

00387  
11



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE DIFERENTES CITOCINAS HEMATOPOYETICAS  
SOBRE LA PROLIFERACION Y EXPANSION in vitro DE  
PROGENITORES HEMATOPOYETICOS PROVENIENTES DE  
PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
P R E S E N T A :  
JUAN JOSE MONTESINOS MONTESINOS

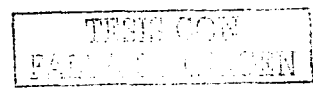
DIRECTOR DE TESIS: DR. HECTOR MAYANI VIVEROS

MEXICO, D. F



OCTUBRE 2003

COORDINACIÓN



A



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN**

AUTÓNOMA DE MEXICO  
UNAM - INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECRETARÍA DE ADMINISTRACIÓN  
NOMBRE: Juan José Montesinos  
Montesinos  
FECHA: 5 de Noviembre de 2003  
FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de agosto de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Juan José Montesinos Montesinos, con número de cuenta 84192398 y número de expediente 3941079, con la tesis titulada: "Efecto de diferentes citocinas hematopoyéticas sobre la proliferación y expansión in vitro de progenitores hematopoyéticos provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda.", bajo la dirección del (la) Dr. Héctor de Jesús Mayani Viveros.

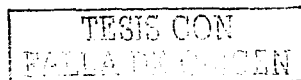
Presidente:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Vocal:	Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas
Vocal:	Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez
Secretario:	Dr. Héctor de Jesús Mayani Viveros
Suplente:	Dr. Isabel Enrique Miranda Peralta
Suplente:	Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de octubre de 2003

Dr. Juan J. Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



B

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Héctor Mayani Viveros y la supervisión del comité tutorial conformado por el Dr. Enrique Miranda Peralta, Dr. Edelmiro Santiago Osorio y el Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Durante la realización de este estudio se contó con el apoyo económico del CONACyT y de la DGEP mediante el programa de apoyo de becas nacionales. El presente trabajo es parte de un proyecto financiado por el CONACyT (clave No. 30945M), la Coordinación de Investigación del IMSS (clave No. FP-2001/371) y la Fundación Miguel Alemán (clave No. FP-0313).

C

TESIS CON  
FALLA DE CIRCULO

## AL AMOR Y A LA CIENCIA UN ALTAR

A MI ESPOSA:

Por haberme dado la dicha de compartir su espacio y tiempo,  
lo cual hace que mi vida tenga sentido.

A MIS HIJAS: Andy y Lis

Porque son mi adoración y mi motivo de vivir.

A MI MADRE:

Porque me enseñó lo que es amar y me apoyo en todo  
momento para librar los obstáculos más difíciles.

A MIS HERMANOS:

Porque con ellos comparto los momentos más especiales.

A MIS AMIGOS UNIVERSITARIOS:

Mary, Joel, Miguel y Fabiola, hermanos por siempre.

A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO:

Lupita, Kena, Moni, Paty, Tony y Toño por su amistad y apoyo.

TESIS CON  
FALLA DE CONTEN

# INDICE

<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>III. MARCO TEORICO</b>	<b>5</b>
1. Principios de la hematopoyesis	5
2. Microambiente hematopoyético	7
3. Citocinas hematopoyéticas	11
a) Factor de células seminales (SCF)	11
b) Trombopoyetina (TPO)	14
c) FLT3-L	16
d) Interleucina-6 (IL-6)	18
e) Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF)	19
f) Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos (G-CSF)	21
g) Interleucina-3 (IL-3)	23
h) Eritropoyetina (EPO)	24
i) Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )	26
4. Alteraciones en el sistema hematopoyético	27
5. La LMA	29
5.1 Aspectos clínicos	29
5.2 Origen clonal de la LMA	31
5.3 Jerarquía hematopoyética en la LMA	35
5.4 Patrones de crecimiento en cultivos de médula ósea a largo plazo tipo Dexter	38
5.5 Participación de las citocinas en la LMA	39
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>42</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
1. Objetivo General	44
2. Objetivos Particulares	44
<b>VI. METODOLOGÍA</b>	<b>45</b>
1. Pacientes y obtención de las muestras	45
2. Obtención de células mononucleares	45
3. Ensayo de colonias	45
4. Cultivos de médula ósea a largo plazo tipo Dexter	46
5. Enriquecimiento de células CD34+	47
6. Obtención de subpoblaciones celulares en LMA	47
7. Inmuncitoquímica	49
8. Cultivos en suspensión	49
9. Análisis estadístico	50

<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>VII.1 Efecto del GM-CSF sobre la cinética de hematopoyesis en LTBM de pacientes con LMA</b>	<b>52</b>
1. Contenido de progenitores hematopoyéticos en la médula ósea	52
2. Cinética de proliferación de células hematopoyéticas en LTBM	55
3. Efecto del rhGM-CSF en la proliferación de células hematopoyéticas en LTBM	55
4. Cinética de progenitores hematopoyéticos en LTBM	58
5. Efecto del GM-CSF en la cinética de progenitores hematopoyéticos en LTBM	61
6. Discusión	62
<b>VII.2 Efecto de diferentes citocinas sobre la proliferación y expansión de subpoblaciones enriquecidas en células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con LMA en cultivos en suspensión</b>	<b>66</b>
7. <b>Subpoblación I</b>	<b>66</b>
7.1 <b>Cultivos empleando medio para LTBM</b>	<b>66</b>
a) Características de la población obtenida por selección negativa	66
b) Cinética de proliferación	70
c) Expansión de progenitores hematopoyéticos	73
7.2 <b>Cultivo empleando medio de expansión más FL y TPO</b>	<b>76</b>
a) Características de la población obtenida por selección negativa	76
b) Cinética de proliferación	80
c) Efecto del TNF- $\alpha$ en la proliferación de células hematopoyéticas	82
d) Expansión de progenitores hematopoyéticos	84
e) Efecto del TNF- $\alpha$ en la expansión de progenitores hematopoyéticos	86
8. <b>Subpoblación II</b>	<b>87</b>
<b>Cultivos empleando medio de expansión más FL y TPO</b>	<b>87</b>
a) Características de la población obtenida por selección negativa	87
b) Cinética de proliferación	91
c) Efecto del TNF- $\alpha$ en la proliferación de células hematopoyéticas	93
d) Expansión de progenitores hematopoyéticos	95
e) Efecto del TNF- $\alpha$ en la expansión de progenitores hematopoyéticos	97
9. Discusión	99
<b>VIII. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>107</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	<b>110</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>112</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>114</b>

### Lista de Abreviaturas

BFU-E	Unidad formadora de brote eritroide
CFC	Células formadoras de colonias
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
CFU-G	Unidad formadora de colonias granulocíticas
CFU-GM	Unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos
CFU-M	Unidad formadora de colonias de macrófagos
CFU-MK	Unidad formadora de colonias de megacariocitos
CH	Citocinas hematopoyéticas
CPH	Células progenitoras hematopoyéticas
CPL	Células primitivas leucémicas
CSH	Células seminales hematopoyéticas
EPO	Eritropoyetina
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
FL ó FLT3-L	Ligando del receptor FLT3
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
IFN	Interferón
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
LMA	Leucemia mieloide aguda
LTBMC	Cultivos de médula ósea a largo plazo
LTC-IC	Células iniciadoras de cultivos a largo plazo
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MO	Médula ósea
SC	Cultivos en suspensión
SC-IC	Células iniciadoras de cultivos en suspensión
SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
SCF	Factor de células seminales
SFB	Suero fetal bovino
SL-IC	Células iniciadoras de leucemia en ratones SCID
SRC	Células repobladoras de ratones SCID
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante-beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral-alfa
TPO	Trombopoyetina
UFC-LMA	Unidad formadora de colonias de LMA



## ABSTRACT

In the present study, we have assessed the effects of different hematopoietic cytokines on proliferation and expansion of hematopoietic progenitor cells from acute myeloid leukemia (AML) patients. To evaluate such characteristics we have used two experimental systems: Dexter-type long-term marrow cultures (LTMC) and stroma-free suspension cultures. In the first system, addition of recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (rhGM-CSF) to AML LTMC, resulted in a simultaneous decrease in the numbers of myeloid progenitor cells and a selective stimulation of the growth of leukemic progenitors. These results indicate that rhGM-CSF is a cytokine with a stimulatory activity for the in vitro growth of AML progenitors, and suggest that the use of this factor in clinical settings must be taken with caution since this cytokine, although beneficial in reducing the risk of infections after chemotherapy, may induce the reappearance of the disease after treatment. On the other hand, we have demonstrated that in liquid suspension cultures supplemented with recombinant cytokines, progenitor cells from AML patients (CD34+lin- and CD34+CD38-lin- subpopulations) possess a diminished proliferative potencial as compared to their normal counterparts. These results suggest that the low capacity to proliferate in response to hematopoietic cytokines could be a positive characteristic of primitive leukemic cells, so the pool is not exhausted and therefore a constant production of leukemic blasts can be sustained long term. Finally, we identified normal hematopoietic progenitors in some AML patients, with a greater in vitro expansion potential than progenitors from normal individuals. This observation should be further analyzed since it may has implications in autologous bone marrow transplantation.

**I. RESUMEN**

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad hematológica que cursa con un cuadro clínico severo y de consecuencias fatales. Este padecimiento se origina en la médula ósea, a partir de la transformación de una célula seminal hematopoyética, en la cual se modifican las características de proliferación y diferenciación, dando lugar a la formación de un número elevado de blastos malignos. Se ha determinado que en LMA, las células leucémicas están organizadas en forma jerárquica, dado que existen diferentes subpoblaciones con distinto grado de maduración. Así, se considera que existe una población de células leucémicas muy primitivas responsables de mantener la hematopoyesis maligna y que pudieran ser el blanco de terapias más efectivas, basadas en el conocimiento de sus características biológicas, las cuales aún no se han definido completamente. A la fecha, se ha demostrado la importancia de las citocinas en el desarrollo de las células leucémicas con un mayor grado de maduración, sin embargo no se ha descrito su participación en poblaciones más primitivas. En este trabajo determinamos el efecto de diferentes combinaciones de citocinas sobre la proliferación y expansión de progenitores hematopoyéticos provenientes de pacientes con LMA. Para ello utilizamos dos sistemas experimentales: a) el cultivo de médula ósea a largo plazo tipo Dexter (LTBMC) y b) cultivos líquidos en suspensión (SC). A partir de nuestros resultados, determinamos que el factor recombinante humano estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (rhGM-CSF) incrementa la producción de células hematopoyéticas en los LTBMC de pacientes con LMA y de manera particular favorece el crecimiento de los progenitores leucémicos, lo cual sugiere que este factor debe ser aplicado con precaución en tratamientos clínicos, debido a que si bien resulta benéfico al reducir el riesgo de infecciones después de la quimioterapia, podría favorecer la reaparición de la enfermedad después del tratamiento. Asimismo, observamos que en los pacientes con LMA, existen alteraciones en la expresión del antígeno CD34 en las células progenitoras hematopoyéticas, dado que en algunos de ellos no fue posible detectar células CD34<sup>+</sup>, mientras que en otros, un porcentaje elevado de células hematopoyéticas lo expresaron; lo anterior cuestiona la importancia de este antígeno como marcador específico de células primitivas de pacientes con

TESIS CON  
FALLA DE COLEN

LMA. De igual manera, determinamos que las poblaciones de progenitores hematopoyéticos de los pacientes, obtenidas mediante un proceso de separación inmunomagnética para enriquecer en células CD34+lin- y CD34+CD38-lin-, poseen un potencial proliferativo in vitro disminuido con respecto a las poblaciones provenientes de individuos normales y además son sensibles al efecto inhibitorio de la proliferación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Esta disminución en la capacidad proliferativa en respuesta a las citocinas hematopoyéticas, podría ser un mecanismo de escape de las poblaciones leucémicas más primitivas a las terapias que pretenden inducir la proliferación de las células malignas para favorecer la susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Por su parte, la inhibición por efecto de TNF- $\alpha$  en estas poblaciones, modifica la idea de la participación de un mecanismo de estimulación autocrina similar al descrito en poblaciones más maduras. Por último determinamos que existen subpoblaciones de células progenitoras hematopoyéticas morfológicamente normales dentro de las poblaciones primitivas de algunos pacientes con LMA, las cuales presentan un mayor potencial de expansión que los progenitores provenientes de donadores normales. Este hecho resulta muy favorable, debido a la posibilidad de identificar y purificar a células normales para su expansión -bajo condiciones in vitro- en los pacientes con LMA y poder utilizarlas en trasplantes de tipo autólogo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## II. INTRODUCCIÓN

Las células sanguíneas se originan en la médula ósea, a través de un proceso complejo denominado hematopoyesis. La médula ósea está constituida principalmente por dos elementos celulares, las células estromales y las células hematopoyéticas; hoy en día se sabe que las primeras tienen dentro de sus funciones la de servir como soporte de las células hematopoyéticas, tarea que realizan en parte a través de la secreción de citocinas que inciden sobre la proliferación y diferenciación de estas células, dando por resultado la formación de todas las células de la sangre.

