Although this was a consistent finding, this reduction was not as severe as in other hematological disorders, such as acute myelogenous leukemia, aplastic anemia or myelodysplastic syndromes, in which progenitor cells can be completely absent in semisolid cultures.^[20-22] It is also noteworthy that this reduction was similar for all three types of progenitors, which is also in contrast to other hematological disorders, such as aplastic anemia^[21] and myelodysplastic syndromes,^[22] in which the erythroid arm of hematopoiesis is affected to a significantly greater extent than the myeloid lineage.

TABLE IV Total number of erythroid progenitors (non-adherent + adherent) in LTMC from normal subjects and patients with diffuse large-cell lymphoma

Day	Normal Bone Marrow (n=10)	DLCL before Chemotherapy (n=10)	DLCL after Chemotherapy (n=6)
0	5913 [3180-8550]	3960 [480-8700]	2250 [720-8700] ^{bd}
21	116 [10-240]	29 [8-184] ^b	10 [0-260] ^b
35	4 [0-164]	6 [0-144]	bd
49	Bd	bd	bd

Results represent median [range] of the indicated number of samples and correspond to the number of progenitor cells per well. bd, below detection.

- a. $p < 0.05$ as compared to DLCL before chemotherapy on the same day.
 b. $p < 0.025$ as compared to normal BM cultures on the same day.

TABLE V Total number of adherent cells and cytokine levels in LTMC (week 5) from normal subjects and patients with diffuse large-cell lymphoma

Marrow Sample	Adherent Cells ($\times 10^3$ /well)	SCF (pg/ml)	TNF α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
Normal bone Marrow (n=8)	235 [100-665]	486 [450-550]	11.3 [3.9-16.0]	26.9 [24.4-28.9]
DLCL Before Chemotherapy (n=10)	175 ^a [120-340]	370 ^a [360-390]	9.9 [1.2-26.0]	15.7 ^a [13.7-17.0]
DLCL After Chemotherapy (n=6)	76 ^a [40-420]	410 ^a [340-450]	9.7 [1.0-15.9]	15.1 ^a [13.8-18.0]

Results represent median [range] of the indicated number of samples and correspond to the number of adherent cells per well or the levels of the indicated cytokine in LTMC supernatant

- a. $p < 0.05$ as compared to normal BM cultures.

Interestingly, not only quantitative but also qualitative alterations of hematopoietic progenitors were observed in this study. In all the cases analyzed, progenitor cells from DLCL patients showed a deficient proliferation in LTMC. Their numbers throughout 7 weeks of culture were significantly reduced, as compared to normal BM-derived LTMC, and this was observed both at the level of non-adherent and adherent progenitor cells. Although such deficient proliferation kinetics were particularly evident for erythroid and multipotent progenitors, which is in keeping with other hematological disorders,^[20-22] myeloid progenitors also showed a deficient proliferation capacity in LTMC. Indeed, on day 0 their levels corresponded to 65% of those in normal cultures; in contrast, on days 35 and 49, their levels corresponded to only 5% and 6% of those observed in normal LTMC, respectively. It has been demonstrated that CFC produced in LTMC after 5 weeks of culture are derived from a

more primitive progenitor cell type known as Long-Term Culture Initiating Cell (LTC-IC).^[23] Thus, the reduced number of CFC in DLCL-derived LTMC on days 35-49 may be due to quantitative and/or qualitative defects in LTC-IC from DLCL patients. Taken together, our results indicate that in DLCL, significant alterations exist in terms of BM-derived hematopoietic progenitor cell content and function in vitro. These results are in keeping with the study by Soligo et al^[24] who showed decreased numbers of both myeloid CFC and LTC-IC in 26 lymphoma patients. These authors also noticed a deficient proliferation of such cells in cytokine-supplemented liquid cultures.

It is not clear, however, whether the reduced numbers and altered in vitro proliferation of DLCL-derived progenitors, observed in the present study, are the result of intrinsic abnormalities of these cells or due to deficiencies in the hematopoietic

microenvironment. Indeed, we consistently observed significant alterations in the hematopoietic microenvironment of DLCL patients. Both the number of fibroblastic progenitors in BM and the number of adherent cells developed in culture were significantly reduced, as compared to normal subjects. This correlated with a 24% and a 42% reduction in the median levels of SCF and IL-6, respectively, two stimulatory cytokines produced mainly by fibroblasts in the marrow microenvironment. In contrast, the levels of TNF α -a cytokine produced by macrophages and other cells- were not statistically different to those in normal BM cultures. It is, then, possible that the reduced levels of SCF and IL-6 in DLCL-derived LTMC contribute, at least in part, to the deficient proliferation of hematopoietic progenitor cells in this culture system.

