

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACION EN DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DEL CANCER

ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF-a) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA 1 (TGF-B1) EN LA INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE LA LINEA CELULAR MIELOIDE MULTIPOTENCIAL 32D DE RATON ESTIMULADA CON INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1B).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
EDGAR LEDESMA MARTINEZ

Director de tesis: Dr. Edelmiro Santiago Osorio

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

A los que dan minutos de su vida para cambiar la mía.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres
y
a mis hermanos.

A Edith. Un ejemplo de integridad, perseverancia y hermandad a toda prueba.

A Yolanda. "When this world is trying it's hardest To leave me unimpressed Just one caress from you and I'm blessed..."

Al Dr. Edelmiro Santiago. Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por tolerar mis inconsistencias y chistes malos.

Al "Gerard". Porque siempre creí que debía existir una forma mas fácil para hacer las cosas, pero se debe empezar por algún lado.

A las personas que colaboraron en algún momento y de una u otra manera con este trabajo: Biol. Yolanda Córdova y Adriana Galván, QFB Lourdes Espejel y Dr. Miriam Rodriguez.

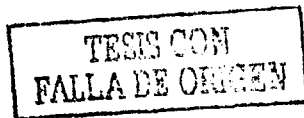
Especialmente a la gente del laboratorio en estricto orden alfabético: Adri, Flor, Hugo, Lulú, Miguel, Yola y ?. Fue todo un placer compartir con ustedes el "día laboral".

Al Dr. Juan. Lo mas aproximado a un amigo.

A Nephertity y Elena. Cuando todo estaba mal, cuando creía que las cosas no podían estar peor, ahí estaban para mi. Me dieron esperanza y por ello siempre les estaré agradecido.

A La Luz del Dia.

Este trabajo contó con el apoyo económico de Probetel (Programa de becas de tesis de licenciatura, UNAM). Abril 2001- abril 2002.



CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS	5 ✓
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
METODOLOGÍA	24
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFÍA	45

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

MC	medios condicionados
IL-3	interleucina-3
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos
G-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos
EPO	eritropoyetina
TPO	trombopoyetina
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
IFN- γ	interferón gamma
TGF- β 1	factor de crecimiento transformante beta 1
MIP-1 α	proteina inflamatoria de macrófagos-1 alfa
IL-1 α	interleucina-1 alfa
IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-1ra	antagonista del receptor de la IL-1
IL-1 δ	interleucina-1 delta
IL-1 ϵ	interleucina-1 epsilon
ICE	enzima convertidora de la IL-1 β
IL-2	interleucina-2
IL-6	interleucina-6
AML	leucemia mieloide aguda
LPS	lipopolisacárido
LAP	proteina asociada a latencia
anti-TNF- α	anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa
PBS	solución estabilizadora de fosfatos
RT-PCR	transcripción reversa acoplada de la reacción en cadena de la polimerasa
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
pb	pares de bases
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementario
Act-D	actinomicina-D

RESUMEN

Es conocido que la interleucina-1 beta (IL-1 β) favorece la hematopoyesis al inducir la expresión de genes de varios factores de crecimiento, citocinas y sus receptores. Sin embargo, también abate la proliferación de las células multipotenciales 32D sin que exista hasta el momento un mecanismo que explique tal regulación negativa. La IL-1 β induce la producción de TNF- α y TGF- β 1 dos clásicos inhibidores de la hematopoyesis en diversos tipos celulares, esto sugiere que la regulación negativa promovida por la IL-1 β puede ser mediante la secreción de inhibidores hematopoyéticos.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar si el TNF- α o TGF- β 1 son los responsables de la inhibición de la proliferación de las células 32D tratadas con interleucina-1 beta recombinante humano (rhIL-1 β). Por conteo celular se observó que los recombinantes de TNF- α y TGF- β 1 inhiben la proliferación celular de 32D en 48 y 43% respectivamente, esto es de manera similar a la rhIL-1 β . Líneas celulares sensibles a los candidatos a moduladores negativos fueron expuestas al sobrenadante de células 32D cultivadas con y sin rhIL-1 β , encontrándose actividad biológica en el medio condicionado de TNF- α pero no TGF- β 1. El producto de RT-PCR indica que esta síntesis de TNF- α se correlaciona con incremento en la expresión de RNAm; finalmente por ensayo de bloqueo con anticuerpo anti-TNF- α a cultivos celulares en presencia de rhIL-1 β , se observó que la participación del TNF- α en la inhibición de la proliferación inducida por rhIL-1 β es parcial, dado que la presencia del anticuerpo solo restablece en 43% la proliferación celular.

Los resultados permiten proponer un mecanismo por el que la IL-1 β regula negativamente la proliferación de la línea 32D. El estímulo de rhIL-1 β incrementa la expresión de RNAm para TNF- α , éste se traduce a proteína biológicamente activa que actuando de manera autócrina/parácrina, suprime la proliferación celular de manera conjunta con la IL-1 β o algún otro factor inhibidor de la hematopoyesis.

INTRODUCCIÓN.

Hematopoyesis.

Las células sanguíneas tienen como principal función el transporte de oxígeno por parte de eritrocitos y la defensa del organismo por parte de los leucocitos, contra la invasión de agentes patógenos. Las células sanguíneas maduras (eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas) mueren por senescencia o bien durante el desarrollo de sus funciones normales (Hughes-Jones & Wickramasingh 1991). La pérdida de las células de la sangre es rápidamente equilibrada por la formación de nuevas células sanguíneas, mediante el proceso conocido como hematopoyesis (Orkin 1995).

La producción de células sanguíneas en el humano inicia en el saco vitelino durante los primeros 14 a 19 días de vida embrionaria, el hígado y bazo fetal se convierten en los principales órganos hematopoyéticos en el segundo trimestre de embarazo y la médula ósea fetal hacia el tercer trimestre. Después del nacimiento, es la médula ósea el principal sitio hematopoyético en individuos sanos. Durante los primeros cuatro años de vida, la médula de todos los huesos contribuye a la hematopoyesis (Munker *et al*, 1998). Posteriormente, con el incremento de células adiposas en ciertas regiones de la médula, la hematopoyesis queda restringida, de manera que a la edad de 25 años, los únicos sitios hematopoyéticos activos son los huesos pélvicos, la columna vertebral, las regiones proximales de fémur y húmero, el cráneo y el esternón (Hughes-Jones & Wickramasingh 1991).

Las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente particular llamado microambiente hematopoyético, el cual está constituido por distintos tipos celulares y proteínas extracelulares. Las células que constituyen el microambiente hematopoyético, conocidas como células del estroma medular, son principalmente fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos. La principal función es proveer el microambiente propicio para favorecer la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Las células del estroma medular secretan proteínas como la colágena, fibronectina, laminina y los proteoglicanos que constituyen la matriz extracelular, mientras que las proteínas que regulan la fisiología de las células hematopoyéticas y sus precursores

son llamadas citocinas (Munker *et al*, 1998). La hematopoyesis es sustentada a partir de la proliferación y diferenciación de un grupo de células conocido como células tallo hematopoyéticas (Orkin 1995). Estas células se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea y constituyen el 0.05% de esta población celular, se caracterizan por su alta capacidad proliferativa y de auto-renovación (Ogawa & Matsunaga 1999; Orlic & Bodine 1994), así como por la ausencia de características morfológicas o citoquímicas, propias de las células maduras o comprometidas hacia algún linaje celular. Estas células son consideradas totipotenciales, dado que son susceptibles de comprometerse hacia cualquiera de los linajes celulares sanguíneos, cuando son estimuladas con la combinación de diferentes citocinas (Morrison *et al*, 1995; Ogawa 1993), además tienen la capacidad para reconstituir la hematopoyesis a corto y largo plazo, en individuos mielosuprimidos después de una radio o quimioterapia (Morrison *et al*, 1995).

Históricamente, cultivos *in vitro* permitieron establecer que las células precursoras hematopoyéticas provenientes de la médula ósea de ratón, solo proliferaban en presencia de células estromales o de medios condicionados (MC) de cultivos de células pertenecientes al estroma de médula ósea (Pluznik & Sachs 1965), posteriormente se demostró que la proliferación de estas células estaba sustentada por factores glicoprotéicos presente en el MC. De esta manera la hematopoyesis está regulada por una serie de glicoproteínas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas (Metcalf 1998) las cuales son miembros de la familia de las citocinas. Para las células progenitoras, la presencia de interleucina-3 (IL-3), factor estimulador de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF), de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO) o trombopoyetina (TPO), es suficiente para su proliferación y diferenciación hacia células maduras (Clark & Kamen 1987). Por otra parte, la supresión de la hematopoyesis está bajo el control de citocinas originalmente reconocidas como reguladoras de procesos inflamatorios o inmunes, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa (MIP-1 α) entre otros (Metcalf 1989; Trinchieri *et al*, 1987; Jacobsen *et al*, 1994).

Entre las citocinas que participan en el proceso hematopoyético se encuentra la interleucina-1 (IL-1), la cual modula la proliferación de células hematopoyéticas mediante la inducción y expresión de genes para factores de crecimiento hematopoyético y sus receptores, tanto en células estromales de médula ósea (Dinarello 1994; Fibbe & Falkenburg 1990) como en células progenitoras (Orikasa *et al*, 1993).

Interleucina-1.

Interleucina-1 es una molécula glicoprotéica que posee un amplio espectro de propiedades inflamatorias, metabólicas, fisiológicas, hematopoyéticas e inmunológicas (Dinarello 1991). Existen dos formas biológicas; la interleucina-1 alfa (IL-1 α) e interleucina-1 beta (IL-1 β), ambas formas se unen al mismo receptor por tanto tienen la misma actividad biológica, a pesar de que muestran una homología muy baja en la secuencia de aminoácidos (20 a 30%), sin embargo entre especies existe un alto grado de conservación de secuencias (entre 75 y 78%) de manera que no es especie-específica (Schindler & Dinarello 1990).

Existe otra molécula similar a la IL-1 que se une al mismo receptor, pero a diferencia de las dos primeras, no despierta ninguna actividad biológica, por estas características se le ha dado el nombre de antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra). Estas tres moléculas constituyen la familia de la IL-1, aunque recientemente se caracterizaron otras dos moléculas relacionadas conocidas como interleucina-1 delta (IL-1 δ) e interleucina-1 epsilon (IL-1 ϵ), en tejido embrionario y células epiteliales. La IL-1 δ muestra una alta homología con IL-1ra y tiene la característica de inhibir la activación del factor de transcripción NF- κ B, inducida por parte de la IL-1 ϵ (Debets *et al*, 2001).

El gen para la IL-1 α tiene un peso de 10 kb (Furutani *et al*, 1986), mientras que el gen para IL-1 β es de 7 kb (Clark *et al*, 1986). Estos genes en el humano, están localizados en el cromosoma 2 en la posición 2q13, en la misma región que IL-1ra y los receptores del tipo I y tipo II para la IL-1 (Lafage *et al*, 1989). Los genes para IL-1 codifican para una proteína precursora (pro-IL-1) de 31 kDa, que es cortada por enzimas proteolíticas para generar las formas maduras de 17 kDa. A diferencia de la pro-IL-1 α que es biológicamente activa, la pro-IL-1 β es sólo parcialmente activa y debe ser cortada por una enzima específica

conocida como enzima convertidora de la IL-1 β (ICE) (Billiau *et al*, 1986; Hoang *et al*, 1988; Hamblin 1993). IL-1 α es una proteína preferentemente enlazada a membrana mientras que la IL-1 β es una proteína de secreción, siendo por tanto la forma predominante de la IL-1, en el sobrenadante de los cultivos y fluidos corporales (Dinarello 1991).

Se considera como fuentes principales de IL-1 a las células del tipo monocito-macrófago, sin embargo se ha demostrado que prácticamente todos los tipos celulares pueden producir IL-1 bajo las condiciones adecuadas. De esta manera, entre los tipos celulares identificados como productores de esta molécula están los neutrófilos, los astrocitos, los linfocitos T y B, los fibroblastos, los queratinocitos, las células NK, sinoviales, epiteliales, dendríticas, endoteliales, musculares y células de la microglía (Oppenheim 1986).

La interleucina-1 es un elemento importante en el mantenimiento de la homeostasis, tanto por el número tan vasto de células sobre las que actúa (Tabla 1) como por estar vinculada a una amplia variedad de procesos metabólicos, que regulan básicamente a los sistemas inmune, neuroendócrino y neuroinmune (Dinarello 1996; Alheim & Bartfai 1998). La mayoría de los efectos de la IL-1 (Tabla 2) son mediados por la inducción de otras citocinas, tales como la interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), TNF, IFN (Fibbe & Falkenburg 1989). En este sentido IL-1 ha mostrado la capacidad para inducir la producción de un amplia gama de citocinas, entre las que se encuentran la IL-2, IL-3, interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), IL-6, interleucina-7 (IL-7), interleucina-8 (IL-8), TNF- α , TNF- β , IFN γ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF y de la misma IL-1 alfa o beta. Al respecto, ambas IL-1 poseen efectos biológicos similares (Galdiero *et al*, 1995; Estrov *et al*, 1995; Dower *et al*, 1986; Dower 1987) que incluso llegan a ser indistinguibles entre ambas formas biológicas (Dinarello 1997).