Cuando se presentan alteraciones en los mecanismos que regulan la hematopoyesis, se pueden desarrollar enfermedades hematológicas como la leucemia mieloide aguda (LMA), la cual se caracteriza por un aumento en el número de células mieloides en la médula ósea, acompañado de un bloqueo en su maduración, lo que ocasiona la acumulación excesiva de blastos.

Durante las últimas décadas, la incidencia de LMA se ha incrementado considerablemente en los países desarrollados y en algunos países en vías de desarrollo. En los Estados Unidos, por ejemplo, la incidencia anual de esta patología es de 2.4 casos por  $10^5$  habitantes y dicha incidencia se acrecienta progresivamente con la edad, de tal suerte que en adultos mayores de 65 años es de 12.6 casos por  $10^5$  habitantes (Kosary et al, 1995). En México los datos son escasos, sin embargo, existen evidencias de que el número de pacientes con esta enfermedad se ha incrementado en forma significativa. Tan solo en 1998, se reportaron más de 600 casos nuevos (Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 1998).

La LMA es una enfermedad fatal. En los años 70's la supervivencia a 5 años en este tipo de pacientes era del 15%. Actualmente, y gracias a los avances en su diagnóstico y tratamiento, el periodo de supervivencia a 5 años se ha incrementado significativamente, sin embargo continúa siendo bajo (apenas del 40%).

Con la finalidad de desarrollar terapias más efectivas, en la última década se han descrito características importantes de la enfermedad y en particular de la biología de las células leucémicas. Con base en estos conocimientos, se ha postulado la presencia de subpoblaciones de células leucémicas con diferente

grado de maduración y se han identificado aquellas más primitivas y que al parecer son las responsables de mantener la producción de los blastos transformados. Sin embargo a pesar de haber identificado a dichas células, muchas de sus características funcionales aún no se conocen.

En el presente trabajo estudiamos en particular dos aspectos importantes en la biología de las células leucémicas primitivas: la proliferación y la expansión de progenitores hematopoyéticos provenientes de pacientes con LMA en presencia de diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas. Para ello utilizamos dos sistemas experimentales: a) el cultivo de médula ósea a largo plazo tipo Dexter (LTBMC), a partir de células mononucleares de médula ósea y b) cultivos líquidos en suspensión (SC), utilizando poblaciones obtenidas mediante un proceso de separación inmunomagnética para enriquecer en células CD34+lin- y CD34+CD38-lin-.

### III. MARCO TEORICO

#### 1. Principios de la hematopoyesis

Todas las células presentes en la sangre se derivan de una pequeña población de células seminales hematopoyéticas, las cuales se localizan en la médula ósea (MO). Las células seminales hematopoyéticas originan células progenitoras que proliferan y maduran hacia los diferentes linajes sanguíneos, mediante un proceso denominado hematopoyesis. Debido a que las células maduras presentes en la sangre periférica tienen una vida limitada, es necesaria su constante producción y para ello el sistema hematopoyético es capaz de regular, mediante mecanismos muy complejos, los procesos de expansión, compromiso, proliferación y sobrevivencia de las células hematopoyéticas (Till y McCulloch, 1980).

La médula ósea es el órgano en el que tiene lugar la hematopoyesis durante la etapa adulta (Trentin, 1989), para lo cual cuenta con una red de células estromales (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos) y células accesorias (monocitos y linfocitos) que producen citocinas y proteínas de matriz extracelular. En conjunto, estos elementos conforman lo que se denomina como microambiente hematopoyético, en el cual las células hematopoyéticas son capaces de proliferar y diferenciarse hacia los distintos linajes sanguíneos, mediante el contacto directo con las células estromales o por influencia de las citocinas y matriz extracelular presentes en dicho microambiente (Nicola, 1989). Entre las citocinas producidas por las células del microambiente, existen algunas que actúan predominantemente como estimuladoras de la hematopoyesis; otras, en cambio, actúan como inhibidoras de este proceso. En condiciones normales, existe un balance entre las citocinas estimuladoras e inhibidoras, lo que da como resultado la producción controlada de células sanguíneas.

Las células que forman el sistema hematopoyético se pueden agrupar en cuatro compartimientos: El primero de ellos corresponde a las células seminales (CSH), con capacidad de autorrenovación y de dar origen a todas las células de la sangre durante la vida del individuo (McCulloch, 1993; Berardi et al, 1995); éstas constituyen el 0.005% del total de células en la médula ósea. El segundo compartimiento corresponde a las células progenitoras (CPH), incapaces de

autorenovarse y con características de pluripotencialidad, bipotencialidad y monopotencialidad (Ogawa et al, 1983); en conjunto, las CPH constituyen el 0.15% de las células de la médula ósea. El tercer compartimiento comprende a las células precursoras reconocibles por su morfología y que corresponden a >99.5% de las células presentes en la médula ósea. Finalmente, las células maduras circulantes (cuarto compartimiento), que representan el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos (Figura 1). Este modelo de clasificación indica que existe una jerarquía hematopoyética, en donde las células seminales son los elementos más primitivos que dan lugar a la formación de todos los constituyentes del sistema hematopoyético.

Tanto las CSH como las CPH tienen una morfología linfoblastoide, por lo que no es posible distinguirlas a través de microscopía de luz. Sin embargo, su identificación, purificación y caracterización ha sido posible mediante estudios inmunofenotípicos y funcionales. Ambas poblaciones celulares expresan el antígeno CD34, una glicoproteína transmembranal que participa en los mecanismos de adhesión celular (Healy et al, 1995). Las CSH, además, expresan el antígeno CD90 (Thy-1) y carecen de la expresión de otras moléculas, tales como CD38, CD45RA y CD71 (Craig et al, 1993; Mayani y Landsdorp, 1994). Conforme las CSH se diferencian y dan lugar a la formación de las CPH, adquieren la expresión de moléculas como CD38, CD45RA, CD71 y otras más, pertenecientes a linajes específicos, por ejemplo, CD4 y CD8, en linfocitos T; CD19 y CD20 en linfocitos B; CD15 y CD33 en células mieloides; CD41 y CD42 en megacariocitos (Terstappen et al, 1991).

Existen, actualmente, diversos métodos funcionales para la identificación y cuantificación de las CSH. Entre éstos, destaca el sistema *in vivo* que identifica a las células con la capacidad de reconstituir, en su totalidad y a largo plazo, el sistema hematopoyético de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID, por sus siglas en inglés; Kamel-Reid y Dick, 1988). Este modelo consiste en la radiación subletal de ratones SCID y la inyección intravenosa de las células hematopoyéticas humanas, dentro de las que se encuentran las células seminales y progenitoras. Generalmente se requiere de la administración de factores de crecimiento hematopoyéticos humanos, como el factor estimulador de colonias de

macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y la interleucina-3 (IL-3), entre otros, para el óptimo desarrollo de las células humanas en el microambiente medular del ratón (Dick, 1996). Las células con la capacidad de reconstituir la hematopoyesis reciben el nombre de células repobladoras de ratones SCID (SRC, por sus siglas en inglés) y representan, en la actualidad, la mayor aproximación a las CSH de entre los distintos tipos celulares hematopoyéticos caracterizados (Figura 1).

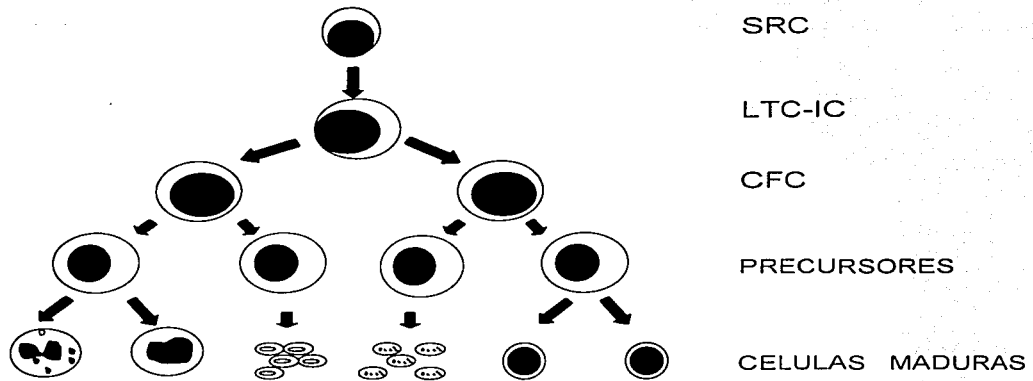
Por otra parte, se han identificado células que inician y mantienen la hematopoyesis *in vitro* a largo plazo, al ser cultivadas en presencia de capas adherentes de fibroblastos que funcionan como soporte de crecimiento. A estas células se les denomina células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, por sus siglas en inglés), y se caracterizan por su capacidad para generar CPH por periodos superiores a las 5 semanas de cultivo (Sutherland et al, 1990). Estudios realizados en ratones SCID, han demostrado que después de 4 semanas de ser transplantadas las SRC, se detecta la aparición de las LTC-IC, debido a ello se ha determinado que estas últimas son células menos primitivas que las SRC (Figura 1) (Dick, 1996; Cashman et al, 1997).

En cuanto a las CPH, su identificación y cuantificación son realizadas por medio de métodos más sencillos; básicamente, a través de su capacidad para formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos (metilcelulosa o agar), de ahí que sean conocidas como células formadoras de colonias (CFC; Metcalf, 1977).

## **2. Microambiente hematopoyético**

Como hemos mencionado el microambiente hematopoyético (MH) es una estructura tridimensional compleja altamente organizada que regula la localización y la fisiología de las células hematopoyéticas, el cual consiste en una red local de células del estroma, células accesorias y sus productos (matriz extracelular y citocinas) (Mayani et al, 1992b; Perkins y Feishman, 1998).





**FIGURA 1. Esquema de los compartimentos celulares en la hematopoyesis normal.** El sistema hematopoyético está constituido por 4 compartimentos: (i) células seminales; (ii) células progenitoras; (iii) células precursoras y (iv) células maduras. Tanto las SRC (células repobladoras de ratones SCID), como las LTC-IC (células iniciadoras de cultivos a largo plazo) están comprendidas dentro del compartimento de las células seminales hematopoyéticas. Las CFC (células formadoras de colonias en cultivo) corresponden al compartimento de las células progenitoras (Tomado de Montesinos y Mayani, 2002).

Las células estromales son residentes permanentes de la médula ósea y además de ser un soporte físico, sintetizan y secretan citocinas y moléculas que forman parte de la matriz extracelular, necesarias para regular la autorenovación, diferenciación, maduración y migración de las células hematopoyéticas (Mayani et al. 1992b). Las células del estroma incluyen: células reticulares, macrófagos, células endoteliales, adipocitos y osteoblastos (Russell, 1996). Las células reticulares (adventicias y fibroblásticas) representan el componente más abundante del MH tanto in vivo como in vitro. Las células adventicias están localizadas in vivo alrededor de los sinusoides venosos y su papel principal es el de regular la migración de las células sanguíneas maduras de la médula a la circulación. Por su parte, las células fibroblásticas se encuentran en contacto directo con las células granulocíticas inmaduras y son el componente más abundante en los LTBM; además tienen la capacidad de producir citocinas como GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de células seminales (SCF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) y moléculas de la matriz extracelular como la colágena tipo I y III y fibronectina (Dorshkind, 1990; Deryugina y Müller-Sieburg, 1993).