The results presented above, however, need to be taken with caution since there was an age disparity between the group of lymphoma patients (48 – 69 years old; median = 51 years) and the control group (20 – 57 years old; median = 29 years). In the group of normal subjects, we did not observe any significant differences in the levels of hematopoietic progenitors between cultures from young (20 – 36 years old; n = 7) and mature (45 – 57 years old; n = 3) individuals, thus, suggesting that the differences observed between normal and lymphoma cultures were due to the disease itself, however, we can not rule out the possibility that the differences in age had something to do with the hematopoietic differences observed in culture.

It is noteworthy that the hematopoietic and microenvironmental abnormalities described above were still present in all the patients studied at the time of complete clinical remission. In these patients, the levels of myeloid progenitors were similar to those seen in patients during active disease, whereas a further decrease in erythroid and multipotent progenitors was observed. CFU-F and LTMC adherent cell numbers were also lower than in patients before chemotherapy and the levels of SCF and IL-6 in LTMC were similar to those in LTMC from patients in active disease. It has to be kept in mind, however, that the analyses at complete clinical remission were performed 6 – 12

months after chemotherapy. Since we were unable to perform studies after more than one year post-treatment we are not certain that a complete hematopoietic recovery was achieved later on. Previous studies in patients with lymphoid malignancies (i.e., Hodgkin's disease and Acute Lymphoblastic Leukemia) have shown evidence of impaired BM function -including both hematopoietic progenitors and their microenvironment- in patients at complete clinical remission. Furthermore, such abnormalities were observed in patients several years after the completion of the treatment.^[25-27] Although the nature of these diseases is different to the one of DLCL, our results are in keeping with the above observations.

The fact that in several hematological disorders (including Aplastic Anemia,^[21] Hodgkin's disease,^[25] Acute Lymphoblastic Leukemia^[27] and DLCL -this study-) a significant reduction in progenitor cell levels and function has been observed, even though the hematological parameters of patients are normal, implies that certain functional changes have occurred in the hematopoietic system of such patients, so that lower numbers of progenitor cells are capable of generating normal numbers of mature cells. It would be interesting to study the expression of proliferation- and apoptosis-related genes in HPC, both before and after chemotherapy, and search for specific genes that may control the proliferation potential of these cells under different physiological conditions. Evidently, these studies would be of great clinical relevance.

In summary, in the present study we have demonstrated significant deficiencies in the composition and function of the hematopoietic ^{system} in patients with diffuse large-cell lymphoma, both during active disease and at the time of complete clinical remission. The alterations observed after treatment might be due to prolonged (permanent?) effects of chemotherapy on BM elements (e.g., stromal cells), a notion that has been supported by a number of experimental evidences.^[28,29] At this moment, however, we do not know the origin of the hematopoietic alterations occurring during active disease. Because none of the patients included in this study showed evidence of marrow infiltration, the alterations observed did not

seem to be due to the presence of malignant lymphocytes in the marrow sample. However, the malignant lymphoma cells could be implicated in such alterations by secreting cytokines that exert a long-lasting inhibition of the growth of normal progenitor cells, or cytokines that act on stromal cells inducing a long-term modification of their cytokine production pattern. Further studies should be conducted to address these issues.

Acknowledgements

This study was partially supported by grant no. 0122P-M9506 from the National Council of Science and Technology (CONACYT, Mexico). We would like to thank Dr. Laura Cuevas (National Medical Center, IMSS, Mexico City) for her expert assistance in the statistical analysis. Dr. Patricia Ostrosky (Biomedical Research Institute, UNAM, Mexico City) and Dr. Mauricio Salcedo (National Medical Center, IMSS, Mexico City) are also thanked for their critical comments to this study.