Tabla 1. Células sobre las que tiene efecto la IL-1.

Efecto biológico.	Tipo celular en el que se presenta.
Producción de óxido nítrico.	Células musculares cardíacas.
Incremento en la síntesis de proteínas.	Células hepáticas.
Actividad pirogénica.	Células de sistema nervioso central.
Actividad quimiotáctica.	Granulocitos.
Inducción a la proliferación e inducción de receptores para factores de crecimiento.	Células progenitoras hematopoyéticas, osteoblastos, queratinocitos, fibroblastos, algunas células tumorales y células T.
Inhibición de la proliferación.	Células hematopoyéticas, endometrio, endotelio, células cancerosas de mama y tiroides.
Producción de factores de crecimiento.	Células de estroma de médula ósea.
Inducción de apoptosis.	Fibroblastos, neuronas, células β productoras de insulina.
Inhibición de apoptosis.	Neutrófilos.
Inducción a la diferenciación.	Células endoteliales.
Inducción de receptores Fc γ R e incremento de la actividad fagocítica.	Células mieloides maduras.

Tomada y modificada de Martínez 2000.

Respecto a la hematopoyesis, tradicionalmente se reconoce que la IL-1 participa en la proliferación de células hematopoyéticas, induciendo la producción de citocinas (Ruscetti *et al*, 1992) y factores de crecimiento por las células estromales de médula ósea (Dinarelo 1994). Además favorece la supervivencia y proliferación de las células precursoras hematopoyéticas, con lo cual facilita la recuperación de ratones irradiados letalmente (Dinarelo 1994; Fibbe & Falkenburg 1990; Jovicic *et al*, 1996; Kennedy & Borch 1999; Snoeck *et al*, 1994). Se sabe de su participación en la proliferación de varios tipos de leucemias, de su capacidad para otorgar un efecto radio y quimio protector a las células hematopoyéticas (Moreb & Zucalli 1992) y el efecto sinérgico con otros factores para favorecer la proliferación de precursores mieloides (Dinarelo 1996).

Sin embargo también existen algunos reportes que indican que la IL-1 inhibe la proliferación de la línea leucémica de ratón M1, así como de la línea mieloides humana K562 (Onozaki *et al*, 1985; Lovett *et al*, 1986); se le reconoce como una citocina reguladora de la proliferación de células de leucemia aguda (AML) (Carter *et al*, 1992) y también parece inhibir la proliferación de macrófagos inmortalizados con retrovirus hasta en un 25%. Se ha demostrado que la combinación de factor estimulador de células tallo

(SCF), IL-6, interleucina-11 (IL-11) y EPO favorece la multiplicación de los progenitores mieloides totipotenciales, pero la adición de IL-3 o IL-1 (alfa o beta) suprime la producción de unidades formadoras de colonias en cultivo (Yonemura *et al*, 1996) y recientemente se demostró que la IL-1 β inhibe la proliferación de las células 32D de ratón (Martínez 2000), una línea mieloides multipotencial dependiente de IL-3, ampliamente usada como modelo de estudio de la hematopoyesis normal (Boosalis *et al*, 1997; Sanchez *et al*, 1998). Hasta el momento no existe una explicación del mecanismo por el que la IL-1 β regula negativamente la hematopoyesis en modelos de células multipotenciales.

Tabla 2. Efectos biológicos de la IL-1.

Sistema nervioso central.	Induce fiebre, sueño, anorexia y liberación de neuropeptidos.
Metabolismo.	Incrementa la síntesis de proteínas de fase aguda. Eleva los niveles de Zn y Fe en el suero. Incrementa la síntesis de insulina y excreción de Na.
Sistema vascular.	Induce hipotensión y shock. Incrementa la adherencia de leucocitos. Disminuye la resistencia vascular.
Efectos inmunológicos.	Activa células NK en sinergismo con IL-2 e IFN. Activa a linfocitos T para la síntesis de IL-2. Sinergiza con IL-4 para producir IL-6 que activa a linfocitos B. Incrementa la expresión de receptores para IL-2. Incrementa la citotoxicidad de macrófagos. Induce la quimiotaxis de linfocitos T y B.
Efectos inflamatorios.	Induce la síntesis de colágena y procólagenasa. Induce la liberación de histamina por basófilos. Induce la degranulación de neutrófilos y la liberación de tromboxano por monocitos. Aumenta la expresión de moléculas de adhesión.
Efectos de tejido vascular.	Induce la actividad procoagulante de células endoteliales. Incrementa la adhesividad de células endoteliales.
Efectos en hematopoyesis.	Induce la producción de GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-3 en células estromales de médula ósea. Aumenta la sobrevivencia <i>in vitro</i> y protege a las células precursoras hematopoyéticas de agentes citotóxicos. Sinergiza con IL-3, IL-6, G-CSF y M-CSF para regular la proliferación y diferenciación de células tallo hasta colonias específicas de un linaje determinado. Estimula directamente la producción de plaquetas. Induce la expresión de receptores Fe en células mieloides. Inhibe la hematopoyesis.

Tomada y modificada de Flores 1999.

Se ha reportado que altas dosis de IL-1 inducen la producción de TNF- α (Dinarello 1996; Ikejima *et al*, 1990; Gasparetto *et al*, 1989) el cual puede suprimir la formación de colonias (Ware *et al*, 1992) y recientemente se demostró que células CD34+ humanas expresan de manera constitutiva el gen para el TNF- α (Majka *et al*, 2001). Por otro lado se ha demostrado que IL-1 promueve la síntesis de TGF- β (Yang *et al*, 1999; Dinarello 1996) de manera que estas dos citocinas pueden estar involucradas en la supresión hematopoyética inducida por la IL-1 β .

Factor de Necrosis Tumoral alfa.

El término factor de necrosis tumoral se refiere a dos citocinas estrechamente relacionadas pero codificadas por genes distintos, conocidas como factor de necrosis tumoral alfa o cachectina (TNF- α) y factor de necrosis tumoral beta o linfotóxina (TNF- β). Ambas citocinas interactúan con los mismos receptores de membrana y ambas están implicadas en la respuesta del organismo contra algunas enfermedades (Tracey & Cerami 1994).

El gen para el TNF- α codifica para una pro-hormona que accesa a la membrana celular como un polipéptido de 26 kDa (Kriegler *et al*, 1988; Perez *et al*, 1990; Jue *et al*, 1990), esta forma enlazada a membrana es bioactiva y está implicada en las actividades parácrinas del TNF- α en diversos tejidos. En respuesta a endotoxinas bacterianas por ejemplo lipopolisacárido (LPS) y otros estímulos, la forma precursora es cortada por enzimas proteolíticas para generar la forma madura de 17 kDa (Pennica *et al*, 1984; Davis *et al*, 1987). Tres de estas formas monoméricas se asocian de manera no-covalente para formar un trimero, que es la forma bioactiva del TNF- α predominante en suero y fluidos corporales (Smith & Baglioni 1987; Jones *et al*, 1989).

Originalmente se consideraba que el TNF- α era exclusivamente producido por monocitos y macrófagos (Lange 1992; Ferdyn *et al*, 1998), sin embargo se ha demostrado, al menos *in vitro*, que muchos tipos celulares son capaces de sintetizar TNF- α (Sidhu & Bollon 1993), por ejemplo, las células de leucemia promielocítica aguda, timocitos, linfocitos T y B, células NK, fibroblastos (Bharat & Jordan 1992; Hamblin 1993) y otros tipos celulares en respuesta a toxinas bacterianas, productos inflamatorios e infecciones por *Pseudomona*

aeruginosa, *Francisella tularensis* y salmonela, entre otros (Cole *et al*, 1999; Stenmark *et al*, 1999; Ciacci-Woolwine *et al*, 1997) (Tabla 3).

Tabla 3. Biología del TNF.

Estructura.	Forma asociada a membrana de 26 kDa. Forma secretada y biológicamente activa de 17 kDa.
Estimulo de liberación.	Toxinas bacterianas (lipopolisacárido, enterotoxina, toxinas de síndrome de shock tóxico), micobacterias, parásitos, productos de activación del complemento, complejos antígeno-anticuerpo, citocinas.
Fuentes celulares.	Macrófagos, linfocitos, eosinófilos, astrocitos, células de Langerhans.
Actividades biológicas celulares.	Citotoxicidad sobre ciertas células tumorales, factor de crecimiento para algunas células tumorales, supresión de LPS en adipocitos.
Vida media en suero.	6-20 minutos en mamíferos después de inyección intravenosa.

Tomada y modificada de Tracey & Cerami 1994.

El TNF- α muestra una amplia gama de efectos biológicos que en general, no son especie-específicos (Aiyer & Aggarwal 1988). Su principal actividad *in vivo*, se refiere a la citotoxicidad sobre células tumorales que varía dependiendo de las condiciones de crecimiento y el grado de diferenciación (Kirstein *et al*, 1986), en estudios *in vitro* actúa selectivamente sobre líneas celulares transformadas, no teniendo efecto sobre células normales en cultivo salvo ciertas excepciones en las que, bajo condiciones en particular inhibe la proliferación de fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y queratinocitos (Sugerman *et al*, 1985; Fransen *et al*, 1986).

Dependiendo de la célula blanco y de la presencia de inhibidores metabólicos, puede inducir necrosis o muerte por apoptosis (Schmid *et al*, 1986; Grooten *et al*, 1993), así mismo está involucrado en la inducción y expresión de genes, en procesos inflamatorios, reparación de tejidos, respuesta inmune y hematopoyesis, se le ha detectado como agente importante en cuadros de artritis e infecciones víricas y bacterianas (Tabla 4). Debido a su importancia como inmunomodulador y agente antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, se le ha examinado extensivamente como una alternativa terapéutica en tratamientos de cáncer, así en estudios preclínicos se ha administrado en combinación con otras citocinas y agentes

quimioterapéuticos (Beyert & Fiers 1998), sin embargo sólo en muy pocos casos se han logrado actividades sinérgicas favorables y remisiones parciales (Negrier *et al*, 1992).

Tabla 4. Efectos biológicos del TNF- α .

Inflamación.	Importante papel proinflamatorio <i>in vivo</i> debido a la activación de neutrófilos, células mast, endoteliales, macrófagos y fibroblastos.
Pérdida de peso (cachexia).	Esta implicado en pérdida de peso corporal durante cachexia. Su administración produce anemia al abatir la producción y vida media de eritrocitos.
Antitumoral.	Suprime <i>in vivo</i> el crecimiento de células tumorales. Esta implicado en la regresión de tumores en modelos animales. En algunos casos de leucemia mieloide aguda, actúa en sinergismo con GM-CSF para inducir proliferación.
Antibacterial.	Actúa contra infecciones bacterianas mediante la activación de neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Promueve el crecimiento de células T, induce receptores para IL-2 y síntesis de IFN- γ .
Resorción de hueso.	Estimula la resorción de hueso por acción directa en osteoblastos y células osteoclasticas. Suprime la síntesis de colágeno y fosfatasa alcalina en osteoblastos.
Autoinmunidad	Esta involucrado en la patogénesis de Lupus nefritis
Efectos en hematopoyesis	Suprime la proliferación de células precursoras hematopoyéticas humanas. Actúa como radio y quimioprotector. Potencia el crecimiento de células progenitoras humanas y de ratón, estimuladas con IL-3 o GM-CSF.

Tomado y modificado de Bharat & Jordan 1992

El papel del TNF- α en hematopoyesis se ha estudiado ampliamente y se reportan efectos tanto estimuladores como inhibidores, dependiendo del sistema y de la naturaleza de las células hematopoyéticas (Loetscher *et al*, 1991; Caux *et al*, 1990; Murphy *et al*, 1988; Wisniewski *et al*, 1987). Aunque inicialmente se le identificó como un factor citotóxico posteriormente demostró propiedades estimuladoras del crecimiento en diversos tipos celulares (Vilcek *et al*, 1986; Digel *et al*, 1989), en este contexto se ha demostrado que puede actuar de manera sinérgica con IL-3 o GM-CSF, para potenciar el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de ratón (Blackx *et al*, 1991; Caux *et al*, 1990). Adicionalmente el TNF- α incrementa la sobrevivencia de cultivos individuales de células Lin- Sca-1+ en cultivos tratados con IL-1- β , este incremento en la sobrevivencia de células progenitoras responsivas a IL-1- β se correlaciona con un incremento en el número

de células viables y supresión de apoptosis. El sinergismo entre TNF- α e IL-1- β que media la supresión de apoptosis en células progenitoras Lin- Sca-1+ *in vitro*, es particularmente interesante considerado el papel radioprotector (Neta *et al.*, 1988) que de manera sinérgica tienen ambas citocinas, y que explica al menos en parte el mecanismo radioprotector.