El segundo componente celular más abundante del estroma de la médula ósea y de los LTBM, son los macrófagos, los cuales regulan la hematopoyesis tanto por interacciones célula-célula como por la secreción de citocinas estimuladoras e inhibitoras. Entre las citocinas producidas por los macrófagos encontramos: factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), GM-CSF, IL-3, IL-1, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Metcalf y Nicola, 1985; Rappolee y Webb, 1988). Otro componente estromal son las células endoteliales, encargadas de revestir a los vasos sanguíneos de la médula. Las células endoteliales se localizan en asociación con otros tipos celulares como los fibroblastos, los adipocitos, los megacariocitos maduros, las células plasmáticas y las células hematopoyéticas, formando una interfase entre la circulación y el compartimento hematopoyético. Lo anterior sugiere que las células endoteliales controlan los últimos estadios de la hematopoyesis mediante interacciones celulares directas y regulando la entrada de células maduras a la circulación periférica. Estas células también pueden regular la hematopoyesis a través de la

producción de moléculas de la matriz extracelular como la colágena tipo IV y la laminina (Rafii, 1994).

Otras células estromales son los adipocitos y los osteoblastos, los primeros ocupan el mayor espacio de la médula ósea de los mamíferos adultos (médula amarilla) y se piensa que producen factores inhibidores de la hematopoyesis. En los cultivos a largo plazo aparecen cuando los cultivos son avanzados y la hematopoyesis declina (Mayani et al, 1992b; Dorshkind, 1990). Por su parte los osteoblastos secretan activamente la matriz del hueso y se ha demostrado que se localizan en regiones cercanas a las células hematopoyéticas primitivas dentro de la cavidad medular. Además son capaces de secretar algunas citocinas como el G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6, factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y TNF- $\alpha$  (Ignatz y Massague, 1986; Hauschka et al, 1986).

También encontramos a las células accesorias que se encuentran de manera transitoria en la cavidad medular, pero que regulan la hematopoyesis a través de la producción y secreción de citocinas. Entre estas células tenemos a los monocitos y linfocitos. Los monocitos producen M-CSF, G-CSF, GM-CSF, IL-1 y TNF- $\alpha$  entre otras, mientras que los linfocitos producen IL-10, interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), IL-2, IL-4, IL-3 e IL-5, principalmente (Rappolee y Webb, 1988; Thompson et al, 1989).

En el microambiente hematopoyético además del componente celular, también se tiene la presencia de la matriz extracelular, estructura altamente organizada, compuesta de glicoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos que son secretadas por las células del estroma medular. Entre las funciones de la matriz se incluyen: la mediación de la unión celular, la unión de factores de crecimiento y la inducción de la autorenovación y diferenciación de las células hematopoyéticas (Gordon, 1988). La adhesión de las células hematopoyéticas a las células del estroma es importante para el control de la liberación de las células maduras hacia la sangre. Esta adhesión está mediada por las moléculas de la matriz extracelular y por la expresión de moléculas de adhesión por parte de las células hematopoyéticas (Blair y Thomas, 1997a).

### 3. Citocinas hematopoyéticas

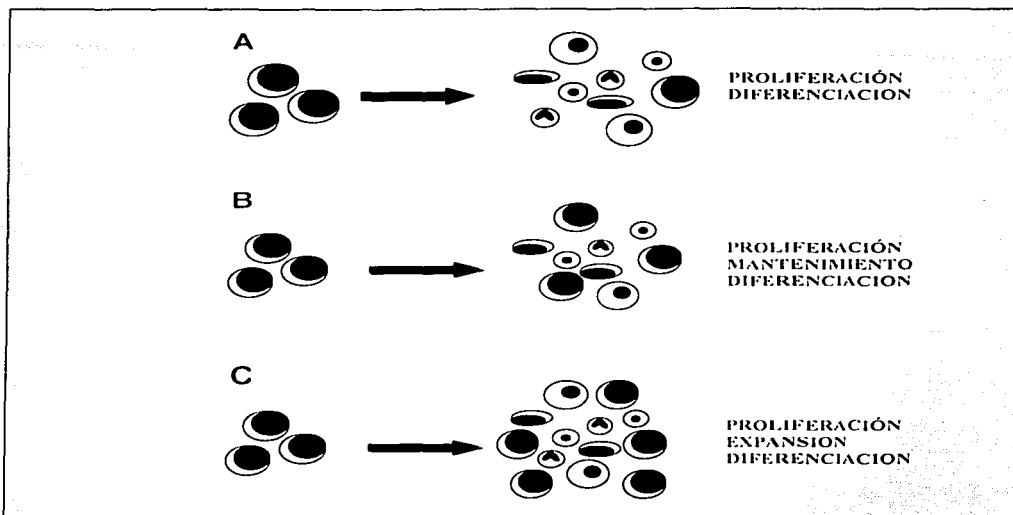
Para que se pueda llevar a cabo la hematopoyesis es necesaria la participación de ciertas proteínas conocidas como citocinas, las cuales permiten la proliferación, diferenciación y expansión de las células hematopoyéticas (Figura 2) y son parte importante del microambiente hematopoyético (Tabla 1). A continuación describiremos las características de algunas de las principales citocinas involucradas en la formación de las células sanguíneas.

#### 3.1 Factor de células seminales

El gene que codifica para el factor de células seminales se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 en la región 12q22 (Anderson et al, 1990) y comprende aproximadamente 50 kb que constituyen 9 exones (Martin et al, 1990). El primer exon codifica al péptido señal de 5 aminoácidos, mientras que los exones 2-6 codifican para el dominio extracelular de unión al receptor. El exon 7 codifica una porción del dominio extracelular y 23 aminoácidos de la región transmembranal. Por su parte los exones 8 y 9 codifican 23 y 22 aminoácidos del dominio citoplásmico, respectivamente.

El SCF es sintetizado en dos formas, una de 32 kDa soluble y la otra de 45 kDa unida a la membrana, al parecer esta última es la más importante dado que se ha demostrado la necesidad de su participación para el desarrollo de las células germinales primordiales que dan lugar a los gametos en el ratón (Dolci et al, 1991). El SCF en su forma soluble es una proteína de 164 aminoácidos que es capaz de formar homodímeros unidos de manera no covalente y además posee diversos sitios de glicosilación, lo cual da por resultado un peso molecular aproximado de 50-60 kDa. La forma dimérica del factor es necesaria para la activación del receptor y la transducción de señales (Hsu et al, 1997). Por su parte la forma unida a la membrana se encuentra preferentemente en su forma dimérica.

Esta citocina es sintetizada principalmente por las células estromales: fibroblastos, células endoteliales y macrófagos (Heinrich et al, 1993). El receptor para SCF se denomina c-kit y pertenece a la familia de los receptores tirosina cinasa que tienen la capacidad de autofosforilarse (Migliaccio et al, 1991a).



**FIGURA 2.** Representación esquemática del crecimiento *in vitro* de las células progenitoras hematopoyéticas. A, la población inicial es capaz de formar nuevas células; así hay un incremento en el número de células totales (proliferación). Las células producidas muestran características de maduración de diferentes linajes hematopoyéticos (diferenciación). Sin embargo hay una reducción en el número de células que mantienen las características de la población inicial. B, la población inicial prolifera y se diferencia; el número de células que retiene las características de la población inicial se mantiene. C, la población inicial prolifera y se diferencia; el número de células que retienen las características de la población inicial se incrementa (expansión). Tomado de Flores-Guzmán et al, 2002.

**TABLA 1**  
**Principales citocinas que participan en la hematopoyesis**

Estimuladoras	Fuente celular	Inhibidoras	Fuente celular
SCF	Fibroblastos Endotelios Macrófagos	TGF- $\beta$	Macrófagos Linfocitos
IL-6	Linfocitos T Monocitos Fibroblastos	IFN- $\alpha$	Linfocitos Monocitos Macrófagos
FL	Linfocitos T Monocitos Macrófagos	IFN- $\beta$	Fibroblastos Epitelios Monocitos
TPO	Hepatocitos	IFN- $\delta$	Linfocitos T Células NK
IL-3	Linfocitos T	MIP-1 $\alpha$	Macrófagos
GM-CSF	Linfocitos T Monocitos Macrófagos Fibroblastos Endotelios	TNF- $\alpha$	Macrófagos Linfocitos Células cebadas
G-CSF	Monocitos Macrófagos Fibroblastos Endotelios		
M-CSF	Monocitos Macrófagos Fibroblastos		
IL-5	Linfocitos T		
EPO	Riñón		
IL-1 $\beta$	Monocitos Macrófagos Células dendríticas Linfocitos B		

FL, ligando del receptor tirosina cinasa 3, parecido al receptor fms; TPO, trombopoyetina; EPO, eritropoyetina; MIP, proteína inflamatoria de macrófagos.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Las células que expresan c-kit son principalmente las progenitoras hematopoyéticas, sin embargo, también se ha visto sobreexpresado en células tumorales (Toyota et al., 1993).

Los cultivos in vitro han demostrado que el SCF es una citocina principalmente de sobrevivencia para las células hematopoyéticas y con poco efecto proliferativo, además mantiene a las células progenitoras en un estado no diferenciado (Miglaccio et al., 1991b). Un aspecto importante es que sinergiza con varios factores de crecimiento, incluyendo la eritropoyetina (EPO), GM-CSF, G-CSF, M-CSF e IL-3, para incrementar el número de progenitores hematopoyéticos.

Por otra parte, cuando en cultivos semisólidos se agrega SCF en combinación con otras citocinas, se observan colonias de mayor tamaño y número celular, pero no se observa que afecten su diferenciación, por lo que se piensa que este factor no tiene un efecto en este mecanismo, sino únicamente en la proliferación (Weatton y Gordon, 1996). De igual manera, en cultivos líquidos de médula ósea de ratón, se ha observado que el SCF más IL-6 estimulan la generación de progenitores primitivos, mientras que la combinación de SCF más IL-3 estimula la generación de células progenitoras más maduras; por su parte, en presencia de EPO aumenta el número y el tamaño de las colonias BFU-E (unidades formadoras del brote eritroide) (Weatton y Gordon, 1996).

En estudios in vivo se ha demostrado que SCF es importante para mantener la hematopoyesis constitutiva. El bloqueo de este factor con anticuerpos da por resultado la eliminación de las células eritroides y mieloides, así como la inhibición de la expresión de la proteína y su correspondiente receptor en células progenitoras hematopoyéticas y estromales de médula ósea (Ogawa et al., 1991). La administración de SCF solo o en combinación con G-CSF moviliza a las células seminales hematopoyéticas de la médula ósea hacia la sangre periférica, lo cual resulta adecuado para la obtención de células hematopoyéticas en procedimientos de trasplante de médula ósea (Bodine et al., 1996).

### **3.2 Trombopoyetina**

El gene de la trombopoyetina se localiza en el cromosoma 3q27-28 y comprende aproximadamente 7 kb con 7 exones; los dos primeros no codifican a

proteína, mientras que el tercer exon codifica parte del péptido señal. Los exones del 4 al 7 codifican para una región parecida a eritropoyetina y al dominio rico en carbohidratos (Schnittger et al, 1996).