References

- [1] Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, Dewolfpeeters C, Falini B, Gatter KC, Groan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Mullerhermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA (1994). A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood*, 84, 1361-1365.
- [2] Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, Nadler LM, de Vita VT, Lister TA, Armitage JO (1996). Lymphoma classification- The gap between biology and clinical management is closing. *Blood*, 88, 4085-4089.
- [3] Friedman DF, Cho EA, Goldman J, Carmack CE, Besa EC, Hardy RR, Silberstein LE (1991). The role of clonal selection in the pathogenesis of an autoreactive human B cell lymphoma. *J Exp Med*, 174, 525-531.
- [4] Gordon LI, Harrington D, Andersen J (1992). Comparison of a second-generation combination chemotherapeutic regimen (m-BACOD) with a standard regimen (CHOP) for advanced diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *New Eng J Med*, 327, 1342-1346.
- [5] Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S (1993). Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *New Eng J Med*, 329, 1062-1065.
- [6] Avilés A, Nambu MJ, Talavera A (1995). GM-CSF instead of hematological support during high dose chemotherapy for refractory malignant lymphomas. *Leukemia & Lymphoma*, 17, 327-330.
- [7] Smalley RV, Anderson JW, Hawkins MJ (1992). Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *New Eng J Med*, 327, 1336-1340.
- [8] Avilés A, Díaz-Maqueo JC, García EI (1992). Maintenance therapy with interferon alfa 2b in patients with diffuse large cell lymphoma. *Invest New Drugs*, 10, 351-358.
- [9] Haouin C, Lepage E, Gisselbrecht C (1994). Comparison of autologous bone marrow transplantation with sequential chemotherapy for intermediate and high grade non-Hodgkin's lymphoma in first remission. *J Clin Oncol*, 12, 2543-2551.
- [10] McKeithan TW (1990). Molecular biology of Non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol*, 17, 30-42.
- [11] Ohshima A, Miura I, Hashimoto K, Takahashi N, Utsuni S, Nimura T, Saito M, Miki T, Hirose S, Miura AB (1997). Rearrangements of the BCL6 gene and chromosome aberrations affecting 3q27 in 54 patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 27, 329-334.
- [12] García-Sanz R, González M, Vargas M, Chillón MC, Balanzategui A, Barbón M, Flores MT, San Miguel JF (1997). Deletions and rearrangements of cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene p16 are associated with poor prognosis in B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*, 11, 1915-1920.
- [13] Ngan B-Y, Chen-Levy Z, Weiss LM (1988). Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the bcl-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *New Eng J Med*, 318, 1638-1641.
- [14] Xerri L, Devillard E, Hassoun J, Haddad P, Birg F (1997). Malignant and reactive cells from human lymphomas frequently express Fas ligand but display a different sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *Leukemia*, 11, 1868-1877.
- [15] Gronbaek K, Straten P, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P (1998). Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: Association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood*, 92, 3018-3024.
- [16] Avilés A, Calva A, Díaz-Maqueo JC, Talavera A, Huerta-Guzmán J, Vásquez E (1997). Dose escalation of epirubicin in the CEOP-BLEO regimen: A controlled clinical trial comparing standard doses for the treatment of diffuse large cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 25, 319-325.
- [17] Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorock A (1990). Modulation of erythropoiesis and myelopoiesis by exogenous erythropoietin in human long-term marrow cultures. *Exp Hematol*, 18, 174-179.
- [18] Mayani H, Gutierrez-Rodriguez M, Espinoza L, López-Chalini E, Huerta-Zepeda A, Flores E, Sánchez-Valle E, Luna-Bautista F, Valencia I, Ramírez OT (1998). Kinetics of hematopoiesis in Dexter-type long-term cultures established from human umbilical cord blood cells. *Stem Cells*, 16, 127-135.
- [19] Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU F) and their progeny. *Blood*, 56, 289-301.
- [20] Griffin JD, Lowenberg B (1986). Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 68, 1185-1195.
- [21] Gómez-Morales E, Martínez-Jaramillo G, Sánchez-Valle E, Valencia-Plata I, Arna-Trejo RM, Castro MA, Pizzuto-Chavez J, Mayani H (1998). Deficient proliferation of myeloid, erythroid and multipotent progenitor cells in long-term marrow cultures from patients with aplastic anemia treated with immunosuppressive therapy. *Am J Hematol*, 59, 149-155.
- [22] Flores-Figueroa E, Gutiérrez-Espindola G, Guerrero-Rivera S, Pizzuto-Chavez J, Mayani H (1999). Hematopoietic pro-

- genitor cells from patients with myelodysplastic syndromes: In vitro colony growth and long-term proliferation. *Leuk Res*, 23, 387-396.
- [23] Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 3584-3588.
- [24] Soligo DA, Lambertenghi Delitieri G, Servida F, Quinci N, Campiglio S, Tagliaferri E, Oriani A, Romiti L, Della Volpe A, Annaloro C (1998). Haematopoietic abnormalities after autologous stem cell transplantation in lymphoma patients. *Bone Marrow Transplant*, 21, 15-22.
- [25] Bhavnani M, Morris Jones PH, Testa NG (1989). Children in long-term remission after treatment for acute lymphoblastic leukemia show persisting haemopoietic injury in clonal and long-term cultures. *Br J Haematol*, 71, 37-41.
- [26] Radford JA, Testa NG, Crowther D (1990). The long-term effects of MVPP chemotherapy for Hodgkin's disease on bone marrow function. *Br J Cancer*, 62, 127-132.
- [27] Roingeard F, Binet C, Lecron JC, Truglio D, Colombat P, Domenech J (1998). Cytokines released in vitro by stromal cells from autologous bone marrow transplant patients with lymphoid malignancy. *Eur J Haematol*, 61, 100-108.
- [28] Testa NG, Gale RP, eds (1988). *Hematopoiesis: Long-term effects of chemotherapy and radiation*. Marcel Dekker, New York.
- [29] Domenech J, Gihana E, Dayan A, Truglio D, Linossier C, Desbois I, Lammagnere JP, Colombat P, Binet C (1994). Haemopoiesis of transplanted patients with autologous marrows assessed by long-term marrow cultures. *Br J Haematol*, 88, 488-496.