A pesar de los estímulos positivos, el TNF- α es un clásico supresor de la hematopoyesis *in vitro* (Gray *et al.*, 1984; Murphy *et al.*, 1988), que inhibe la proliferación de células progenitoras de médula ósea de ratón y humano, en respuesta a la mayoría de las citocinas que se emplean como estimuladoras, incluidas el SCF (Degliantoni *et al.*, 1985; Broxmeyer *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1988; Caux *et al.*, 1991). El grado de inhibición hematopoyética mediado por el TNF- α es variable (Munker 1987) y dependiente de la fracción celular separada de la médula ósea y del tipo de medio condicionado usado como fuente de factores de crecimiento hematopoyético, asimismo el efecto inhibitorio del TNF- α puede ser indirecto, esto es mediante la liberación de factores supresores por células accesorias (Beutler *et al.*, 1989), los que pueden actuar de manera conjunta con el TNF- α para inhibir la hematopoyesis (Pennica *et al.*, 1984; Broxmeyer *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1988; Bonnet *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 1999; Martínez-Jaramillo *et al.*, 2001).

Factor de Crecimiento Transformante beta 1.

La familia del TGF- β consiste de cinco productos de genes, tres de los cuales (β 1- β 3) son sintetizados en humanos, siendo el factor de crecimiento transformante beta 1 y beta 2 (TGF- β 1 y TGF- β 2) los mas frecuentes, otras dos isoformas llamadas factor de crecimiento transformante beta 4 y beta 5 (TGF- β 4 y TGF- β 5) se han clonado en el pollo y rana respectivamente (Jakowlew *et al.*, 1988; Kondalah *et al.*, 1990).

El TGF- β es considerado una molécula pleiotrópica que puede ejercer efectos tanto positivos como negativos en proliferación, diferenciación o muerte celular, dependiendo del estadio de desarrollo de la célula blanco, si se trata de ambiente *in vivo* o del medio condicionado utilizado como fuente de citocinas para estudios *in vitro* (Fortunel *et al.*, 2000).

El TGF- β es sintetizado como proteínas precursoras biológicamente inactivas. Estas consisten de pre-pro-péptidos que requieren dos pasos para constituirse como formas activas (Gentry *et al*, 1988). Un primer enlace proteolítico lleva a la eliminación de un péptido señal hidrofóbico en la región N-terminal de la proteína precursora lo que resulta en una pro-TGF- β . Un segundo enlace separa la pro-región de la proteína hacia el péptido maduro de TGF- β . El TGF- β está usualmente constituido por homodímeros (TGF- β 1.1, TGF- β 2.2, TGF- β 3.3) pero moléculas heterodímeras también han sido identificadas (TGF- β 1.2 y TGF- β 2.3) (Ogawa *et al*, 1992). En el caso del TGF- β 1 la forma bioactiva de 25 kDa, está compuesta de dos cadenas peptídicas maduras enlazadas por puentes disulfuro. Una vez sintetizado el TGF- β es liberado por las células como complejos latentes biológicamente inactivos, dicha inactividad está asociada con un dímero pro-peptídico llamado proteína asociada a latencia o LAP de 74 kDa en el caso de TGF- β 1. (Yin *et al*, 1995; Moren *et al*, 1994; Saharinen *et al*, 1998).

La vida media en plasma de la forma bioactiva es de 2 a 3 minutos, rápidamente es procesado y degradado por el hígado, riñón y bazo. Por el contrario, la vida media de la forma latente, que es aquella secretada por la mayoría de las células y plaquetas, es superior a hora y media, siendo retirada de la circulación posteriormente (Wakefield *et al*, 1990). Este factor es producido por varios tipos celulares particularmente plaquetas, macrófagos activados, fibroblastos, células endoteliales entre otros (Hamblin 1993; Touhami *et al*, 1997; Jacobsen *et al*, 1996) y es factible que también sea producido por las células progenitoras mieloides, dado que se ha identificado la proteína en el medio condicionado de células CD34+ humanas (Majka *et al*, 2001).

Los efectos biológicos mediados por el TGF- β (Tabla 5) pueden clasificarse dentro de cuatro categorías: respuesta a la proliferación, efectos en la diferenciación celular, sobre las funciones de células diferenciadas y respuestas que involucran matriz extracelular (Ruscetti *et al*, 1998). De manera general el TGF- β está involucrado en el desarrollo de tumores, en la regulación de apoptosis, en la síntesis de proteínas de matriz extracelular, en

inmunosupresión y en diversos estímulos positivos y negativos en una amplia variedad de tipos celulares (Grzegorzewski *et al*, 1994).

Tabla 5. Efectos biológicos del TGF- β 1

Matriz extracelular.	Incrementa la síntesis y liberación de matriz extracelular en muchos tejidos. Suprime la síntesis de enzimas proteolíticas que degradan la matriz. Eleva la síntesis de inhibidores de proteasas. Incrementa la expresión celular de receptores de integrina que regulan la interacción celular con la matriz.
Carcinogénesis.	Suprime el crecimiento de células tumorales. Algunos carcinomas y leucemias son estimulados positivamente.
Inmunidad.	Suprime la proliferación de todas las clases de linfocitos. Inhibe secreción de IgG e IgM por parte de linfocitos B. Suprime la liberación de citocinas por parte de linfocitos T.
Efectos en hematopoyesis.	Suprime la proliferación de precursores mieloides <i>in vivo</i> . Suprime el crecimiento de células inmaduras dependientes de IL-3 y GM-CSF. Inhibe la megacariopoyesis. Inyecciones intraperitoneales por 5 días, inhiben la formación de CFU-S. La administración intrafemoral, abate la proliferación de células de médula ósea. Protege a las células progenitoras de agentes quimioterapéuticos específicos de ciclo celular.

Tomado y modificado de Hamblin 1993; Roberts & Sporn 1992

El papel del TGF- β en la regulación de la hematopoyesis se ha estudiado *in vivo* utilizando diferentes modelos en ratón (Fortunel *et al*, 2000). Específicamente, las isoformas TGF- β 1 y TGF- β 2 tienen la capacidad de proteger a células tallo/progenitoras hematopoyéticas de tratamientos con altas dosis de 5-FU (Grzegorzewski *et al*, 1994), de este modo ejerce un control negativo sobre el ciclo celular de células primitivas hematopoyéticas de ratón *in vivo* sin inducir muerte celular (Jansen *et al*, 1991; Grzegorzewski *et al*, 1994). La función del TGF- β como efector de quiescencia en las células tallo/progenitoras hematopoyéticas, se ha estudiado extensivamente *in vitro* por medio de ensayos de colonias en medios semisólidos, sistemas de cultivo basados en estroma y cultivos líquidos de una sola célula tanto en sistemas humanos como de ratón (Fortunel *et al*, 2000).

El TGF- β actúa como un fuerte inhibidor de la proliferación de células progenitoras muy primitivas, mientras que en células más maduras la inhibición puede ser menos evidente,

debido a la presencia de células poco responsivas al factor (Pascal *et al*, 1996). Se ha demostrado su capacidad para inhibir la formación de colonias en células progenitoras hematopoyéticas humanas y de ratón en medio semisólido (Ottmann & Pelus 1988; Sing *et al*, 1988; Jacobsen *et al*, 1991) pero no de progenitores más comprometidos (Ohta *et al*, 1987; Keller *et al*, 1988; Keller 1990). En estos estudios, el efecto del TGF- β en la formación de colonias se ha probado en combinación con uno o dos factores de crecimiento exógenos adicionados al medio con suero o bien, medio condicionado con una combinación de otros factores de crecimiento. Las citocinas generalmente usadas son IL-3, GM-CSF, M-CSF y EPO. En estas condiciones de cultivo, el TGF- β eficientemente inhibe la formación de colonias por parte de progenitores multipotenciales humanos (CFU-Mix) (Jacobsen *et al*, 1991), siendo las células primitivas las que muestran mayor sensibilidad al efecto inhibitorio inducido por el TGF- β (Pascal *et al*, 1996) .

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Desde hace algunos años es conocido que la interleucina-1 beta (IL-1 β), una citocina multifuncional producida por una amplia variedad de tipos celulares, tiene la propiedad de regular negativamente la proliferación de células mieloides totipotenciales (Yonemura *et al*, 1996), así como de líneas hematopoyéticas transformadas (Tabla 6), mientras que también puede inhibir la proliferación de las células 32D (Martínez 2000), una línea mieloides multipotencial de ratón y dependiente de IL-3. Sin embargo, a pesar de que existen indicios de que la inhibición de la hematopoyesis ocurre de manera indirecta, es decir vía la síntesis de supresores hematopoyéticos (Gasparetto *et al*, 1989), no es claro que tipos celulares participan en el mecanismo inhibitorio inducido por IL-1 β . Por ello el presente trabajo tiene como finalidad definir si el mecanismo supresor mediado por IL-1 β es mediante la liberación de los supresores hematopoyéticos TNF- α y/o TGF- β .

TIPO CELULAR	MECANISMO INHIBITORIO
Línea de linfoma de células T de ratón Eb.	Bloqueo del ciclo celular en G0/G1. (Lovett <i>et al</i> , 1986)
Línea de leucemia mieloides de ratón M1.	Inducción de diferenciación. (Onozaki <i>et al</i> , 1992)
Línea de leucemia mieloides de ratón U937.	Inducción de diferenciación. (Onozaki <i>et al</i> , 1989)
Línea mieloides humana K562.	Bloqueo del ciclo celular en G0/G1. (Lovett <i>et al</i> , 1986)
Unidades formadoras de colonias de granulocito-macrófagos de simio.	Detección de TNF- α en suero. (Gasparetto <i>et al</i> , 1989)
Células hematopoyéticas totipotenciales de ratón Ly-6a/E+.	Sin mecanismo propuesto. (Yonemura <i>et al</i> , 1996)
Línea celular mieloides 32D.	Sin mecanismo propuesto. (Martínez 2000)

Tabla 6. Tipos celulares hematopoyéticos sobre los que IL-1 inhibe la proliferación.

JUSTIFICACIÓN.

La realización de este estudio permite entender los mecanismos involucrados en la inhibición de la hematopoyesis mediada por la interleucina-1, siendo base para estudios posteriores tendientes a entender cuadros de hematopoyesis anormal (leucemia, anemia). En los casos en los que el curso normal del proceso hematopoyético ha sido alterado, ya sea hacia la proliferación o supresión de la misma, la participación de la IL-1 puede ser determinante, en este sentido varios estudios reconocen que IL-1 β puede actuar como un factor de crecimiento autócrino y parácrino de diversos tipos de leucemia (Attias *et al* 1995; Estrov *et al*, 1995; Schiro *et al*, 1994; Estrov *et al*, 1991; Sakai *et al*, 1987), participando activamente en la progresión del estadio patológico (Darrin *et al*, 1999). Debido a la importancia de la IL-1 como factor modulador del crecimiento para las células leucémicas, es necesario un análisis mas profundo del mecanismo por el cual esta citocina regula negativamente la hematopoyesis en modelos normales como el de la línea celular 32D, para completar el marco de acción de la IL-1 en la hematopoyesis y en función de ello, explorar las posibilidades terapéuticas y sus implicaciones tanto positivas como negativas en la salud.

HIPÓTESIS.

Se sabe que la interleucina-1 beta (IL-1 β) inhibe la proliferación de las células mieloides multipotenciales de ratón 32D. Se ha reportado que altas dosis de IL-1 β inducen la producción de TNF- α y TGF- β 1 dos clásicos inhibidores de la hematopoyesis en varios tipos celulares incluyendo los monocito-macrófago y células de leucemia promielocítica aguda. Además se ha identificado la expresión constitutiva de RNAm para TNF- α y TGF- β 1 en células hematopoyéticas humanas CD34+. Por lo anterior se espera que la IL-1 β , induzca la producción del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF- β 1) en las células 32D y sean estos factores los responsables de la inhibición de la proliferación.

OBJETIVO.

Determinar si el TNF- α o TGF- β 1 son los responsables de la inhibición de la proliferación de las células 32D tratadas con rhIL-1 β .

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar el efecto del rhIL-1 β , rhTGF- β 1 y rmTNF- α en la proliferación de la línea celular 32D.
2. Definir si los sobrenadantes del cultivo de células 32D tratadas con rhIL-1 β (MC) tienen actividad tipo TNF- α .
3. Definir si los sobrenadantes del cultivo de células 32D tratadas con rhIL-1 β (MC) tienen actividad tipo TGF- β 1.
4. Evaluar la expresión de RNAm de la(s) citocina(s) inducida(s) por la rhIL-1 β en las células 32D.
5. Determinar la participación de la(s) citocina(s) inducida(s) por la rhIL-1 β , en el abatimiento de la proliferación celular de 32D, por medio de bloqueo del factor con el anticuerpo respectivo.