La TPO es sintetizada en el hígado como una proteína precursora con un peso molecular de 36 kDa (Foster et al, 1994). Posterior al corte del péptido señal de 21 aminoácidos, se lleva a cabo la glicosilación de la proteína restante y con ello se forma una glicoproteína con un peso molecular de 80-90 kDa (Hoffman et al, 1996). La glicoproteína posteriormente se libera a la circulación, sin que se almacene intracelularmente en el hígado. La TPO posee ciertas propiedades no comunes para las otras citocinas que participan en la hematopoyesis. Así, es mucho más grande que la mayoría de los otros reguladores hematopoyéticos y tiene una estructura con dos dominios distintos; un dominio parecido a EPO (residuos 154-332) y el otro con un potencial de ruptura proteolítica (Arg 153—Arg 154), ambos separadas por un sitio dibásico. A la fecha, no se conoce la relevancia biológica del sitio de ruptura (Kato et al, 1997), sin embargo, un aspecto interesante es que a través de la región parecida a EPO, la TPO interactúa con su receptor; no obstante, a pesar de que este dominio tiene un 50% de homología con la EPO, la TPO no se une al correspondiente receptor de esta última y de igual manera EPO no interactúa con el receptor de TPO (Deane et al, 1997).

Estudios *in vitro* han demostrado que esta citocina, purificada del plasma de ratas trombocitopénicas, tiene la capacidad de ser un factor estimulador de colonias de megacariocitos, dado que incide principalmente sobre las unidades formadoras de colonias de megacariocitos (CFU-MK) (McDonald, 1988; Hill y Levine, 1989). No obstante la incidencia sobre un linaje específico, se ha observado que TPO sinergiza con EPO para incrementar la proliferación de células progenitoras eritroides *in vitro* (Kaushansky et al, 1995; Kobayashi et al, 1995) y también con IL-3 o SCF para aumentar el número de diferentes tipos de colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos, incluyendo aquellas derivadas de las unidades formadoras de colonias de granulocitos-eritrocitos-macrófagos-megacariocitos (CFU-GEMM) (Ku et al, 1996). Además en cultivos en suspensión, la adición de TPO y SCF da lugar a la expansión del número total de células hematopoyéticas, de las unidades formadoras de colonias de granulocitos-



macrófagos (CFU-GM) y CFU-GEMM en comparación con SCF solo, e incluso dichos incrementos son mayores que aquellos observados con IL-6, IL-11 o G-CSF (Kobayashi et al., 1996).

Dos líneas de evidencias sugieren que los efectos *in vitro* de TPO correlacionan con sus propiedades *in vivo*. Primero, la administración exógena de este factor en ratones normales, incrementan el número total de BFU-E, CFU-GM y CFU-MK en médula ósea y bazo (Kaushansky et al, 1996). Segundo, la eliminación genética de TPO o su receptor (producto del proto-oncogen *c-mpl*), se asocia con una disminución substancial en el número de todos los tipos de progenitores hematopoyéticos, incluyendo los pluripotenciales (Alexander et al, 1996; Carver-Moore et al, 1996). Estos resultados señalan la importancia de esta citocina en la regulación de la hematopoyesis a partir de la estimulación de las células primitivas. Debido a estas características, TPO es el regulador primario de la megacariopoyesis y de la producción de plaquetas.

### 3.3 FLT3-L

El factor denominado FLT3-L fue identificado a partir de estudios relacionados con su correspondiente receptor conocido como FLT3, el cual se aisló utilizando un fragmento de DNA dirigido contra el receptor de M-CSF (*c-fms*), lo que llevó a la identificación de una porción de la secuencia a la que se denominó *flt3* (*fms-like tyrosine kinase 3*, en inglés) (Rosnet et al, 1991). Una forma soluble del receptor *flt3* se utilizó para clonar su ligando, el FLT3-L ó FL. Posterior a ello, el grupo de Lyman buscó en una variedad de líneas celulares la expresión de un ligando sobre la superficie celular que fuera capaz de unirse al receptor soluble, de esta forma se identificó una línea de células T de ratón que específicamente unió al receptor soluble. El ligando fue clonado posteriormente a partir de una librería de expresión de DNA complementario (Lyman et al, 1993).

El gene que codifica para FL se localiza en el cromosoma 19 en la región 19q13.3 y es de aproximadamente 5.9 Kb y comprende 8 exones, los cuales codifican para la proteína que está constituida por un péptido señal de 26 aminoácidos, un dominio extracelular de 161 aminoácidos, uno transmembranal de 23 aminoácidos y una región citoplásmica de 30 aminoácidos. El FL es una

citocina homodimérica unida de manera no covalente, que se puede expresar de dos formas: unida a la membrana citoplásmica y también soluble (Lyman y Jacobsen, 1998). La proteína unida a la membrana consiste de un dominio citoplásmico corto con estructuras similares a los factores SCF y M-CSF.

FL está ampliamente expresado en casi todos los tejidos que se han estudiado, aunque en particular se han detectado altos niveles de su RNAm en las células mononucleares de sangre periférica (Lyman et al, 1994). El receptor para esta citocina se localiza principalmente en células progenitoras y precursoras hematopoyéticas.

Estudios *in vitro* han demostrado que esta citocina es muy importante en la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de células primitivas hematopoyéticas, aunque su capacidad estimuladora es muy débil cuando actúa individualmente. Sin embargo, en presencia de otras citocinas hematopoyéticas tales como IL-3, IL-6, IL-11, IL-12, SCF y GM-CSF aumenta la respuesta de manera sinérgica (Hudak et al, 1995; Jacobsen et al, 1995; Ramsfjell et al, 1996). Estudios realizados con sangre de cordón umbilical han demostrado que las células hematopoyéticas cultivadas en presencia de FL, SCF, TPO e IL-6 son capaces de repoblar a ratones SCID (Piacibello et al, 2000) y que en dicho mecanismo el FL induce en células CD34+CD38- su entrada a ciclo celular (Haylock, 1997). De igual manera otros trabajos indican que FL actúa sinérgicamente con G-CSF para aumentar la formación de colonias provenientes de hígado fetal humano (Muench, 1997).

Se ha demostrado que la administración *in vivo* de FL da por resultado un incremento significativo en el número de células hematopoyéticas en la médula ósea, bazo, sangre periférica, hígado y nódulos linfáticos (Lyman, 1998). Además, sinérgica con G-CSF aumentando la expansión de células seminales hematopoyéticas capaces de repoblar a largo plazo la médula ósea de ratón y de igual manera induce la movilización de estas células hacia la sangre periférica; lo anterior trae por consecuencia el incremento en los niveles de monocitos y basófilos en sangre periférica. Por otra parte, el tratamiento con FL resulta en una acumulación significativa de células dendríticas funcionalmente activas dentro del tejido linfoide de ratón (Shurin et al, 1998).

### 3.4 Interleucina 6

El gene que codifica para IL-6 tiene una longitud de aproximadamente 5 Kb y contiene 5 exones y 4 intrones y se localiza en el cromosoma 7 en la región 7p21 (Tanabe et al, 1988).

La IL-6 es una proteína de 122 aminoácidos glicosilados en las posiciones 73 y 172. Se sintetiza como una proteína precursora de 186 aminoácidos y se ha observado que al menos existen 5 diferentes formas moleculares de IL-6 con una masa molecular de entre 21 y 28 KDa, las cuales se expresan en monocitos debido a alteraciones postraduccionales como la glicosilación y la fosforilación (May et al, 1988). Se ha demostrado que la IL-6 tiene cuatro regiones distintas de importancia funcional: a) una región que se une al receptor; b) dos regiones que se unen al receptor pero que no son capaces activar señales de transducción; y c) una cuarta región que no solo es incapaz de inducir señales de transducción, sino que además antagoniza la proliferación dependiente de IL-6 (Ehlers et al, 1994).

La IL-6 es producida por linfocitos T, monocitos, megacariocitos, fibroblastos y también por células tumorales (Hibi et al, 1996; Crichton, 1996). Está considerada como uno de los miembros más pleiotrópicos del grupo de la citocinas y es una de las moléculas más importantes en integrar respuestas fisiológicas en situaciones tales como la defensa del organismo en procesos infecciosos. Esta citocina es producida por una variedad de células después de ser estimuladas, tal como ocurre en una infección, un trauma o un reto inmunológico (Tilg et al, 1994).

El receptor para IL-6 de alta afinidad presenta dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que se asocian con una glicoproteína de membrana (gp 130), después de que dichas subunidades se unen a su ligando. La proteína gp 130 funciona como una subunidad de señalización que no interactúa con la IL-6 (Kishimoto, 1992).

Estudios in vitro han demostrado que la IL-6 induce la diferenciación de las células B que han sido previamente activadas, para producir inmunoglobulinas; sin embargo en células B que no han sido activadas, la IL-6 no es capaz de estimular la liberación de inmunoglobulinas (Muraguchi et al, 1988). Al respecto, se ha observado que la IL-2 estimula la capacidad de respuesta a la IL-6 en las células B, para la producción de anticuerpos. Además la IL-6 sinergiza con la IL-1 para

estimular el crecimiento y diferenciación de las células B de ratón activadas con sulfato de dextran (Vink et al, 1988).

De igual manera, la IL-6 está involucrada en la activación, crecimiento y diferenciación de las células T (Houssiau y Van Snick, 1992). Induce la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor para la IL-2 en las células T, por lo que su participación es importante en la proliferación de estas células (Uytenhove et al, 1988). Además aumenta la respuesta de los timocitos a la IL-4 e induce la producción endógena de IL-2 en estas células (Hodgkin et al, 1988). De igual manera interviene en los procesos de maduración de los megacariocitos y en el desarrollo de los osteoclastos (Muraguchi et al, 1988; Van Snick, 1990; Williams, 1991). En el sistema hematopoyético, promueve a las células seminales hematopoyéticas para que entren al ciclo celular y junto con la IL-3 promueve su crecimiento. También actúa sobre células progenitoras como las CFU-GM, en las cuales estimula su maduración y proliferación (Ikebuchi et al, 1987; Le y Vilcek, 1989).

Estudios in vivo han demostrado que la IL-6 participa de manera importante en la reabsorción de hueso (Ershler et al, 1997) y en la lipogénesis hepática, incluso se ha visto que dicho efecto también es estimulado por el TNF, sin embargo debido a que la IL-6 es inducida por este factor, se piensa que la formación de tejido graso podría ser mediada por IL-6 (Grunfeld et al, 1990). Por otra parte se ha observado que la administración de IL-6 inhibe el crecimiento de carcinomas, incluyendo el de mama y el de ovario (Revel, 1992).

### **3.5 Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos**

El gene para GM-CSF se localiza en el cromosoma 5 en la región 5q31.1 y comprende 4 exones que abarcan 2.5 kbp de DNA. La secuencia que codifica para este factor, está relacionada con aquellas para IL-3 y también en cierta medida para las correspondientes para M-CSF, IL-4 e IL-5 (Cockerill et al, 1993).

El GM-CSF es una proteína de 127 aminoácidos que contiene una secuencia líder de 17 aminoácidos, dos puentes disulfuro intramoleculares y dos sitios potenciales de N- y O-glicosilación. El peso molecular es de 18-24 KDa en su forma glicosilada (Nicola et al, 1985).

El GM-CSF fue uno de los primeros factores en ser descrito, purificado y molecularmente clonado. Su nombre deriva de la capacidad para estimular la proliferación y diferenciación de granulocitos y macrófagos en cultivos semisólidos a partir de células de médula ósea (Heyworth et al, 1990).

El GM-CSF es producido por diferentes tipos celulares, entre ellos los fibroblastos, células endoteliales, monocitos y linfocitos T (Metcalf y Nicola, 1995; Shannon et al, 1997). La síntesis del GM-CSF generalmente requiere de la estimulación de la célula productora por otros factores tales como: agentes inflamatorios, señales mitogénicas y antígenos. Esto sugiere que durante algún proceso de infección bacteriana en donde se activan linfocitos T y macrófagos, el GM-CSF producido por estas células aumenta la producción tanto de macrófagos como de granulocitos. Se han descrito receptores de baja y alta afinidad para el GM-CSF, ambos con un peso de 50-70 kDa (Kitamura et al, 1991; Sato et al, 1993).