METODOLOGÍA.

Líneas celulares.

Para este trabajo se empleó la línea celular hematopoyética multipotencial de ratón 32D dependiente de interleucina-3 (IL-3), la cual fue donada por la Dra. T. Hoang (Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia, Montreal, Canadá). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's (Gibco BRL, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, USA), adicionando 0.5 ng/mL de interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3) (R&D System, USA) y se mantuvieron a una temperatura de 37° C y 5% de CO₂. La línea celular epitelial de pulmón de bisón Mv1Lu y la línea celular de fibrosarcoma de pulmón de ratón L929, se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo que las células 32D a excepción de la adición de IL-3.

Citocinas recombinantes y anticuerpos.

Para este trabajo se utilizó interleucina-1 beta recombinante humana (rhIL-1 β), interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3), factor de necrosis tumoral alfa recombinante de ratón (rmTNF- α), factor de crecimiento transformante beta 1 recombinante humano (rhTGF- β 1), interferón gamma recombinante de ratón (rmIFN- γ) y anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa de ratón (anti-TNF- α) obtenidas de R&D Systems, USA. Todas las citocinas se reconstituyeron en PBS al 0.1 % de albúmina sérica bovina, el anticuerpo se reconstituyó en PBS. En todos los casos se alicuotó y almacenó a -70° C hasta su uso.

Evaluación de la proliferación y viabilidad.

Para evaluar el efecto de la rhIL-1 β , rmTNF- α , rhTGF- β 1 y rmIFN- γ en la proliferación de las células 32D, se cultivaron 1x10⁵ cel/mL en placas de 96 pozos (Nuclon, USA) en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de los recombinantes antes mencionados, después de 48 horas de cultivo se procedió a evaluar el número celular por

conteo directo utilizando un hemocitómetro, se efectuaron tres ensayos independientes con tres repeticiones por condición. Paralelamente se determinó la viabilidad celular por la técnica de exclusión al azul tripano (Sigma, USA), como se describe previamente (Rodel & Link 1996; Tanaka *et al*, 1993), se utilizó una proporción 1:1 de colorante y de muestra celular presentándose como porcentaje de células vivas (no teñidas con el colorante).

Evaluación de la diferenciación.

Para todos los recombinantes, se evaluó la inducción a la diferenciación morfológica. Para esto se realizaron frotis, que posteriormente fueron fijados con metanol absoluto y teñidos con Wright-Giemsa (Sigma, USA). Se establecieron los porcentajes de células diferenciadas hacia los linajes monocito-macrófago y granulocito-neutrófilo, debido a que son los linajes comúnmente derivados de la diferenciación de las células 32D, distinguiendo los blastos de las células diferenciadas por su tamaño, forma del núcleo y proporción núcleo/citoplasma (Greenblatt & Elias 1992; Harris *et al*, 1998; Hayashi *et al*, 1994).

Bioensayos para detectar actividad biológica de TNF- α o TGF- β 1.

Para detectar actividad biológica de TNF- α o TGF- β 1 en el medio condicionado de las células 32D con y sin tratamiento de rhIL-1 β , se emplearon las líneas celulares sensibles: L929 para el TNF- α (Bharat & Jordan 1992) y Mv1Lu para el TGF- β 1 (Wu *et al*, 1996).

Brevemente, las células Mv1Lu se cultivaron a una densidad de 2.5×10^3 células/0.1 mL en placas de 96 pozos (Nuclon, USA) por 24 horas. Posteriormente se sustituyó el medio por 50 μ L de medio de cultivo nuevo mas 50 μ L de medio condicionado (MC) con y sin tratamiento de rhIL-1 β . Se consideraron controles positivos de 1 ng/mL de rhTGF- β 1, control negativo de MC de células 32D sin estímulo y un control de 5 ng/mL de rhIL-1 β . Se evaluó la proliferación celular mediante conteo directo a las 48 horas de cultivo.

Por otro lado, la línea celular L929 se cultivó a una densidad de 3×10^4 células/0.1 mL en placas de 96 pozos por 12 horas. Posteriormente se sustituyó el medio de cultivo, por 50 μ L

de medio nuevo mas 50 uL de MC de 32D con y sin tratamiento de rhIL-1 β y adicionando 0.5 ug/mL de actinomicina D como coadyuvante. Se consideraron controles negativos de actinomicina D, 5 ng/mL de rhIL-1 β , MC de 32D sin estímulo y como control positivo 10 ng/mL de rmTNF- α , permaneciendo en condiciones de cultivo por 16 horas. Finalmente se evaluó el porcentaje de sobrevivencia por exclusión al azul tripano.

Para ambos ensayos biológicos se efectuaron al menos tres ensayos independientes con tres repeticiones por condición.

Expresión de genes de las citocinas inducidas por la rhIL-1 β .

La expresión de RNAm para la citocina inducida por la rhIL-1 β fue determinada mediante el ensayo de transcripción reversa acoplada de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Brevemente, mediante la técnica de extracción de RNA por Trizol (Invitrogen), se extrajo el RNA total a partir de 1.5×10^6 células cultivadas en presencia de 5 ng/mL de rhIL-1 β , estas células se cosecharon, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con 10 mL de PBS repitiéndose el lavado con 1 mL en un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 mL (nuevo y estéril) para obtener el botón. Las células fueron lisadas con 1 mL de Trizol resuspendiendo continuamente hasta homogenizar la mezcla; el lisado se conservó a -70° C hasta su extracción. Para su extracción se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 0.2 mL de cloroformo, agitando por 15 segundos para después incubar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a una temperatura de 2 a 8° C, separándose la fase acuosa (con RNA) a otro tubo eppendorf. Se precipitó con 0.5 mL de isopropanol dejando incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos de 2 a 8° C, eliminándose el sobrenadante y lavando el RNA con 1 mL de etanol al 75% en agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC), posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos de 2 a 8° C eliminándose el sobrenadante para dejarse secar a temperatura ambiente. El

botón de RNA que es extraído, se resuspendió en agua DEPC (0.01%) calentándose en baño maría a 65° C por 5 minutos, para ser colocado posteriormente en hielo.

Para determinar cualitativamente la integridad del RNA extraído, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en amortiguador de TBE 1X (Tris, ácido bórico y EDTA, disuelto en agua estéril y desionizada), adicionando 4 uL de bromuro de etidio (10 mg/mL) por cada 100 mL de agarosa. El RNA frío se mezcló tomando 4 uL del stock y resuspendiendo en 4 uL de amortiguador de carga para RNA (Glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0.01- 0.05% y xilencianol 0.5 % en agua DEPC), colocándose en cada pozo del gel. El corrimiento se realizó a 70 volts, visualizándose con un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (FotoDyne) distinguiéndose las bandas constitutivas de RNA total (18S y 28S).

Para evaluar la concentración de RNA total de la extracción, se realizó una dilución 1:250 de los RNA's en agua desionizada y las diluciones fueron leídas en un espectrofotómetro (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey) de luz UV a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

El RNA para cada muestra fue retrotranscrito a DNA complementario (cDNA) por la técnica universal de RT utilizando el kit Gene Amp RNA PCR (Perkin Elmer, USA). Partiendo de 1 ug de RNA total, se mezclaron 2.0 uL de MgCl₂ (25 mM), 1.0 uL de Buffer 10X, H₂O DEPC (la necesaria para un volumen final de 10 uL) 4.0 uL de dNTP's (10 mM), 0.5 uL de inhibidor de RNasa (20 U/mL), y 0.5 uL de la transcriptasa reversa (MuLV) (50 U/uL), 0.5 uL del primer Oligo dT, 0.5 uL de ditiotreitól (DTT) (0.1 M) en un tubo para RT. El volumen total de 10 uL de reacción se incubó 60 minutos a 42° C, posteriormente 10 minutos a 90° C y por último 5 minutos a 4° C utilizando un termociclador (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey). El producto de la RT fue amplificado mediante una mezcla de reacción para PCR, la cual consiste de 2.0 uL de MgCl₂ (25 mM), 4.0 uL de Buffer 10X, 28.35 uL de agua DEPC, 1 uL de dNTP's, 0.25 uL de DNA polimerasa 5 U/mL (Amplitaq), 0.2 uL del primer sentido y antisentido para β-actina (1 uM), 10 uL del cDNA, 2 uL del primer sentido y antisentido para TNF-α, con un volumen final de reacción de 50

uL. Incubándose la muestra un minuto y 45 segundos a 95° C, ligado a 35 ciclos de dos segmentos de 15 segundos a 95° C y 30 segundos a 60° C respectivamente, seguidos de 7 minutos a 72° C, ligado a 4° C en el termociclador (Systems 9600 Perkin Elmer, New Jersey), para inactivar la enzima y alinear los productos.

En la electroforesis, se corrió el producto de PCR en un gel de agarosa preparado como se mencionó anteriormente para el RNA. De los 50 uL del volumen de reacción de cada PCR, se tomaron 4 uL a los cuales se incorporaron 4 uL de amortiguador de carga y una vez resuspendidos, se colocaron en cada pozo del gel sumergido en amortiguador TBE 1X. El corrimiento electroforético fue como se describió anteriormente. Transcurridos 45 minutos de corrimiento, se visualizó el gel en el transiluminador de UV y los resultados fueron fotografiados en cámara CCD Foto/Analyst (FotoDyne), identificándose las bandas del RNA_m para el TNF- α . El tamaño en pares de bases (pb) de los productos es: 212 pb para TNF- α y 241 pb para β -actina. Se emplearon marcadores de peso molecular de 242 pb como patrón de referencia para los productos.

Bloqueo de factores.

Para identificar la participación del factor secretado al medio condicionado por estímulo de la rhIL-1 β , se efectuaron ensayos de bloqueo con anticuerpo en cultivos de células 32D estimuladas con rhIL-1 β . Brevemente, se cultivaron células 32D a una densidad inicial de 1×10^5 cel/mL en placas de 96 pozos. Previamente se incubó el anticuerpo anti-TNF- α por 60 minutos a 37° C y concluido el tiempo de incubación, se adicionó a la placa de cultivo con los controles positivos de citocina recombinante y anticuerpo mas citocina en dosis necesaria para bloquear la actividad del recombinante. Se evaluó la proliferación a 48 horas de cultivo.

RESULTADOS.

La rhIL-1 β bloquea la proliferación de las células 32D.

Para confirmar que la IL-1 β regula negativamente la proliferación de la línea celular 32D de ratón, esta línea celular se cultivó con o sin rhIL-1 β durante 48 horas. Se encontró que la proliferación celular se abate, con respecto al control hasta en un 40 y 43 % con dosis de 5 y 50 ng/mL de citocina recombinante respectivamente, mientras que se restablece la proliferación en la concentración de 0.01 ng/mL, sin embargo el bloqueo de la proliferación mediada por rhIL-1 β no alcanzó los niveles inducidos por 25 ng/mL de rmIFN- γ el cual es considerado como un clásico inhibidor de la hematopoyesis (Yoshida 1994) (Figura 1).

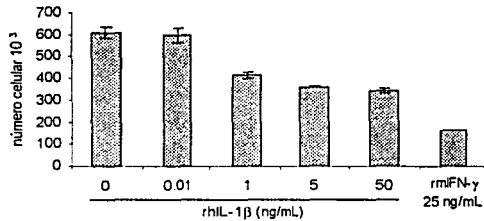


Figura 1. Curva dosis-respuesta de la proliferación de 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de diferentes dosis de interleucina-1 beta recombinante humano (rhIL-1 β) y como testigo de inhibición se emplea el interferón gama recombinante de ratón (rmIFN- γ).

La inhibición de la proliferación de 32D en presencia de rhIL-1 β no afecta la viabilidad ni estatus de diferenciación celular.

Para descartar la posibilidad de que la reducción de la proliferación inducida por rhIL-1 β , sea consecuencia de un efecto tóxico, se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión al azul tripano. Los resultados indican que aún cuando se reduce la proliferación, se mantiene una viabilidad celular superior al 90%, independientemente de la dosis de citocina empleada en cultivo durante 48 horas (Figura 2), esto permite descartar que la

rhIL-1 β sea citotóxica sobre 32D y por lo tanto que la reducción en la proliferación sea debida a muerte celular por necrosis. Por otro lado, debido a que la reducción en la proliferación de células primitivas como las 32D se relaciona con la inducción a la diferenciación, se evaluó si las células tratadas con rhIL-1 β presentaban algún cambio en sus características morfológicas.

Se confirmó que las células estimuladas durante 48 horas con rhIL-1 β al ser teñidas con giemsa no presentan diferenciación morfológica, ya que el porcentaje de blastos es superior al 90%, similar a los niveles basales independientemente del tratamiento, en contraste, el estímulo con rmlFN- γ (un clásico inductor de diferenciación), indujo la diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago hasta en un 44% de la población (Figura 3).

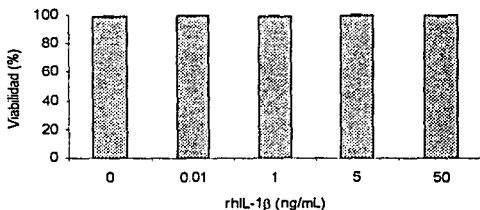


Figura 2. Porcentaje de viabilidad celular de 32D después de 48 horas de estímulo con diferentes dosis de rhIL-1 β .

El rmtNF- α y el rhTGF- β 1 reducen la proliferación de 32D al mismo nivel que la rhIL-1 β .

Considerando que el TNF- α y TGF- β 1, son reconocidos inhibidores de la hematopoyesis y por tanto fuertes candidatos a mediar el bloqueo inducido por la rhIL-1 β , se procedió a confirmar si ambos factores recombinantes inducen efectos similares a la rhIL-1 β sobre las células 32D.

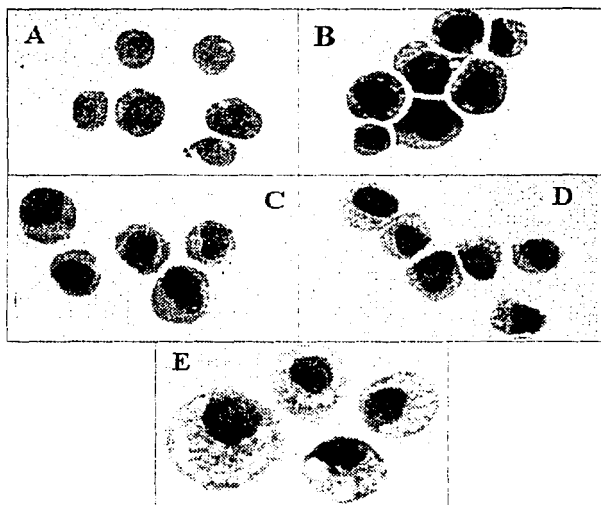


Figura 3. Morfología de células 32D después de 48 horas de cultivo sin estímulo (A) o estimuladas con 5 ng/mL de rhIL-1 β (B); 10 ng/mL de rmTNF- α (C); 1 ng/mL de rhTGF- β 1 (D) o 25 ng/mL de rmIFN γ (E). Tinción con Giemsa 40X.

Los resultados indican una respuesta dosis dependiente de rmTNF- α , particularmente la dosis de 10 ng/mL reduce la proliferación celular de 32D respecto al control en un 48% a las 48 horas de cultivo (Figura 4). Por otro lado, se evaluó bajo las mismas condiciones de cultivo, la proliferación celular de 32D al ser estimulada durante 48 horas con rhTGF- β 1. La respuesta es dosis dependiente aunque 1 ng/mL de rhTGF- β 1 induce la mayor inhibición de la proliferación de las células 32D, aproximadamente de 42% respecto al control. (Figura 5).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

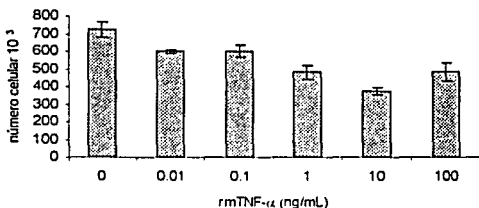


Figura 4. Curva dosis-respuesta de la proliferación de 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de diferentes dosis de factor de necrosis tumoral alfa recombinante de ratón (rmTNF- α).

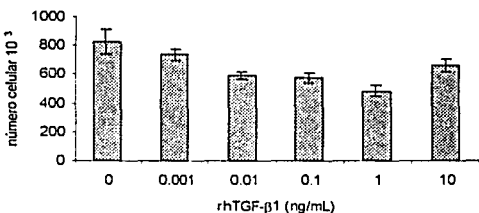


Figura 5. Curva dosis-respuesta de la proliferación de 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de diferentes dosis de factor de crecimiento transformante beta 1 recombinante humano (rhTGF- β 1).

Las proteínas recombinantes TGF- β 1 y TNF- α no afectan la viabilidad ni estatus de diferenciación de las células 32D.

Ambas citocinas recombinantes regulan negativamente la proliferación de la línea celular 32D de manera similar a la rhIL-1 β , sin embargo para considerar que estas dos citocinas podían estar involucradas en la supresión hematopoyética inducida por rhIL-1 β , era necesario que el comportamiento de las células 32D expuestas a las proteínas recombinantes TNF- α y TGF- β 1 fuera igualmente similar en lo que respecta a viabilidad y

diferenciación morfológica, por lo que se evaluaron estos parámetros en las mismas condiciones de cultivo que para la rhIL-1 β .

Las células tratadas con o sin rhTGF- β 1 y rmTNF- α mantienen una viabilidad superior al 90% para todas las dosis durante 48 horas de estímulo (Figura 5 y 6). Asimismo, las células teñidas con giemsa no mostraron cambios morfológicos por estímulo de los recombinantes, siendo los porcentajes de células no comprometidas hacia diferenciación superiores al 90% tanto en células con o sin tratamiento de rmTNF- α y rhTGF- β 1, únicamente la presencia de rmIFN- γ induce diferenciación hacia el linaje monocito-macrófago (Figura 3).

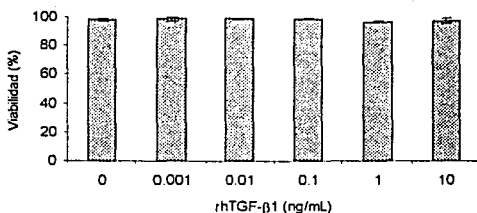


Figura 6. Porcentaje de viabilidad de las células 32D después de 48 horas de estímulo con diferentes dosis de rhTGF- β 1.

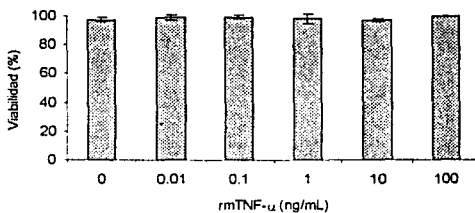


Figura 7. Porcentaje de viabilidad de las células 32D después de 48 horas de estímulo con diferentes dosis de rmTNF- α .

El medio condicionado de células 32D tratadas con rhIL-1 β durante 48 horas de cultivo tiene actividad tipo TNF- α pero no TGF- β 1.

Una vez que se confirmó la regulación negativa de la hematopoyesis por parte de la rhIL-1 β , así como de las citocinas candidato a moduladores negativos de la proliferación mediada por rhIL-1 β , se efectuaron ensayos biológicos para detectar actividad tipo TNF- α y TGF- β 1 en el sobrenadante de cultivos de células 32D tratadas con rhIL-1 β (medio condicionado: MC).

Cuando las células Mv1Lu, una línea sensible a la presencia de TGF- β , fue expuesta al medio condicionado de 32D con y sin estímulo de rhIL-1 β , no se observó inhibición de la proliferación, en cambio el rhTGF- β 1 suprimió la proliferación celular de la línea Mv1Lu en aproximadamente un 31% (Figura 8). Para descartar que la rhIL-1 β presente en el medio condicionado fuera la responsable de la inhibición de la proliferación celular de Mv1Lu, se le incluye como control en la misma concentración de estímulo para la línea celular 32D y como se observa tampoco tiene efecto sobre la proliferación de Mv1Lu (Figura 8).

Para detectar la presencia de TNF- α en el sobrenadante de los cultivos de células 32D, las células L929, una línea sensible a la presencia del factor, fue expuesta al medio condicionado de 32D cultivadas en presencia o ausencia de rhIL-1 β . Los resultados muestran que el medio condicionado de las células 32D tratadas con rhIL-1 β induce abatimiento de la viabilidad de la línea celular L929 hasta en un 34% respecto al control (Figura 9). La adición de rhIL-1 β al cultivo de las células L929 no reduce la viabilidad, únicamente el medio condicionado de 32D tratadas con rhIL-1 β y el recombinante de TNF- α impactan negativamente la viabilidad de las células L929 (Figura 9). Debido a esto, se consideró que el TNF- α biológicamente activo encontrado en el medio condicionado, podía participar en la supresión de la proliferación celular de 32D inducida por la rhIL-1 β .

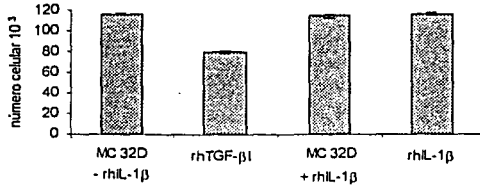


Figura.8 Bioensayo para detectar TGF- β 1 en el medio condicionado de células 32D usando la línea celular Mv1Lu. MC 32D - rhIL-1 β , medio condicionado de células 32D en ausencia de rhIL-1 β ; rhTGF- β 1, 1 ng/mL de rhTGF- β 1; MC 32D + rhIL-1 β , medio condicionado de células 32D cultivadas en presencia de 5 ng/mL de rhIL-1 β .

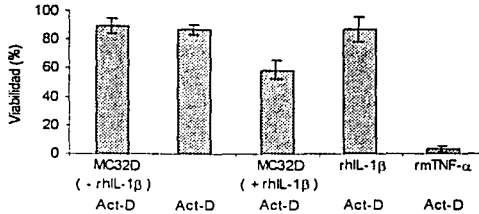


Figura 9. Bioensayo para detectar TNF- α en el medio condicionado de células 32D usando la línea celular L929. MC32D (- rhIL-1 β) Act-D, medio condicionado de células 32D en ausencia de rhIL-1 β mas Act-D; Act-D, 0.5 ug/mL de actinomicina D como coadyuvante; MC32D (+ rhIL-1 β) Act-D, medio condicionado de células 32D cultivadas en presencia de 5 ng/mL de rhIL-1 β mas Act-D; rhIL-1 β Act-D, 5 ng/mL de rhIL-1 β mas Act-D; rmTNF- α Act-D, 10 ng/mL de rmTNF- α mas Act-D.

La rhIL-1 β incrementa la expresión de RNAm de TNF- α en las células 32D.

Una vez identificada actividad biológica similar a TNF- α en el MC de las células 32D tratadas con rhIL-1 β , se evaluó si existía incremento en la expresión de RNAm mediante el ensayo de transcripción reversa acoplada de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

El producto de RT-PCR (Figura 10) muestra que el estímulo de rhIL-1 β incrementa la expresión de RNAm para TNF- α en las células 32D, de esta manera la presencia de la citocina en el MC se correlaciona con el incremento en la expresión del gen.

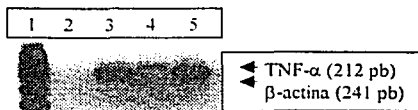


Figura 10. Producto del RT-PCR para TNF- α en las células 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de 5 ng/mL de rhIL-1 β . Carril 1: pesos moleculares; carril 2 y carril 4: células 32D cultivadas sin y con rhIL-1 β respectivamente. Carril 3 y carril 5: β -actina de células 32D cultivadas sin y con rhIL-1 β respectivamente.

El bloqueo de la proliferación de las células 32D tratadas con rhIL-1 β , es parcialmente mediado por el TNF- α .

Demostramos por RT-PCR que la rhIL-1 β incrementa la expresión de RNAm para TNF- α en las células 32D y que el incremento se correlaciona con la traducción a proteína biológicamente activa evidenciada por el ensayo biológico de la línea celular L929. Para asegurar la identidad de TNF- α y definir su participación en la supresión de la proliferación de 32D, se estimuló a estas últimas con rhIL-1 β adicionando el anticuerpo dirigido contra TNF- α en dosis suficiente para bloquear la actividad de 10 ng/mL de citocina recombinante. El anti-TNF- α es capaz de reconstituir en un 43% la proliferación de 32D a pesar de la presencia de la rhIL-1 β , mientras que el anticuerpo solo no afectó la proliferación (Figura 11).

TESIS CON
FALLA DE URGEN

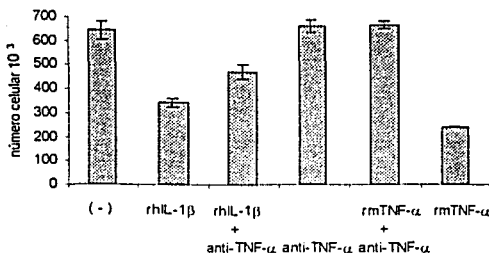


Figura 11. Proliferación de 32D después de 48 horas de cultivo en presencia de rhIL-1 β y anti-TNF- α . (-), células 32D sin estímulo; rhIL-1 β , células 32D cultivadas en presencia de 5 ng/mL de rhIL-1 β ; rhIL-1 β + anti-TNF- α , células 32D cultivadas en presencia de rhIL-1 β y anti-TNF- α ; anti-TNF- α , células 32D cultivadas en presencia de 16 μ g/mL de anticuerpo anti-TNF- α ; rmTNF- α + anti-TNF- α , células 32D cultivadas en presencia de rmTNF- α y anti-TNF- α ; rmTNF- α , células 32D cultivadas en presencia de 10 ng/mL de rmTNF- α .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN.