Como hemos mencionado el GM-CSF actúa de manera selectiva sobre los progenitores CFU-GM para estimular su diferenciación *in vitro* hacia macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, sin embargo, también es capaz de estimular a progenitores eritroides y megacariocíticos. De igual forma el GM-CSF también activa a células maduras como los macrófagos, incrementando el proceso oxidativo respiratorio y a los neutrófilos aumentando su capacidad de fagocitosis de bacterias y levaduras (Grant y Heel, 1992; Metcalf y Nicola, 1995). Además, estimula la liberación de citocinas secundarias en estas células, las cuales incluyen IL-1, G-CSF y M-CSF de los neutrófilos y TNF, IL-1, IL-6, G-CSF y M-CSF de los macrófagos (Grant y Heel, 1992; Metcalf y Nicola, 1995).

Por otra parte, el GM-CSF es capaz de inducir la proliferación y diferenciación de células dendríticas mieloides involucradas en la presentación de antígenos a las células linfoides, ello en forma conjunta y sinérgica con TNF- $\alpha$  (Metcalf y Nicola, 1995). De igual manera, este factor participa en la respuesta inmune mediante la inducción de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad Clase II y de los receptores Fc tanto en macrófagos como en células dendríticas (Witmer-Pack et al, 1987; Jonuleit et al, 1996). Debido a lo

anterior, este factor tiene un papel muy importante como mediador de la respuesta inmune.

Estudios in vivo han demostrado que el GM-CSF juega un papel importante en la activación de los macrófagos alveolares del pulmón, los cuales de esta forma participan en las reacciones pro-inflamatorias que se llevan a cabo en este órgano. De hecho, se ha visto que al administrar GM-CSF tanto en ratones como en humanos, se lleva a cabo una respuesta fisiológica bifásica, la cual consiste en una disminución rápida en el número de leucocitos en la primera hora después de la inyección, ello debido a su acumulación en la región pulmonar. A continuación y dentro de las siguientes 2 a 4 horas, el número de células iniciales se recupera y posteriormente se da un incremento progresivo en el número de neutrófilos, eosinófilos y monocitos en circulación (Metcalf y Nicola, 1995). Debido a estas propiedades, el GM-CSF se ha utilizado a nivel clínico en la recuperación de las cuentas leucocitarias en pacientes con cáncer que han recibido quimioterapia (Armitage, 1998).

### **3.6 Factor estimulador de colonias de granulocitos**

El gene de G-CSF se encuentra en el cromosoma 17 en la región 17q21-q22 y comprende 5 exones y 4 intrones (Kanda et al, 1987). El gene codifica para una proteína de 23 kDa, en cuya estructura se encuentra un péptido señal de secreción de 30 aminoácidos, y dos puentes disulfuro entre los aminoácidos Cys36-Cys42 y Cys67-Cys77 (Lu et al, 1989). La proteína puede estar glicosilada con los azúcares N-acetilgalactosamina y ácido N-acetil neuroamínico en la posición Thr 133 (Oheda et al, 1990). La importancia fisiológica de la proteína G-CSF radica en el mantenimiento homeostático entre proliferación y/o diferenciación de células granulocíticas y sus precursores. Esta proteína está presente en el suero sanguíneo y puede obtenerse de medios condicionados provenientes de varios tipos celulares (Metcalf, 1989).

El G-CSF es producido por células estromales, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y por algunas células tumorales (Arai et al, 1990). Este factor tiene un receptor de alta afinidad de 130-150 kd que se presenta principalmente sobre células mieloides maduras e inmaduras, específicamente del linaje

granulocito-neutrófilo, así como en células endoteliales y en algunas líneas celulares como la HL60 de leucemia promielocítica (Begley et al, 1987; Bussolino et al, 1989).

Estudios *in vitro* demostraron que el G-CSF es capaz de estimular la formación de colonias de granulocitos en cultivos de células de médula ósea en medio semisólido, de hecho su nombre se debe a esta capacidad (Nicola et al, 1983). A diferencia de otros factores estimuladores de colonias como GM-CSF e IL-3, el G-CSF es específico para las células de linaje granulocítico. Sin embargo, a pesar de inducir la activación, función y sobrevivencia de las células del linaje mielocítico, esta citocina es capaz de incidir en otros tipos celulares como los epitelios y fibroblastos para producir citocinas secundarias e inducir la migración y proliferación de células endoteliales (Bussolino et al, 1991). En los neutrófilos incrementa tanto su actividad fagocítica, la producción de aniones superóxido, así como la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos en contra de células tumorales. Por otro lado, actúa como un factor quimiotáctico al inducir la migración de leucocitos a través de un filtro de nitrocelulosa. Dicha actividad se considera importante durante el reclutamiento de neutrófilos hacia los sitios de inflamación, amplificándose la resistencia en contra de ciertos agentes microbianos nocivos (Wang et al, 1988).

Estudios *in vivo* han demostrado que el papel fisiológico de G-CSF es la producción de neutrófilos. Así, en ratones a los que se les ha depletado el gen que codifica para este factor, se ha visto una deficiencia en la producción de células progenitoras granulocíticas, pero también macrofágicas; un aspecto importante es que en estos ratones no se observa la movilización de las células granulocíticas, debido a la inactividad quimiotáctica por ausencia del factor (Lieschke et al, 1994).

Por otra parte, el G-CSF ha sido ampliamente utilizado en la práctica clínica en pacientes que han desarrollado granulocitopenia, ello debido a los tratamientos con quimioterapia o radioterapia, con o sin trasplante de médula ósea, así como en pacientes que reciben agentes inmunosupresores después del trasplante de órganos (Welte et al, 1996). En estos pacientes el G-CSF acelera la recuperación de granulocitos y disminuye el riesgo de infecciones severas por hongos o bacterias.

Por último, un aspecto importante de aplicación del G-CSF, es que este factor tiene la capacidad para movilizar células seminales y progenitoras hematopoyéticas hacia la sangre periférica, las cuales pueden ser obtenidas y utilizadas en los trasplantes de médula ósea (Sheridan et al, 1992).

### 3.7 Interleucina 3

El gene de la IL-3 se localiza en el cromosoma 5 en la región 5q23-q31, muy cerca de la región que codifica para el GM-CSF (menos de 1 kb de separación), con el cual comparten algunas secuencias de regulación. El gene que comprende 5 exones y 4 intrones, codifica para una glicoproteína de 133 aminoácidos con un peso molecular de 15-25 KDa. La IL-3 es una proteína globular muy glicosilada, principalmente a través de azúcares N-acetilgalactosamina y en cuya estructura se distinguen 4 hélices alfa que son importantes para la interacción con las cadenas beta de su correspondiente receptor (Feng et al, 1996).

La IL-3 participa en la regulación de la producción de la mayoría de las células sanguíneas incluyendo macrófagos, megacariocitos, células cebadas, eosinófilos, neutrófilos, eritroblastos y precursores de células T y B (Hapel et al, 1985; Palacios y Steinmetz, 1985). La fuente natural de este factor pleiotrópico son los linfocitos T activados (Kelso y Metcalf, 1985) y algunas líneas celulares como la UCD-144-MLA de células T, que produce de manera constitutiva altos niveles y la cual se utilizó para clonar el gene en 1986 (Yang et al, 1986).

Estudios *in vitro* han demostrado que la IL-3 estimula el crecimiento, diferenciación y supervivencia de células seminales hematopoyéticas pluripotenciales, así como también de progenitores multipotenciales y comprometidos a un linaje determinado. La IL-3 puede estimular a células progenitoras hematopoyéticas para inducir la formación de colonias de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, megacariocitos, células cebadas y eritroides (Ihle et al, 1983).

En combinación con otras moléculas como el ligando de CD40, IL-3 puede estimular la producción de células dendríticas y mantener el crecimiento de progenitores de células B. De igual manera, esta citocina puede afectar



indirectamente la proliferación, diferenciación y función(es) de células mieloides con un mayor grado de maduración, por ejemplo, induciendo la expresión de receptores para M-CSF en precursores de macrófagos y además incrementando la actividad fagocítica en macrófagos maduros (Chen et al, 1988). Se ha postulado que IL-3 y GM-CSF tienen actividades biológicas similares, sin embargo, se ha demostrado que IL-3 induce la proliferación de progenitores hematopoyéticos más primitivos que aquellos estimulados por GM-CSF (Koike et al, 1987).

La función de IL-3 en el organismo es ser un de los elementos de unión entre el sistema inmune y el sistema hematopoyético. Así, la síntesis de IL-3 se induce en células T, debido a su activación por la presentación de péptidos antigénicos. De hecho, la producción local de IL-3 por estas células en los sitios de infección podría servir para reclutar y activar a otros tipos celulares en estas zonas (Metcalf et al, 1986), de tal forma que IL-3 pudiera ser una citocina importante en la regulación de la hematopoyesis en los casos de estados fisiológicos alterados, en los cuales se necesita una producción adecuada de células competentes.

De igual manera, se ha visto que su liberación local en mucosas o en nódulos linfoides da por resultado la generación de células cebadas tipo mucoideas, a partir de sus precursores presentes en estos tejidos (Lantz et al, 1998). Por su parte, la liberación sistémica de esta citocina incrementa el número de células progenitoras hematopoyéticas y precursores de células cebadas en el bazo, así como también se observa un incremento en el número de megacariocitos, neutrófilos y células cebadas (Mach et al, 1998).

### **3.8 Eritropoyetina**

El gene de eritropoyetina se localiza en el cromosoma 7 en la región 7q11-q22 y esta compuesto de 5 exones y 4 intrones (Law et al, 1986). La proteína es de 166 aminoácidos de los cuales 27 constituyen el péptido señal y los restantes son la proteína nativa. Estudios fisicoquímicos indican que esta citocina tiene un gran contenido de alfa hélices en su estructura y además contiene 4 residuos de cisteína (posiciones 7, 29, 33 y 161) que forman dos puentes disulfuro (Wen et al, 1993), de los cuales el más importante se da entre la cisteína 7 y 161, debido a

que con su ruptura se pierde la actividad biológica de la proteína. Los puentes disulfuro también son característicos de los factores GM-CSF, G-CSF e IL-3. La proteína tiene un peso molecular aproximado de 36 KDa, aunque puede variar dependiendo del grado de glicosilación.

La EPO es una glicoproteína producida en el riñón en las células fibroblastoides peritubulares de la corteza interna y de la región medular (Lacombe et al, 1988). Otro órgano en donde se produce esta citocinas es el hígado, específicamente por los hepatocitos y los fibroblastos intersticiales (Koury et al, 1991).

La EPO estimula la proliferación y diferenciación de células precursoras eritroides hacia eritrocitos maduros. Su producción es controlada por el número de eritrocitos en circulación y su capacidad para transportar oxígeno (Busch et al, 1988; Bunn y Poyton, 1996). Se ha identificado la presencia de 2 receptores de alta afinidad para esta citocina: uno de 83-95 KDa y el otro de 100-105 Kda (Bazan, 1989 y 1990).

La EPO estimula a los progenitores BFU-E para generar colonias de eritroblastos. Estas células dan lugar a la formación de progenitores eritroides más maduros -CFU-E-, los cuales posteriormente son estimulados por EPO para formar colonias pequeñas de eritroblastos pero que ya presentan la capacidad de sintetizar hemoglobina y que finalmente maduran hacia eritrocitos sin núcleo, por efecto de esta citocina (Spivak et al, 1991 y 1996). En este proceso de maduración de los eritrocitos, la EPO puede sinergizar con otras citocinas como IL-1 e IL-3 (Goldwasser, 1984).

La función más importante de la EPO a nivel fisiológico es ser un elemento de conexión entre el transporte de oxígeno en la sangre y los requerimientos de oxigenación tisular por largos periodos de tiempo. Esto significa que la producción de esta citocina esta regulada por los procesos de hipoxia, en donde se presenta una mayor producción de la misma, e hiperoxia en donde esta disminuye. Debido a que la eritropoyetina es un factor mitógeno y de sobrevivencia, su producción es constitutiva y siempre se le puede detectar en el plasma (Spivak y Hogans, 1987). Un aspecto importante de esta citocina, es la regulación de su expresión en procesos de respuesta inflamatoria crónica y neoplasmas, los cuales comúnmente

se asocian con anemia. Así, citocinas inflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  inhiben la producción de EPO, mientras que IL-6 e IFN $\gamma$  no tienen este efecto (Jelkmann et al, 1992).