La interleucina-1 (IL-1) es una citocina multifuncional que por su reconocido papel como estimuladora de la hematopoyesis, frecuentemente es incluida en los protocolos terapéuticos de expansión de células primitivas hematopoyéticas normales (Yonemura *et al*, 1996), sin embargo la participación de la interleucina-1 en hematopoyesis no está restringida únicamente como modulador positivo, ya que se ha demostrado que es capaz de suprimir la proliferación *in vitro* de las células hematopoyéticas totipotenciales Ly-6a/E+ de ratón (Yonemura *et al*, 1996), abate la multiplicación *in vivo* de unidades formadoras de colonias de granulocito-macrófagos (CFU-GM) en un modelo de primates (Gasparetto *et al*, 1989), mientras que frena la proliferación de la línea celular multipotencial de ratón 32D (Martínez 2000), así como de algunos tipos de leucemia mieloide aguda (AML) (Carter *et al*, 1992; Bruserud 1996). De esta manera aún cuando existen estudios que reconocen el potencial de la IL-1 como supresora hematopoyética y la participación de supresores hematopoyéticos, no es claro el mecanismo por el que la IL-1 β suprime la hematopoyesis en células multipotenciales.

Debido a que la mayoría de los efectos biológicos de la IL-1 son mediados por la inducción de otras citocinas, se propuso que las células 32D al ser estimuladas con rhIL-1 β debían estar secretando supresores hematopoyéticos, siendo éstos los principales responsables del abatimiento de la proliferación celular. De entre los principales responsables del freno de la hematopoyesis se encuentran el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), es por ello que aquí se les considera como candidatos a moduladores negativos inducidos por la IL-1 β .

Se encontró que el sobrenadante de las células 32D tratadas con rhIL-1 β incrementan la expresión del gen para TNF- α , esto indica que las células hematopoyéticas multipotenciales 32D son capaces de sintetizar la proteína biológicamente activa, de ésta manera la síntesis de TNF- α no esta restringida a células maduras como tradicionalmente se ha considerado (Ferdy *et al*, 1998). Además se evidencia su participación en el abatimiento de la proliferación celular de 32D tratadas con rhIL-1 β siendo su intervención

parcial dado que la presencia del anticuerpo anti-TNF- α , no restablece por completo la proliferación celular, lo cual sugiere que la IL-1 β y el TNF- α son los responsables del efecto inhibitorio o bien que otro modulador negativo esta siendo secretado. La intervención del TNF- α en la inhibición hematopoyética inducida por IL-1 β concuerda con un modelo *in vivo* donde la IL-1 β es administrada vía intravenosa y en el que existe inducción de TNF- α , el cual participa al menos en parte en la supresión de CFU-GM, sin embargo este estudio no especifica que tipos celulares participan en la secreción del inhibidor hematopoyético (Gasparetto *et al*, 1989). El modelo de células 32D permite esclarecer la participación de células multipotenciales en la secreción de TNF- α , existiendo la posibilidad de que otros inhibidores por ejemplo, MIP-1 α o iNOS inducidos tanto por la IL-1 β como por el TNF- α (Dinarello 1996; Reykdal *et al*, 1999), pueden estar involucrados en la supresión hematopoyética inducida por IL-1 β .

Considerando que el TNF- α es un reconocido inductor de muerte celular (Giora *et al*, 1991), es difícil explicar la razón por la que en las presentes condiciones de trabajo, el TNF- α tanto en forma recombinante como de proteína secretada permite la sobrevivencia de las células 32D.

Se sabe que los efectos biológicos del TNF- α son mediados a través de dos receptores conocidos como p55 y p75, expresados prácticamente en todas las células hematopoyéticas con excepción de eritrocitos y células T no estimuladas (Beyert & Fiers 1998; Lewis *et al*, 1991). Varios estudios relacionan el tipo de receptor expresado, con la supresión hematopoyética inducida por el TNF- α , de esta manera se sabe que los receptores p55 y p75 están involucrados en la supresión de la proliferación de las células CD34+ y células Lin-Sca-1+ respectivamente (Rusten *et al*, 1994; Fahlman *et al*, 1994). Asimismo se ha intentado correlacionar la ruta metabólica activada ya sea por apoptosis o arresto en el ciclo celular con el tipo de receptor, sin embargo el papel de los receptores en la inhibición de la hematopoyesis no es del todo claro y en su mayoría controversial, por ejemplo el efecto apoptótico del TNF- α está bien documentado y principalmente mediado a través del receptor p55 (Baker & Reddy 1996; Yuan 1997; Zheng *et al*, 1995), así en las células T

humanas de individuos adultos la expresión de p55 pero no p75 incrementa la susceptibilidad a apoptosis inducida por el TNF- α (Aggarwal *et al*, 1999), sin embargo también se ha reportado que el receptor p55 esta involucrado en una ruta no apoptótica (Rath & Aggarwal 1999), mientras que el receptor p75 puede participar en la inducción de apoptosis (Baxter *et al*, 1999), o suprimir la proliferación sin muerte celular (Zheng *et al*, 1995).

Por otro lado la sola presencia de un receptor por ejemplo p75, no determina necesariamente la capacidad del TNF- α para inducir muerte celular, el efecto en proliferación y muerte no ocurre por lo tanto exclusivamente a través de un solo tipo de receptor (Baxter *et al*, 1999), siendo la proporción de ambos receptores decisiva en predeterminar citotoxicidad en respuesta a TNF- α (Van Ostade *et al*, 1994; Declercq *et al*, 1998), es por ello que el balance entre el tipo de receptor expresado en las células 32D probablemente sea la clave para definir la inhibición de la proliferación inducida por el TNF- α .

Sin embargo, no es extraño que la combinación de IL-1 β y TNF- α reduzcan la proliferación sin afectar la viabilidad celular como aquí se muestra, ya que por separado estas citocinas son capaces de promover la sobrevivencia celular. Este dato concuerda con evaluaciones en las que el TNF- α incrementa la sobrevivencia *in vitro* de células Lin- Sca-1+ de ratón, elevando el número de células viables y suprimiendo apoptosis hasta tres veces en presencia de IL-1 β (Jacobsen *et al*, 1996). Así se ha observado que la IL-1 β puede suprimir apoptosis en sinergia con TNF- α (Neta *et al*, 1988; Jacobsen *et al*, 1996), lo cual explica en parte el papel radioprotector de ambas citocinas sobre células mieloides (Neta 1997; Karkanitsa *et al*, 1997; Dalmau *et al*, 1997).

Por otro lado, el medio condicionado de células 32D no muestra actividad biológica de TGF- β , a pesar de que es una citocina inducible por la IL-1 β (Yang *et al*, 1999), que se ha identificado en el sobrenadante de células CD34+ de médula ósea humana normal (Majka *et al*, 2001) y que el recombinante actúa como supresor hematopoyético de manera análoga a rhIL-1- β y rmTNF- α , es decir abate la proliferación sin inducir muerte celular o

diferenciación. Existe la posibilidad de que si el TGF- β es secretado por las células 32D en una cantidad muy pequeña, no sea detectado por el ensayo biológico. Aunado a ello, en la mayoría de las células el TGF- β es secretado en forma de complejos latentes biológicamente inactivos, dicha inactividad está asociada con un dímero pro-peptídico llamado proteína asociada a latencia o LAP (Yin *et al*, 1995; Moren *et al*, 1994; Saharinen *et al*, 1998), el cual permanece unido al TGF- β aún después de su secreción y que evita que esta molécula tenga actividad biológica. Es probable que la IL-1 β no tenga la capacidad de inducir la liberación de TGF- β biológicamente activo en las células 32D, lo que podría explicar la ausencia de actividad biológica de TGF- β en el medio condicionado. Por otro lado sería recomendable demostrar por ensayo de ELISA o mediante la técnica de Western Blot, la presencia o ausencia de esta citocina en el sobrenadante de cultivos tratados con rhIL-1 β . Así por el momento, no es posible excluir por completo la presencia y participación del TGF- β en el mecanismo inhibitorio de la proliferación inducido por la rhIL-1 β .

Los resultados permiten proponer un mecanismo por el que la IL-1 β regula negativamente la hematopoyesis. En las células multipotenciales 32D el estímulo de rhIL-1 β induce la producción de TNF- α , el cual actúa de manera autócrina/parácrina, suprimiendo la proliferación celular de manera conjunta con la IL-1 β o probablemente algún otro factor (Figura 11).

En el marco de la hematopoyesis, varios estudios reconocen que la IL-1 β puede actuar como un factor de crecimiento autócrino y parácrino de diversos tipos de leucemia (Attias *et al*, 1995; Estrov *et al*, 1995; Schiro *et al*, 1994; Estrov *et al*, 1991; Sakai *et al*, 1987), mientras que en estudios *in vitro*, se ha detectado que existe correlación entre la capacidad de blastos de AML para producir IL-1 β y su capacidad para crecer de manera autónoma (Bradbury *et al*, 1990; Bradbury *et al*, 1992; Cozzolino *et al*, 1989; Hoang *et al*, 1988); células progenitoras de leucemia mieloide crónica (CMIL) producen grandes cantidades de IL-1 β lo cual les confiere ventajas proliferativas (Estrov *et al*, 1991; Wetzler *et al*, 1990).

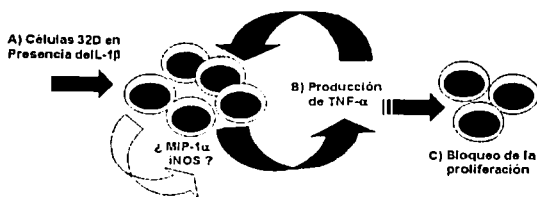


Figura 12. Propuesta del mecanismo del bloqueo de la proliferación inducido por la IL-1 β .

Algunos datos sugieren que la producción excesiva de IL-1 β por las células leucémicas es consecuencia de alteraciones en las cascadas de señalización y activación de genes; así, la IL-1 β actúa como estimuladora de la proliferación de blastos leucémicos al interactuar con células accesorias, induciendo la síntesis tanto de IL-1 como de otras citocinas. De este modo la presencia de la IL-1 en algunos casos es determinante en la progresión del estadio patológico (Darrin *et al*, 1999; Cacciola *et al*, 1994).

Tomado en cuenta estos antecedentes, en los que IL-1 β es un factor importante para la expansión autónoma de células leucémicas y si los datos *in vitro* presentados aquí se confirman *in vivo*, el cuadro para el paciente es muy desfavorable ya que la IL-1 β no únicamente estaría participando negativamente al inducir la proliferación de células leucémicas, sino también podría estar actuando a nivel de células normales, reduciendo su proliferación y agravando la condición del paciente, comprometiendo seriamente su posibilidad de respuesta inmunológica tanto por la presencia de células leucémicas incapacitadas para ejecutar una respuesta inmune efectiva, como por la ausencia de células tanto multipotenciales como totipotenciales que reconstituyan la hematopoyesis a niveles normales. Probablemente, la exploración de nuevas alternativas terapéuticas debiera centrarse en la participación y control de IL-1 β *in vivo* ya que como puede verse, su marco de acción en hematopoyesis es muy amplio no sólo por el efecto que puede tener por sí misma, sino por la inducción de otras citocinas, por ejemplo TNF- α .

A pesar de que se tiene establecido que IL-1 β es un importante factor de crecimiento para las células leucémicas, también existen reportes que han demostrado que IL-1 β puede inhibir la proliferación de algunos tipos de AML (Bruserud 1996). Por ello es necesario un análisis mas profundo de IL-1 β y TNF- α tanto en modelos normales como en leucémicos, para completar el marco de acción de ambas citocinas en la hematopoyesis y en función de ello, explorar las posibilidades terapéuticas y sus implicaciones tanto positivas como negativas en la salud.

CONCLUSIONES.

Se confirma que la rhIL-1 β regula negativamente la proliferación de 32D sin inducir diferenciación o muerte celular.

El rhTGF- β 1 y rmTNF- α inhiben la proliferación de las células 32D al mismo nivel que la rhIL-1 β .

Las células 32D tratadas con rhIL-1 β secretan al medio condicionado TNF- α biológicamente activo.

La rhIL-1 β incrementa la expresión de RNAm de TNF- α en las células 32D.

El TNF- α secretado al medio condicionado, es parcialmente responsable de la supresión de la proliferación de las células 32D tratadas con rhIL-1 β .

BIBLIOGRAFÍA.