Por último, podemos mencionar que la EPO se ha aplicado a nivel clínico, para corregir la anemia en enfermedades renales severas, con muy buenos resultados (Eschbach et al, 1987 y 1989).

### **3.9 Factor de necrosis tumoral-alpha**

El gene del TNF- $\alpha$  tiene un tamaño de 3.6 kb y se localiza en el cromosoma 6 entre las bandas p23 y q12; está ubicado a 210 kb del locus del gene del complejo mayor de histocompatibilidad HLA-B (Nedwin et al, 1985). Dicho gene codifica en primera instancia, para una proteína inmadura de 233 aminoácidos que puede anclarse a la membrana y conservar su bioactividad. Cuando la célula es activada, la proteína se procesa mediante un corte que genera un péptido de 76 residuos y el TNF- $\alpha$  maduro se libera (Fiers, 1991).

El TNF- $\alpha$  es una glicoproteína de 17 kDa producida principalmente por macrófagos y linfocitos, sin embargo también se produce en células cebadas, queratinocitos, y algunas células tumorales de colon, mama y cerebro (Spriggs et al, 1988). El estimulador más potente para la producción de TNF- $\alpha$  son los lipopolisacáridos (LPS) (Chen et al, 1985).

El receptor del TNF- $\alpha$  es el prototipo de la familia de receptores de TNF, la cual incluye el CD-95, los receptores TRAIL y DR3 entre otros (Ashkenazi y Dixit, 1998). Existen dos formas del receptor humano de TNF- $\alpha$ , ambas difieren en tamaño, afinidad y efecto biológico. La mayor parte de las funciones biológicas conocidas del TNF- $\alpha$  están mediadas por el receptor TNF- $\alpha$  R1. El TNF- $\alpha$  R1 tiene un peso molecular de 55-60 kDa y modula la respuesta inmunológica normal, y al parecer es el encargado de mediar la respuesta citotóxica; además, es capaz de inducir apoptosis y activar al factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Chainy et al, 1996). El TNF- $\alpha$  R2 pesa entre 75-80 kDa y a pesar de que se conoce menos de este receptor, se ha observado que está implicado en la respuesta proliferativa del TNF- $\alpha$  (Smith et al, 1994).

A pesar de que el TNF- $\alpha$  se describió originalmente como un inhibidor del crecimiento de células eritroides y granulocíticas, induce con GM-CSF la generación de células dendríticas y coopera con IL-3 en el reclutamiento de progenitores primitivos (Caux et al, 1990, 1992 y 1993).

Aunque se ha observado un efecto estimulador en células progenitoras, se ha demostrado que en LMA, el TNF- $\alpha$  participa en la inhibición de la hematopoyésis normal, al disminuir la expresión de receptores para G-CSF sobre la superficie de las células hematopoyéticas (Elbaz et al, 1991a) y a su vez estimula el crecimiento del clon leucémico al incrementar la expresión de receptores para IL-3 y GM-CSF (Elbaz et al, 1991b). Incluso, existen reportes que evidencian la secreción de TNF- $\alpha$  por parte de las células leucémicas (Murohashi et al, 1989). Al respecto, se han realizado estudios en cultivos de médula ósea a largo plazo en LMA y se encontró un incremento en la producción de este factor por parte de la población de macrófagos, probablemente derivados de la clona leucémica (Mayani et al, 1992a).

A la fecha, no se conoce con precisión cual es la función del TNF in vivo, sin embargo se piensa que este factor es necesario en el organismo para resistir el ataque de agentes patógenos como las bacterias, hongos parásitos e infecciones virales. Con respecto a su participación en los procesos de carcinogénesis, se le ha involucrado en respuestas contrarias, así por ejemplo, se ha demostrado que es capaz de bloquear los procesos de tumorigénesis y metástasis (Lejeune et al, 1998), sin embargo hay publicaciones que indican que ratones deficientes en la producción de TNF, son resistentes al cáncer de piel (Moore et al, 1999), de ahí que la función de este factor en el desarrollo del cáncer, aún esta en discusión.

#### **4. Alteraciones en el sistema hematopoyético**

La formación de las células sanguíneas es un proceso en el cual participan diversos mecanismos finamente regulados, sin embargo cuando se presentan alteraciones puede traer por consecuencia el desarrollo de diferentes enfermedades hematológicas, en las cuales existen modificaciones cuantitativas y funcionales en las poblaciones de células hematopoyéticas.

De manera general, podemos agrupar a las enfermedades hematológicas de acuerdo a la producción de las células sanguíneas. Así, encontramos enfermedades como la anemia aplásica, que se caracterizan por una disminución en los niveles de células en la sangre periférica y en la médula ósea, al parecer como resultado de la activación de células inmunocompetentes en contra de las células seminales presentes en este último órgano (Kagan et al, 1976; Zoumbos et al, 1985).

Por su parte, otro grupo de enfermedades como los síndromes mielodisplásicos se caracterizan por una médula ósea hipocelular, normocelular o hipercelular, pero con cambios displásicos, lo cual da por resultado una hematopoyesis inefectiva y por lo tanto citopenias en sangre periférica (Flores-Figueroa et al, 2002). Se ha encontrado que aproximadamente el 50% de los pacientes con este trastorno presentan cariotipos anormales, lo cual sugiere que las alteraciones genéticas son parte importante en la patogénesis de esta enfermedad (Jacobs, 1991).

Por último, el grupo de trastornos hematológicos que se pueden considerar como enfermedades mieloproliferativas, se caracterizan por un incremento excesivo en el número de células hematopoyéticas, presentes tanto en médula ósea como en sangre periférica (Litchman, 1990). En este grupo encontramos a las leucemias, que por el tipo de estirpe celular afectada se pueden clasificar en linfoides y mieloides (Greaves, 1993). Las leucemias mieloides se consideran como trastornos hematológicos de tipo clonal, que surgen de la transformación de las células seminales o progenitoras hematopoyéticas (Sawyers et al, 1991; Jacobs, 1991). Así, los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación del clon donde se origina se ven afectados y lo cual le confiere ventajas de crecimiento sobre las demás células que participan en la hematopoyesis normal (Fialkow et al, 1981).

De acuerdo a un criterio puramente morfológico, las leucemias mieloides se clasifican en: a) agudas, en donde se presentan más del 5% de blastos en sangre periférica y más del 30% en la médula ósea (Catovsky, 1991); b) crónicas, con menos del 5% de blastos en sangre periférica e igual cantidad en médula ósea, pero con un elevado número de formas intermedias de maduración (Dreazen,

1988). En las siguientes secciones hablaremos de la leucemia mieloide aguda, que es una de las enfermedades hematológicas más agresivas y que en la mayoría de los casos tiene consecuencias fatales.

## **5. La LMA**

La LMA se puede considerar como un trastorno clonal, originado por la transformación de una célula hematopoyética inmadura. El inicio y la progresión de dicha transformación involucran una serie de cambios moleculares y celulares, que traen consigo alteraciones a distintos niveles del sistema hematopoyético, dando como resultado un cuadro patológico complejo y severo. Un aspecto importante en el estudio de este tipo de leucemia, es que durante los últimos años han cambiado los conceptos acerca de su biología, lo cual se debe en gran medida a los avances significativos en la identificación, purificación y caracterización de las células hematopoyéticas primitivas en las que se origina. A continuación presentaremos un panorama de dichos conceptos que han modificado la concepción de esta enfermedad.

### **5.1 Aspectos clínicos**

Para poder diagnosticar a la LMA, es necesario en primera instancia el análisis morfológico de preparaciones celulares tanto de sangre periférica como de médula ósea. De hecho, la presencia de >30% de blastos en médula ósea es un criterio necesario para el diagnóstico definitivo de esta enfermedad. De igual manera el análisis de las células por microscopía electrónica, citoquímica y los estudios de marcadores de superficie y citogenéticos, pueden dar un diagnóstico más preciso (Catovsky, 1991). Clínicamente, la LMA es una enfermedad heterogénea que comprende una gran variedad de subtipos (Bennett et al, 1985; Tabla 2). Lo anterior es, sin duda, resultado de la extraordinaria complejidad en su biología.

Un paciente con esta enfermedad, presenta una disminución en el número de glóbulos rojos y por consecuencia desarrolla el síndrome anémico. De igual manera, también hay disminuciones en los neutrófilos de sangre periférica, lo que provoca que los pacientes hospeden fácilmente infecciones, la mayoría (más del

**TABLA 2**  
**Clasificación de la LMA según el grupo FAB\***

<b>M0</b>	<p><b>Leucemia indiferenciada</b>          &gt;90% de blastos          Mieloperoxidasa citoplásmica positiva, CD13/33 positivo</p>
<b>M1</b>	<p><b>Mieloblástica sin maduración</b>          &gt;90% de blastos          &gt;3% positivas para mieloperoxidasa o Sudan negro          10% de granulocitos o monocitos en proceso de maduración</p>
<b>M2</b>	<p><b>Mieloblástica con maduración</b>          30-90% de blastos          &gt;10% de células granulocíticas          &lt;20% de células monocíticas</p>
<b>M3</b>	<p><b>Promielocítica</b>          Promielocitos anormales con granulación densa          Presencia de bastones de Auer</p>
<b>M4</b>	<p><b>Mielomonocítica</b>          &gt;30% de blastos          &gt;20% pero &lt;80% de células monocíticas</p>
<b>M4eo</b>	<p><b>Mielomonocítica</b>          Eosinófilos anormales positivos para cloroacetato y PAS          &gt;5% de eosinófilos</p>
<b>M5a</b>	<p><b>Monoblástica</b>          &gt;80% de monoblastos          &lt;20% de células granulocíticas</p>
<b>M5b</b>	<p><b>Monoblástica/Promonocítica</b>          &lt;80% de monoblastos          &lt;20% de células granulocíticas</p>
<b>M6</b>	<p><b>Eritroleucemia</b>          &gt;50% de células eritrocíticas          30% de blastos no eritroides granulares o agranulares</p>
<b>M7</b>	<p><b>Megacarioblástica</b>          &gt;30% de megacarioblastos</p>

- Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

80%) causadas por bacterias, lo que agrava aún más los síndromes anémicos. Otra complicación es la trombocitopenia que se manifiesta con graves hemorragias en piel y mucosas y de las más graves son aquellas que se presentan al sistema nervioso central, las cuales habitualmente acaban con la vida del paciente (Löwenberg et al, 1999).

La terapia de un paciente con LMA, toma en cuenta tres aspectos clínicos que deben ser tratados por separado: 1) las complicaciones asociadas al desarrollo de la enfermedad (anemia, infecciones y hemorragias); 2) la proliferación de los blásts malignos y 3) la recuperación de las cuentas de leucocitos normales. Así, el régimen de medicamentos en estos pacientes incluyen los antibioticos de antraciclina (daunorubicina, idarubicina y etopósido) y arabinosidos de citosina (cytarabina), los cuales son drogas citotóxicas utilizadas para eliminar el exceso de células malignas (Preisler et al, 1987; Sebban et al, 1988). Con el uso de estos fármacos se ha encontrado que entre el 60 y 70% de los pacientes entran en remisión completa, pero el 75% de ellos recaen teniendo consecuencias fatales, constituyendo así una de las leucemias más agresivas (Sebban et al, 1988).

Con respecto a la recuperación de las cuentas leucocitarias, se ha utilizado la administración de factores de crecimiento como el GM-CSF, posterior al tratamiento con los agentes quimioterapéuticos, o bien, previo a dicho tratamiento con la finalidad de incrementar la proporción de células transformadas en fase activa del ciclo celular, lo cual aumenta la actividad anti-leucémica de las drogas citotóxicas (Reuter et al, 1994).

## 5.2 Origen clonal de la LMA

Actualmente existe controversia acerca de la identidad de la(s) célula(s) en la(s) que ocurre la transformación que da lugar a la enfermedad. Un primer modelo propuesto a este respecto, y que por mucho tiempo fue considerado como la visión general sobre el origen de la LMA, es que ésta puede surgir en distintas poblaciones de células hematopoyéticas (Griffin y Lowenberg, 1986; Fialkow et al, 1981). El estadio de maduración y el grado de compromiso de dichas poblaciones hacia un linaje específico, es lo que determina que la patología tenga

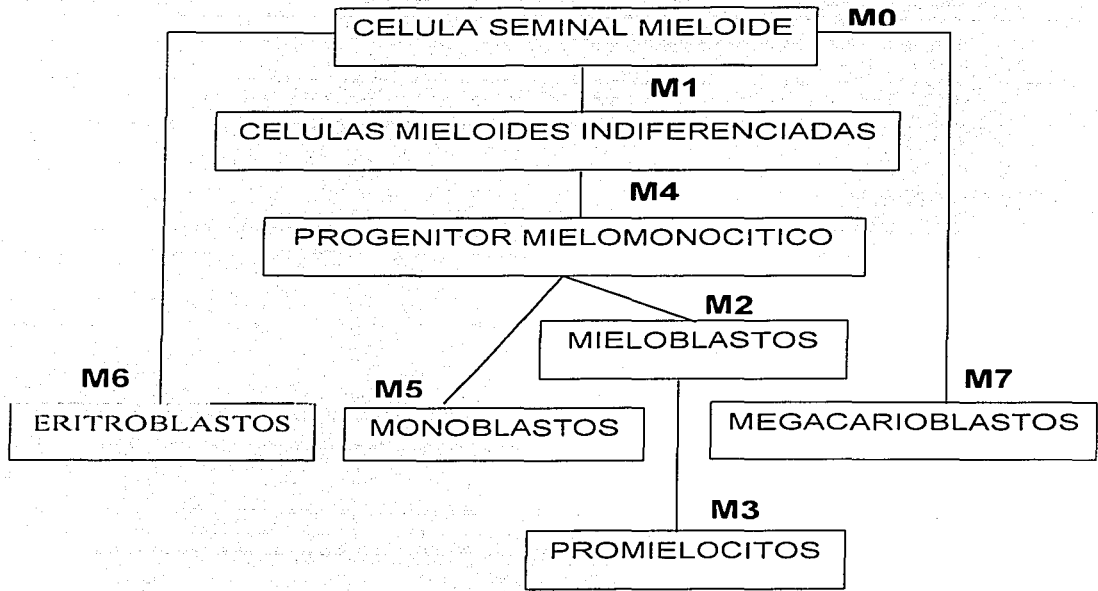


manifestaciones particulares y que clínicamente sea clasificada dentro de alguna de las 8 categorías descritas (M0 – M7). Por ejemplo, de acuerdo a este modelo, la LMA M1 se originaría en una población celular más primitiva que la LMA M3. Igualmente, siguiendo este modelo, la LMA M5 se originaría en un progenitor monocítico, mientras que la LMA M6 en un progenitor eritroide (Figura 3).

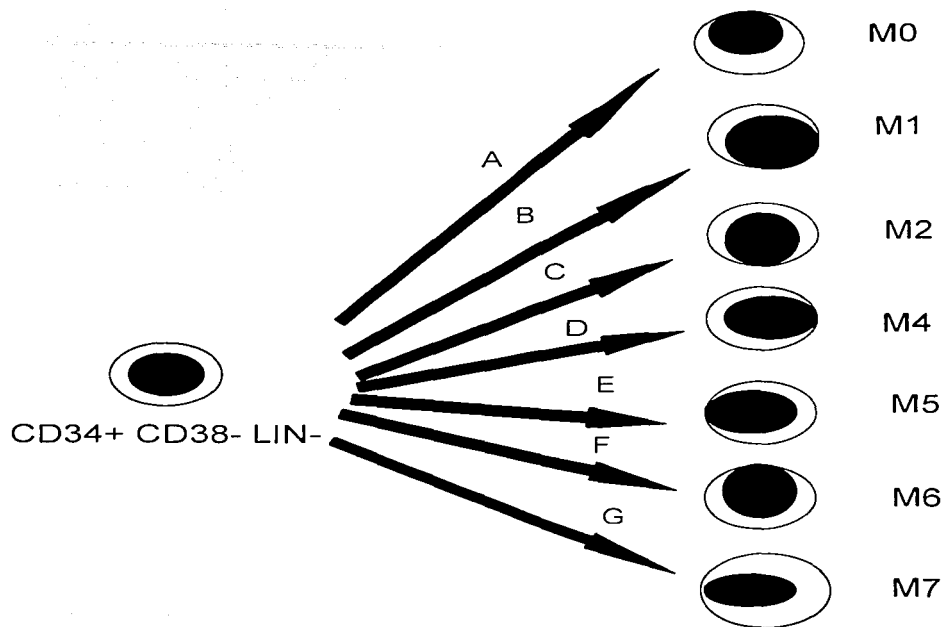
Un segundo modelo ha sido propuesto más recientemente, el cual plantea la posibilidad de que, en todos los casos (M0 – M7), la LMA se origina en una misma población de células hematopoyéticas primitivas, con el inmunofenotipo CD34+ CD38-Lin- (Haase et al, 1995; Mehrotra et al, 1995); sin embargo, dependiendo de la naturaleza de las alteraciones genéticas que se presenten, la clona leucémica seguirá un cierto patrón de comportamiento biológico y éste, a su vez, determinará sus características clínicas (Figura 4). La mayoría de los estudios reportados en los últimos 5 años, en los que se ha trabajado con subpoblaciones celulares enriquecidas, apoyan este segundo modelo, es decir, que en todos los casos de LMA, la enfermedad tiene su origen en la población de células CD34+ CD38- Lin- (Dick, 1999).

Es importante mencionar, sin embargo, que existe (al menos) una excepción a este último modelo: La LMA M3 (Leucemia Promielocítica; LPM). Este tipo de leucemia está caracterizada por la expresión del gene quimérico PML-RAR $\alpha$ , una proteína quimérica producto de la t(15;17), que actúa como represor transcripcional. En un estudio realizado por Turhan y colaboradores (Turhan et al, 1995), se observó que las células CD34+ CD38- (que incluyen a las células seminales y a los progenitores más inmaduros) de pacientes con LPM no expresaban el gene quimérico, mientras que la población de progenitores hematopoyéticos intermedios y maduros CD34+ CD38+ sí lo expresaba, lo que apoya la idea de que en este tipo particular de LMA, la leucemia se origina en una subpoblación de progenitores hematopoyéticos comprometidos a un linaje específico y con cierto grado de maduración.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**FIGURA 3. Modelo clásico del origen de la LMA.** La célula en donde ocurre la transformación que origina la LMA puede localizarse dentro de diferentes poblaciones celulares (con distinto estado de diferenciación y perteneciente a distintos linajes). Dependiendo de dicha población, será el subtipo de LMA que se origine (M0-M7). Tomado de Montesinos y Mayani, 2002.



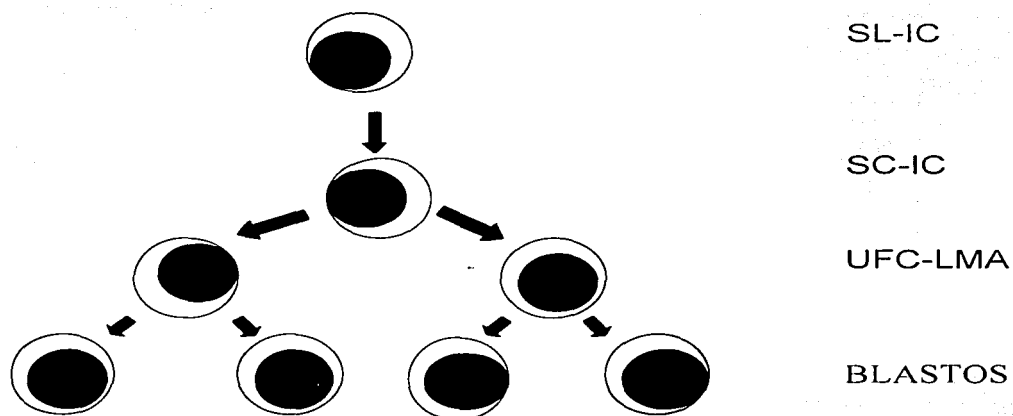
**FIGURA 4. Modelo actual del origen de la LMA.** En todos los casos de LMA, la transformación neoplásica ocurre en la población de células seminales (CD34+ CD38- lin-); sin embargo, dependiendo del tipo de alteraciones moleculares que se presenten (A - G), será el subtipo de LMA que se desarrolle. La única excepción que parece existir es la leucemia promielocítica (LMA-M3), en la que la transformación parece ocurrir en células progenitoras granulocíticas y no en células seminales. Tomado de Montesinos y Mayani, 2002.

### 5.3 Jerarquía hematopoyética en la LMA

Algunos estudios de proliferación celular basados en la incorporación de  $^3\text{H}$ - timidina, demostraron que, contrario a lo que se pensaba, en la población de células leucémicas solamente una pequeña fracción de ellas se encuentra sintetizando ADN de manera activa *in vivo* (Clarkson et al, 1970). Estudios posteriores comprobaron que dicha fracción podía ser identificada mediante ensayo de colonias (Minden et al, 1978) y que la población de células leucémicas es biológicamente heterogénea a pesar de su homogeneidad morfológica (Griffin y Lowenberg, 1986).

Los experimentos en cultivos semisólidos han establecido que 0.1 a 1% de los blastos de LMA son capaces de formar colonias *in vitro* y por lo tanto se pueden considerar como células progenitoras dentro de la población de células transformadas (Metcalf, 1977). Es importante destacar que dichos progenitores leucémicos son incapaces de mantener niveles elevados en cultivos tipo Dexter (en presencia de estroma medular desarrollado *in vitro*) (Coulombel et al, 1985; Mayani et al, 1991). El análisis inmunofenotípico confirmó que los blastos incapaces de formar colonias presentan marcadores de mayor diferenciación que las células formadoras de colonias *in vitro* (Löwenberg y Bauman, 1985). Con estos resultados se demostró que, al igual que en la hematopoyesis normal, la mayoría de las células leucémicas se originan de una pequeña población de progenitores (UFC-LMA) con una elevada actividad proliferativa (Figura 5).

Dado que para la detección de progenitores hematopoyéticos primitivos de médula ósea normal se utilizaron periodos prolongados de cultivo en presencia de una capa de estroma, este mismo sistema de cultivo se aplicó para identificar células capaces de mantener la leucemia *in vitro* a largo plazo. Sin embargo, como veremos más adelante, este sistema no favorece el crecimiento de las células leucémicas, por lo que se buscó el establecimiento de un sistema experimental que sí lo permitiera. El sistema en cuestión consistió en un cultivo líquido en presencia de una combinación de citocinas recombinantes. De esta manera, fue posible identificar una subpoblación de células progenitoras leucémicas, presentes en muy baja frecuencia y con un alto potencial proliferativo (células iniciadoras de cultivos en suspensión; SC-IC por sus siglas en inglés) que dan lugar a la



**FIGURA 5. Esquema de los compartimentos en la hematopoyesis leucémica.** Al igual que en la hematopoyesis normal, el sistema hematopoyético de pacientes con LMA está constituido por diferentes compartimentos. SL-IC, células iniciadoras de la leucemia en ratones SCID; SC-IC, células iniciadoras de la leucemia en cultivos en suspensión; CFC-LMA, células formadoras de colonias en cultivo de LMA. En esta patología, las células terminales corresponden a blastos y no a células maduras. Tomado de Montesinos y Mayani, 2002.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

formación de UFC-LMA (Sutherland et al, 1996). Estas células expresan el antígeno CD34, pero no expresan los antígenos CD45RA, CD71 y CD90 (Blair et al, 1997b). Mediante análisis de dilución limitante se estableció que la frecuencia de estas células es de 10 a 300 veces más baja que las UFC-LMA.