- Aggarwal S. Gollapudi S. and Gupta S. (1999). Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases. *J Immunol* 162: 2154.
- Aiyer RA. and Aggarwal BB. (1998). Tumor necrosis factors. (Ed.) Pdock ER. *CRC Handbook on cytolytic lymphocytes and complement: effectors of the immune system.* Boca Raton Press, Florida. 132pp
- Alheim K. and Bartfai T. (1998). The interleukin-1 system: receptors, ligands and ICE in the brain and their involvement in the fever response. *Ann New York Acad Sci* 840: 51.
- Attias D. Grunberger T. Vanek W. Estrov Z. Cohen A. Lau R. and Freedman M. (1995). B-lineage lymphoid blast crisis in juvenile chronic myelogenous leukemia: interleukin-1 mediated autocrine growth regulation of the lymphoblast. *Leukemia* 9: 884.
- Baker SJ. and Reddy EP. (1996). Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12: 1.
- Baxter GT. Kuo RC. Jupp OJ. Vandenabeele P. MacEwan DJ. (1999). Tumor necrosis factor- α mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem* 274: 2939.
- Beutler B. and Cerami A. (1989). The biology of cachectin/TNF. A primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625.
- Beyert R. and Fiers W. (1998). Tumor necrosis factor and lymphotoxin. (Ed.) Mire-Sluis A. and Thorpe R. *Cytokines.* Academic Press Inc. San Diego. 335pp
- Bharat B.A. and Jordan U.G. (1992). *Human cytokines.* Blackwell Scientific Publications, London 405 pp.
- Billiau A. Van Damme J. Opdemarker G. Fibbe WE. Falkenburg JHF. (1986). Interleukin-1 as a cytokine inducer. *Immunol* 172: 323.
- Blackx B. Broeders L. Bot F. Lowenberg B. (1991). Positive and negative effects of tumor necrosis factor on colony growth from highly purified bone marrow progenitors. *Leukemia* 5: 66.
- Bonnet D. Lemoine FM. Najman A. Guigon M. (1995). Comparison of the inhibitory effect of AcSDKP, TNF-alpha, TGF-beta, and MIP-1 alpha on marrow-purified CD34+ progenitors. *Exp Hematol* 6: 551.
- Boosalis MS. Ikuta T. Pace BS. da Fonseca S. White GL. Faller DV. and Perrine SP. (1997). Abrogation of IL-3 requirements and stimulation of hematopoietic cell proliferation in vitro and in vivo by carboxylic acids. *Blood Cell Mol Dis* 23: 434.
- Bradbury D. Rogers S. Kozlowski R. Bowen G. Reilly IA. Russell NH. (1990). Interleukin-1 is one factor which regulates autocrine production of GM-CSF by the blast cells of acute myeloblastic leukaemia. *Br J Haematol* 76: 488.
- Bradbury D. Rogers S. Reilly IA. Kozlowski R. Russell NH. (1992). Role of autocrine and paracrine production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 beta in the autonomous growth of acute myeloblastic leukaemia cells-studies using purified CD34-positive cells. *Leukemia* 6: 562.

- Broxmeyer H. Williams E. Lu L. Cooper S. Anderson L. Hoffman R. Rubin Y. (1986). The suppressive influences of human tumoral necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cell from donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon- γ . *J Immunol* 136: 4487.
- Bruserud O. (1996). Effect of endogenous interleukin-1 on blast cells derived from acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* 20: 65.
- Cacciola E. Deisseroth AB. Giustolisi R. (1994). Hematopoietic growth factors, oncogenes and cytokines in clinical hematology. Karger Basel, Switzerland. 305pp
- Carter A. Silvan-Draxler I. Tatarsky I. (1992). Effect of interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-alpha on the blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Am J Hematol* 40: 245.
- Caux C. Favre C. Saeland S. Duvert V. Durand P. Mannoni P. Banchereau J. (1991). Potentiation of early hematopoiesis by tumor necrosis factor- α is followed by inhibition of granulopoietic differentiation and proliferation. *Blood* 78: 635.
- Caux C. Saeland S. Favre C. Dubert V. Mannoni P. Banchereau J. (1990). Tumor necrosis factor-alpha strongly potentiates interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitors cells. *Blood* 75: 2292.
- Ciacci-Woolwine F. Kucera LS. Richardson SH. Iyer NP. Mizel SB. (1997). Salmonellae activate tumor necrosis factor alpha production in a human promonocytic cell line via a released polypeptide. *Infect Immun* 11: 4624.
- Clark BD. Collins KL. Gandy MS. Webb AC. Auron PE. (1986). Genomic sequence for human prointerleukin-1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res* 14: 7897.
- Clark S. and Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 236: 1229.
- Cole N. Bao S. Willcox M. Husband AJ. (1999). TNF-alpha production in the cornea in response to *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Immunol Cell Biol* 2: 164.
- Cozzolino F. Rubartelli A. Aldinucci D. Sitia R. Torcia M. Shaw A. DiGuglielmo R. (1989). Interleukin-1 as an autocrine growth factor for acute myeloid leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2369.
- Dalmau SR. Freitas CS Savino W. (1997). Radio- and chemoprotection of bone marrow cells by opposite cell cycle-acting cytokines. *Leuk Res* 2: 93.
- Darrin M. Beaupre B. Moshe T. Frank C. Marini III, Richard JC, Jack A. Estrov Z. Maher A. Melvin HF. Kurzrock R (1999). Autocrine interleukine-1 β production in leukemia: evidence for the involvement of mutated RAS. *Can Res* 59: 2971.
- Davis JM. Narachi MA. Alton K. Arakawa T. (1987). Structure of human tumor necrosis factor- α derived from recombinant DNA. *Biochem* 26: 1322.
- Debets R. Timans J. Homey B. Zurawski S. Sana T. Lo S. Wagner J. Edwards G. Clifford T. Menon S. Bazan F. Kastelein R. (2001). Two novel IL-1 family members, IL-1 δ and IL-1 ϵ , function as an antagonist and agonist of NF- κ B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol* 167: 1440.
- Declercq W. Denecker G. and Fiers W. (1998). Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol* 161: 390.

- Degliatoni G. Murphy M. Kobayashi M. Francis B. Perussia G. Trinchieri G. (1985). Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony inhibiting activity and NK cytotoxic factor: relationship with tumor necrosis factor and synergy with immune interferon. *J Exp Med* 162: 1512.
- Digel W. Stefanic M. Schoniger W. Buck C. Raghavachar A. Frichhofen N. Heimpel H. Porzolt F. (1989). Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 73: 1242.
- Dinarello CA. (1991). Interleukin-1 and Interleukin-1antagonism. *Blood* 77: 1627.
- Dinarello CA. (1994). The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 5: 117.
- Dinarello CA. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87: 2095.
- Dinarello CA. (1997). Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 253.
- Dower SK. Kronheim SR. Cantrell M. Gillis S. Hemmey CS. Urdal DL. (1986). The cell surface receptor for interleukin-1 α and interleukin-1 β are identical. *Nature* 324: 266.
- Dower U. (1987). The interleukin-1 receptor. *Immunol Today* 8: 46.
- Estrov Z. Kurzrock R. Talpaz M. (1995). Interleukin-1 and its inhibitors: implications for disease biology and therapy. *Cancer Treat Res* 80: 51.
- Estrov Z. Kurzrock R. Wetzler M. Kantarjian H. Blake M. Harris D. Gutterman J. Talpaz M. (1991). Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 β (IL-1) receptor antagonist soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity. *Blood* 78: 1476.
- Fahlman C. Jacobsen FW. Veiby OP. McNiece IK. Blomhoff HK. Jacobsen SE. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors. *Blood* 84: 1528.
- Ferdy JL. Curzio R. Danielle Liénerd. (1998). Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Op Immunol* 10: 573.
- Fibbe WE. and Falkenburg JH. (1990). Regulation of hematopoiesis by interleukin-1. *Biotherapy* 2: 325.
- Flores F. (1999). Interleucina 1. (Ed.) Soto C. Cáceres C. Mendoza R. Weiss S. Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico. Mecanismos celulares y moleculares. Plaza y Valdéz editores. México. 117.
- Fortunel N. Hatzfield A. Hatzfield J. (2000). Transforming growth factor- β : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96: 2022.
- Fransen L. Ruyschaert MR. Van der Heyden. Fiers W. (1986). Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. *Cell Immunol* 100: 260.
- Furutani Y. Notake M. Fukui T (1986). Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucleic Acids Res* 14: 3167.
- Galdiero M. Cipollaro de L'ero G. Donnarumma A. Marcatili V. Galdiero F. (1995). Interleukin-1 and interleukin-6 gene expression in human monocytes stimulated with salmonella typhimurium porins. *Immunology* 86: 612.

- Gasparetto C. Laver J. Abboud M. Gillio A. Smith C. O'Reilly RJ. Moore M. (1989). Effect of interleukin-1 on hematopoietic progenitors: evidence of stimulatory and inhibitory activities in a primate model. *Blood* 74: 547.
- Gentry LE. Lioubin MN. Purchio AF. Marquardt H. (1988). Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor- β to the mature polypeptide. *Mol Cell Biol* 8: 4162.
- Giora M. Mavlight V. Alexander A. Zukiwixi A. Carrasco I. Gutterman U. (1991). Regional biologic therapy. *Cancer* 69: 557.
- Greenblatt M. and Elias L. (1992). The type B receptor for tumor necrosis factor- α mediates DNA fragmentation in HL-60 and U-937 cells and differentiation in HL-60 cells. *Blood* 80: 1339.
- Grooten J. Goosens V. Vanhaesebroeck B. Fiers W. (1993). Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. *Cytokine* 5: 546.
- Grzegorzewski K. Ruscetti FW. Usui N. (1994). Recombinant transforming factor b1 and b2 protect mice from acutely lethal doses of 5-fluorouracil and doxorubicin. *J Exp Med* 180: 1047.
- Hamblin A. (1993). Cytokines and cytokine receptors. IRL Press Oxford University Press, London. 90pp.
- Harris KW. Hu XJ. Schultz S. Arcasoy MO. Forget BG. and Clare N. (1998). The distal cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor induces granulocytic differentiation in 32D cells. *Blood* 92: 1219.
- Hayashi M. Okabe J. and Hozumi M. (1994). Flow-cytometric analysis of in vivo induction of differentiation of WEHI 3BD⁺ myelomonocytic leukemia cells by recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Exp Hematol* 22: 393.
- Hoang T. Haman A. Goncalves O. Letendre F. Mathieu M. Wong GG. Clark SC. (1988). Interleukin-1 enhances growth-factor dependent proliferation of the clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia and of normal human proliferative hemopoietic precursors. *J Exp Med* 168: 463.
- Hughes-Jones NC. and Wickramasinghe E. (1991). Lecture notes on haematology. Blackwell Scientific Publications, London. 225pp
- Ikejima T. Ikusawa S. Ghezzi P. Van der Meer JWM. Dinarello CA. (1990). IL-1 induces TNF in human PBMC in vitro and a circulating TNF-like activity in rabbits. *J Infect Dis* 162: 215.
- Jacobsen SE. Keller JR. Ruscetti FW. Kondalah P. Roberts AB. Falk LA. (1991). Bidirectional effects of transforming growth factor- β (TGF- β) on colony-stimulating factor induced human myelopoiesis in vitro: differential effects of distinct TGF- β isoforms. *Blood* 78: 2239.
- Jacobsen SE. Ruscetti FW. Ortiz M. Gooya JM. Keller JR. (1994). The growth response of Lin-Thy-1⁺ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Exp Hematol* 22: 985.
- Jacobsen SE. Veiby OP. Myklebust J. Okkenhaug C. Lyman SD. (1996). Ability of flt3 ligand to stimulate the in vitro growth of primitive murine hematopoietic progenitors is

potently and directly inhibited by transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alfa. *Blood* 87: 5016.

- Jakowlew SB, Dillard PJ, Sporn MB, Roberts AB. (1988). Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor b4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol* 2: 1186.
- Jones EY, Stuart DI, Walker NP. (1989). Structure of tumour necrosis factor. *Nature* 338: 225.
- Jovicic G, Ivanovic Z, Biljanovic-Paunovic L, Bugarski D, Stosic-Grujicic S, and Milenkovic P. (1996). The effect of IL-1 receptor antagonist on the proliferation of hematopoietic progenitor cells in regenerating bone marrow. *Leukemia* 10: 564.
- Jue DM, Sherry B, Luedke C. (1990). Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochem* 29: 8371.
- Karkanitsa LV, Komarovskaya ME, Krivenko SI. (1997). Abrogation of radiation injury to human hematopoietic stem cells with tumor necrosis factor-alpha. *Stem Cells* 2: 95.
- Keller JC, McNiece IK, Sill KT. (1990). Transforming growth factor- β 1 directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. *Blood* 75: 596.
- Keller JR, Mantel C, Sing GK, Ellingsworth LR, Ruscetti SK, Ruscetti FW. (1988). Transforming growth factor- β 1 selectively regulated early murine hematopoietic progenitors and inhibits the growth of IL-3-dependent myeloid leukemia line cells. *J Exp Med* 168: 737.
- Kennedy SM, and Borch RF. (1999). IL-1 β mediates diethylthiocarbamate-induced granulocyte colony-stimulating factor production and hematopoiesis. *Exp Hematol* 27: 210.
- Kirstein M, Fiers W, Baglioni C. (1986). Growth inhibition and cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 cells is enhanced by high cell density and inhibition of mRNA synthesis. *J Immunol* 137: 2277.
- Kondalah P, Sands MJ, Smith JM. (1990). Identification of a novel transforming growth factor β (TGF- β 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 256: 1089.
- Kriegler M, Perez C, DeFay K. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45.
- Lafage M, Maroc N, Dubreuil P. (1989). The human interleukin-1 alpha gene is located on the long arm of chromosome 2 at band q 13. *Blood* 73: 104.
- Lange W, Brugger FM, Rosenthal L, Kanz A, Lindemann A. (1991). The role of cytokines in oncology. *Int J Cell Cloning* 9: 252.
- Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice G, Wong W, Chen Y, And Goeddel V. (1991). Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 2830.
- Loetscher H, Steinmetz M, Lesslauer W. (1991). Tumor necrosis factor: receptor and inhibitors. *Cancer Cells* 3: 221.
- Lovett D, Kozan B, Hadam M, Resch K, Gemsa D. (1986). Macrophage cytotoxicity: interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis. *J Immunol* 136: 340.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Lu L Heinrich MC. Wang LS. Dai MS. Zigler AJ. Chai L. Broxmeyer HE. (1999). Retroviral-mediated gene transduction of c-kit into single hematopoietic progenitor cells from cord blood enhances erythroid colony formation and decreases sensitivity to inhibition by tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1. *Blood* 7: 2319.
- Majka M. Lanowska-Wieczorek A. Ratajczak J. Ehrenman K. Pietrzowski Z. Kowalska A. Gewirtz M. Emerson S. Ratajczak M. (2001). Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34+ cells, myeloblast, erithroblast, and megakaryoblast and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 97: 3075.
- Martinez I. (2000). Efecto de la interleucina-1 beta (IL-1 β) sobre la expresi3n de receptores Fc para la IgG, diferenciaci3n morfol3gica y proliferaci3n en la linea celular mielode primitiva 32D C13 de rat3n. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
- Martinez-Jaramillo G. Flores-Figueroa E. Gomez-Morales E. Sanchez-Valle E. Mayani H. (2001). Tumor necrosis factor-alpha levels in long-term marrow cultures from patients with aplastic anemia: modulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am J Hematol* 3:144.
- Metcalf D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haematopoietic cells. *Nature* 339: 27.
- Metcalf D. (1998). Cell-cell signaling in the regulation of blood cell formation and fuction. *Immunol Cell Biol* 76: 441.
- Mire-Sluis A. and Thorpe R. (1998). Cytokines. Academic Press, San Diego. 584pp
- Moreb J. and Zucali JR. (1992). The therapeutic potencial of interleukine-1 and tumor necrosis factor on hematopoietic stem cell. *Leuk Lymphoma* 8: 267.
- Moren A. Olofsson A. Stenman G. (1994). Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor- β binding protein. *J Biol Chem* 269: 32469.
- Morrinson S. Uchida N. Weissman I. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 35.
- Munker R. Hiller E. Paquette R. (1998). Modern hematology. Biology and clinical management. Human Press, New Jersey. 369pp
- Murphy M. Perussia B. Trincheri G. (1988). Effect of recombinant tumor necrosis factor on the colony growth of human leukemia progenitor cell normal hematopoietic progenitor cells. *Blood* 69: 467.
- Murphy M. Perussia B. Trincheri G. (1988). Effects of recombinant tumor necrosis factor, lymphotoxin, and immune interferon on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 16: 131.
- Muthukkumar S. Sells SF. Crist SA. Rangnekar VM. (1996). Interleukin-1 induces growth arrest by hypophosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product RB. *J Biol Chem* 271: 5733.
- Negrier MS. Pourreau CN. Palemr PA. (1992). Phase I trial of recombinant interleukin-2 followed by tumor necrosis factor in patients with metastatic cancer. *J Immunother* 11: 93.
- Neta R. (1997). Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action. *Environ Health Perspect* 6: 1463.

- Neta R. Oppenheim J. Douches D. (1988). Interdependence of the radioprotective effects of human recombinant interleukin-1 α , tumor necrosis factor- α , granulocyte colony-stimulating factor, and murine recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 140: 108.
- Ogawa M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81: 2844.
- Ogawa M. and Matsunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Annu Acad Sci* 872: 17.
- Ogawa Y. Schmidt DK. Dasch JR. Chang RJ. Glaser CB. (1992). Purification and characterization of transforming growth factor- β 2.3 and β 1.2 heterodimers from bovine bone. *J Biol Chem* 267: 2325.
- Onozaki K. Matsushima K. Aggawai B. Oppenheim J. (1985). Human interleukin-1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol* 135: 3962.
- Oppenheim J. Kovacs E. Matsushima K. Durum S. (1986). There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 7: 45.
- Orikasa M. Kawase T. and Suzuki A. (1993). Induction of macrophagic and granulocytic differentiation of murine bone marrow progenitor cells by 1,25-dihydroxyvitamin D sub(3). *Calcif Tissue Int* 53: 193.
- Orkin SH. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270: 4955.
- Orlic D. and Bodine D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): Will the real PHSC please stand up!. *Blood* 84: 2991.
- Pennica D. Nedwin GE. Haylick JS. Seeburg PH. Derynck R. Palladino MA. Kohr WJ. Aggarwal BB. Goeddel DV. (1984). Human tumor necrosis factor: Pre-cursor structure, expression, and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724.
- Perez C. Albert I. DeFay K. (1990). A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63: 251.
- Pluznik D. and Sachs A. (1965) The cloning of normal mast cells in tissue culture. *J Cell Comp Physiol* 66: 319.
- Rath PC. and Aggarwal BB. (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19: 350.
- Reykdal S. Abboud C. Liesveld J. (1999). Effect of nitric oxide production and oxygen tension on progenitor preservation in ex vivo culture. *Exp Hematol* 3: 441.
- Roberts A. and Sporn M. (1992). Transforming growth factor beta (Ed.) Bharat BA. and Jordan UG. Human cytokines. Blackwell Scientific Publications, London. 405 pp.
- Rodel J. and Link D. (1996). Suppression of apoptosis during cytokine deprivation of 32D cells is not sufficient to induce complete granulocytic differentiation. *Blood* 87: 858.
- Ruscetti F. Birchendall R. McPherson J. Wiltout R. (1998). Transforming growth factor beta 1 (Ed.) Mire-Sluis A. and Thorpe R. Cytokines. Academic Press, San Diego. 584pp
- Ruscetti FW. Dubois CM. Jacobsen SE. Keller JR. (1992). Transforming growth factor beta and interleukin-1: a paradigm for opposing regulation of haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 5: 703.

- Rusten LS. Smeland EB. Jacobsen FW. Lien E. Lesslauer W. Loetscher H. Dubois CM. Jacobsen SE. (1994). Tumor necrosis factor-alpha inhibits stem cell factor-induced proliferation of human bone marrow progenitor cells *in vitro*. Role of p55 and p75 tumor necrosis factor receptors. *J Clin Invest* 94: 165.
- Saharinen J. Taipale J. Monni O. Keski-Oja J. (1998). Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-b binding protein LTBP-4 *L Biol Chem* 273: 18459.
- Sakai K. Hattori T. Matsuoka M. Asou N. Yamamoto S. Sagawa K. and Takatsuki K. (1987). Autocrine stimulation of interleukin-1 β in acute myelogenous leukemia cells. *J Exp Med* 166: 1597.
- Sanchez X. Suetomi K Cousins-Hodges B. Horton JK. and Navarro J. (1998). CXC chemokines suppress proliferation of myeloid progenitor cells by activation of the CXC chemokine receptor 2. *J Immunol* 160: 906.
- Schindler R. and Dinarello CA. (1990). Interleukin-1. (Ed) Habenicht A. Growth factors, differentiation factors and cytokines. Springer-Verlag, Heidelberg. 192pp
- Schiro R. Longoni D. Rossi V. Maglia O. Doni A. Rasura M. Carrara G. Vannier E. Dinarello CA. Rambaldi A. and Biondi. (1994). Suppression of juvenile chronic myelogenous leukemia colony growth by Inyerleukin-1 receptor antagonist. *Blood* 83: 460.
- Schmid DS. Tite JP. Ruddle NH. (1986). DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting supernatant. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1881.
- Sidhu and Bollon (1993). Tumor necrosis factor activities and cancer therapy. A perspective. *Pharmacol Ther* 57: 79.
- Smith RA. and Baglioni C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem.* 262: 6951.
- Snoeck HW. Van Bockstaele DR. Nys G. Lenjou M. Lardon F. Haenen L. Rodrigus I. Peetermans ME. and Berneman ZN. (1994). Interferon gamma selectively inhibits very primitive CD34 super(2+)CD38 super(-) and not more mature CD34 super(+)/CD38 super(+) human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 180: 1177.
- Stenmark S. Sunnemark D. Bucht A. Sjostedt A. (1999). Rapid local expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon after cutaneous *Francisella tularensis* infection in tularemia-immune mice. *Infect Immun* 4: 1789.
- Sugarman BJ. Aggarwal BB. Hass PE. Figari IS. Palladino MA. Shepard HM. (1985). Recombinant human necrosis factor alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* 230: 293.
- Tanaka S. Saito K. and Reed JC. (1993). Structure-function analysis of the bcl-2 oncoprotein, addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2b protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* 268: 10920.
- Touhami M. Fauvel-Lafeve F. Da Silva N. Chomienne C. Legrand C. (1997). Induction of thrombospondin-1 by all-trans retinoic acid modulates growth and differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Leukemia* 11: 2137.
- Tracey K. and Cerami A. (1994). Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med* 45: 491.
- Trinchieri G. Murphy M. Perussia B. (1987). Regulation of hematopoiesis by T lymphocytes and natural killers cells. *CRS Crit Rev Oncol Hematol* 7: 219.

- Van Ranst P. Snoeck H. Lardon F. Lenjou M. Nijs G. Weekx S. Rodrigus I. Berneman Z. Van Bockstaele V. (1996). TGF- β and MIP-1 α exert their main inhibitory activity on very primitive CD34⁺⁺ CD38⁻ cells but show opposite effects on more mature CD34⁺CD38⁻ human hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 24: 1509.
- Van Ostade X. Vandenabeele P. Tavrnier P. and Fiers W. (1994). Human tumor necrosis factor mutants with preferential binding to and activity on either the R55 or R75 receptor. *Eur J Biochem* 220: 771.
- Vilcek J. Palombella VJ. Henriksen-DeStephano D. Swenson C. Feinman R. Hirai R. Tsujimoto M. (1986). Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163: 1632.
- Ware CF. Crowe PD. Grayson MH. Androlewicz MJ. Browning JL. (1992). Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol* 149: 3881.
- Wetzler M. Kurzrock R. Lowe DG. Kantarjian H. Gutterman JU. Talpaz M. (1990). Alteration in bone marrow adherent layer factor expression: a novel mechanism of chronic myelogenous leukemia progression. *Blood* 78: 2400.
- Wisniewski D. Strife A. Atzpodien J. Clarkson BD. (1987). Recombinant human tumor necrosis factor α and β stimulate fibroblast to produce hematopoietic growth factors in vitro. *J Immunol* 140: 840.
- Wu F. Buckley S. Bui KC. Yee A. Wu HY. Warburton D. (1996). Cell cycle arrest G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells. *Am J Physiol* 270: 879.
- Yamaguchi M. Nadler S. Lee JW. Deeg HJ. (1999). Induction of negative regulators of haematopoiesis in human bone marrow cells by HLA-DR cross-linking. *Transpl Immunol* 3: 159.
- Yang WS. Kim BS. Lee SK. Park JS. Kim SB. (1999). Interleukin-1 β stimulates the production of extracellular matrix in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 19: 211.
- Yin W. Smiley E. Germiller J. (1995). Isolation of a novel latent transforming growth factor- β binding protein gene (LTBP-3). *J Biol Chem* 270: 10147.
- Yonemura Y. Ku H. Hirayama F. Souza LM. Ogawa M. (1996). Interleukin-3 or interleukin-1 abrogates the reconstituting ability of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4040.
- Yoshida Y. (1994). Overview of the hematopoietic growth factors and cytokines past, present and future. *International J Hematol*. 60: 177.
- Yuan J. (1997). Transducin signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol*. 9: 247.
- Zheng L. Fisher G. Miller RE. Perschon J. Lynch DH. And Lenardo MJ. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377: 348.