Estudios *in vivo*, empleando ratones SCID, demostraron que el trasplante de la subpoblación de células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>, obtenidas de la médula ósea de pacientes con LMA, fue suficiente para el desarrollo de la leucemia en dichos animales, dado que estas células son capaces de dirigirse a la médula ósea y proliferar en respuesta al tratamiento con citocinas, dando por resultado un patrón de diseminación y morfología celular leucémica, muy similar a la observada en los pacientes (Lapidot et al, 1994). Las células capaces de originar la hematopoyesis leucémica en este modelo han sido denominadas como células iniciadoras de la leucemia en ratones SCID (SL-IC, por sus siglas en inglés). El análisis de dilución limitante demostró que la frecuencia de estas células en la sangre periférica de los pacientes con LMA, es 1000 veces menor que las UFC-LMA, detectándose una célula por cada 250,000 células de médula ósea. Es importante señalar que en este mismo estudio se encontró que el trasplante de una subpoblación más madura (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>), la cual contenía la mayoría de las UFC-LMA, no desarrolló leucemia.

Tomando en consideración todas las evidencias anteriores, se ha propuesto que, al igual que en la hematopoyesis normal, el sistema hematopoyético de pacientes con LMA está organizado en forma jerárquica (Figura 5). Es decir, las células leucémicas terminales (blastos) provienen de una subpoblación de células progenitoras (UFC-LMA), cuyo inmunofenotipo es CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>. Estas, a su vez, provienen de una subpoblación todavía más pequeña, constituida por células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>, las cuales incluyen células capaces de iniciar la hematopoyesis leucémica tanto *in vitro* (SC-IC) como *in vivo* (SL-IC).

Es importante destacar que el estudio de la subpoblación de células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> de pacientes con LMA ha permitido entender aspectos fundamentales acerca de la biología de esta enfermedad. Por ejemplo, el grupo de Costello y colaboradores (Costello et al, 2000) ha demostrado que estas células poseen una sensibilidad reducida a los efectos de la Daunorubicina, uno de los compuestos

quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de la LMA. Además, expresan niveles elevados de los genes *mnp* y *lrp*, involucrados en la resistencia a diversos fármacos. Por otra parte, dicha subpoblación celular expresa bajos niveles del receptor Fas, por lo que es poco propensa a la apoptosis inducida por el ligando de Fas. Estos autores también observaron que estas células tienen una inmunogenicidad reducida, lo que podría explicar que el sistema inmune no sea capaz de reconocerlas y eliminarlas en forma eficiente.

Una proporción significativa de estas células se encuentra generalmente en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular (Dick, 1999). Esto también explicaría el que sea altamente resistente a drogas antineoplásicas, cuyo mecanismo de acción se centra en la inhibición de la división celular.

Finalmente, es interesante señalar que, al menos al nivel de las UFC-LMA, no se ha logrado demostrar que éstas posean una tasa de proliferación superior a la observada en células hematopoyéticas normales (Metcalf, 1977). Lo anterior parece indicar que la acumulación de blastos en la médula ósea de estos pacientes se debe, principalmente, a un bloqueo en los mecanismos de apoptosis, lo que concuerda con el estudio de Costello (Costello et al, 2000).

#### **5.4 Patrones de crecimiento en cultivos de médula ósea a largo plazo tipo Dexter**

De los diferentes sistemas experimentales *in vitro* que se han establecido para el cultivo de células hematopoyéticas, el sistema tipo Dexter o de médula ósea a largo plazo, es el que más similitudes presenta con respecto a las condiciones *in vivo*. Este sistema se basa en el desarrollo de una capa de células adherentes, constituida por diferentes poblaciones de células estromales (fibroblastos, macrófagos, adipocitos y células endoteliales), las cuales proporcionan las condiciones necesarias para la proliferación y diferenciación a largo plazo (>12 semanas) de las células hematopoyéticas primitivas (Dexter et al, 1977). Las células estromales producen una gran variedad de citocinas, tanto estimuladoras como inhibitoras de la hematopoyesis, así como moléculas de la matriz extracelular, de tal suerte que el microambiente hematopoyético creado *in vitro* semeja en gran medida al existente *in vivo* (Mayani et al, 1992b).

Cuando células de médula ósea de pacientes con LMA son cultivadas en este sistema, ocurre un hecho muy interesante. Los progenitores leucémicos – identificados por la morfología de las colonias desarrolladas en cultivos semisólidos y por marcadores moleculares– son eliminados en forma espontánea, mientras que los progenitores normales –identificados de acuerdo a los criterios mencionados– permanecen en cultivo por periodos más largos (Coulombel et al, 1985; Mayani et al, 1991). Estas observaciones evidentemente indican que el comportamiento de las células leucémicas *in vitro* es totalmente distinto al observado *in vivo*, en donde existe un amplio predominio de la clona neoplásica. Hasta el momento, no está claro a qué se debe la “desaparición” de las células leucémicas en cultivo. Por un lado, es posible que el sistema tipo Dexter carezca de algún factor o factores, que sea(n) necesarios para el desarrollo de las células neoplásicas; por otro lado, pudiera ser que en este sistema se esté produciendo alguna molécula que inhiba en forma selectiva a dichas células.

Aún cuando no se conoce con exactitud la razón de dicho comportamiento, el hecho de que en este sistema de cultivo se logre la eliminación selectiva de células leucémicas, sin alterar –al menos en forma aparente– a las células normales, ha llevado a diferentes grupos de investigación a aplicar este sistema en la clínica. En efecto, el propio grupo de Michael Dexter, en Manchester, Inglaterra, ha llevado a cabo más de 30 trasplantes autólogos de médula ósea, en pacientes con LMA, empleando este sistema de cultivo como método para eliminar a las células leucémicas (Chang et al, 1989). Los resultados reportados han sido bastante favorables, aún cuando la metodología inherente al sistema lo hace poco práctico para su aplicación en forma más amplia y rutinaria.

### **5.5 Participación de las citocinas en la LMA**

Como hemos mencionado la LMA se caracteriza por la acumulación de células mieloides transformadas que permanecen en un estado de diferenciación específico y que no son capaces de concluir su proceso de maduración y por tanto no son funcionales. A pesar de que se acepta que la LMA se origina por alteraciones genéticas, dichas alteraciones solamente dan lugar a ciertos cambios en las propiedades de proliferación y diferenciación celular (Sawyers et al, 1991),



debido a que los genes afectados codifican para proteínas relacionadas con estos procesos. Estas proteínas se pueden clasificar en cuatro categorías: citocinas hematopoyéticas (CH), receptores para las CH, transductores de señales citoplásmicas y factores de transcripción (Cantley et al, 1991). Todas ellas participan de manera conjunta para completar el cuadro de transformación leucémica (Hunter, 1991). En este proceso de transformación y acumulación de las células leucémicas, las CH juegan un papel muy importante, dado que participan en la inducción de la proliferación a través de mecanismos paracrinos o autocrinos (Miyachi et al, 1987; Oster et al, 1989).

Se ha demostrado que las citocinas GM-CSF, G-CSF e IL-3 son capaces de inducir la respuesta proliferativa de las células de LMA en cultivos semisólidos y en experimentos de síntesis de DNA (Delwel et al, 1988). Por su parte el SCF incrementa el efecto inductor de estos tres factores sobre LMA in vitro (Budel et al, 1993) y además en combinación con PIXY 321, una proteína de fusión de dos factores GM-CSF/IL-3, induce el crecimiento a largo plazo de células humanas de LMA al ser inyectadas en ratones SCID (Lapidot et al, 1994). Una citocina que posee propiedades similares a SCF es FL, la cual estimula la proliferación celular de LMA en combinación con GM-CSF o G-CSF (Lisovsky et al, 1996). Otras citocinas que se han reportado como inductoras de LMA son IL-1, IL-5, IL-6, IL-11, EPO, M-CSF y TNF (Delwel et al, 1988; Motoji et al, 1990; Baumann et al, 1992; Birkenkamp et al, 1999; Kimura et al, 1999).

Un aspecto interesante de mencionar es que no existe correlación entre el efecto de las citocinas y las variedades de LMA, así por ejemplo, el subtipo LMA-M5 (monoblástica) no responde de manera preferencial al M-CSF, de igual manera los subtipos LMA-M2, M3 y M4 con características morfológicas de linaje granulocítico no son estimuladas específicamente por G-CSF (Miyachi et al, 1987; Delwel et al, 1988). Mas aún el efecto estimulador de TPO, citocina específica para la producción de plaquetas, no esta restringida para la LMA-M7 (morfolología megacarioblástica) y es capaz de inducir la proliferación de diferentes subtipos de LMA (Tokunaga, 2000).

Algunos factores no afectan directamente la proliferación de las células leucémicas, sin embargo pueden aumentar o disminuir el estímulo de otras

citocinas cuando se presentan de manera conjunta. Así, el TNF en combinación con GM-CSF o IL-3 provoca un efecto sinérgico (Salem et al, 1990), aunque en presencia de G-CSF se inhibe la proliferación de las células, dado que el TNF es capaz de inducir la ruptura proteolítica del receptor para este factor (Elbaz et al, 1991a); contrario a este efecto es el incremento en la expresión de receptores para GM-CSF e IL-3 en las células leucémicas inducido por TNF (Elbaz et al, 1991b). Por su parte el SCF puede sinergizar con IL-3, GM-CSF y G-CSF, pero sin incrementar los receptores para estas citocinas (Budell et al, 1993); este mecanismo al parecer está relacionado con una activación sinérgica de segundos mensajeros que participan en la transducción de señales de proliferación como la proteína cinasa C (Cáceres-Cortés et al, 1992).

Si bien las células leucémicas responden a la adición de citocinas en cultivo, también se ha observado una proliferación espontánea resultado de mecanismos autócrinos (Young y Griffin, 1986; Murohashi et al, 1989; Reilly et al, 1989; Bradbury et al, 1990). Los blastos de LMA pueden producir *in vitro* GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF (Oster et al, 1989; Delwel et al, 1989). En este mecanismo, la estimulación puede ser directa o indirecta, así por ejemplo para GM-CSF, G-CSF y M-CSF la actividad inductora es directa y a través de la activación de sus receptores en la membrana de los blastos. En contraparte, IL-1 $\beta$  puede inducir la producción y liberación de varios factores (Oster et al, 1989; Delwel et al, 1990; Bradbury et al, 1990), incluso de la misma IL-1 con lo cual se mantiene la estimulación autócrina (Oster et al, 1989; Delwel et al, 1990). TNF puede ejercer efectos similares, aunque de manera menos frecuente. Es importante señalar que se han realizado estudios en donde se relaciona el crecimiento autónomo *in vitro*, con un mal pronóstico de los pacientes (Löwenberg et al, 1993).

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día, la LMA es una enfermedad muy agresiva que a corto plazo resulta fatal. En los años 70 la sobrevivida a 5 años en este tipo de pacientes era del 15%. Actualmente, y gracias a los avances en su diagnóstico y tratamiento, el periodo de sobrevivida a 5 años se ha incrementado significativamente, sin embargo continúa siendo bajo (apenas del 40%).

Un aspecto muy importante en el entendimiento de la enfermedad ha sido el determinar que la población de células leucémicas no es homogénea, como se pensaba, y que existe una jerarquía celular similar a la presente en el sistema hematopoyético normal. A partir de estos hallazgos, se puede decir que todas las células leucémicas provienen de una población muy primitiva, la cual resulta ser la responsable de mantener la producción constante de los blastos transformados (Figura 4). Debido a lo anterior, es necesaria la caracterización de las subpoblaciones leucémicas primitivas, para poder entender con mayor profundidad la biología de este padecimiento y así poder implementar terapias más efectivas que permitan eliminar a dichas células.

En el desarrollo de la enfermedad, se sabe que las citocinas participan de manera importante, dado que las células leucémicas requieren de su presencia para proliferar. Sin embargo, el efecto de las citocinas se ha observado en la población de blastos leucémicos con un mayor grado de maduración y no se conoce su participación en las subpoblaciones leucémicas más primitivas, lo cual sería de gran importancia dado que en realidad son estas células las que generan la leucemia. En este estudio se evaluaron tres aspectos del efecto de distintas combinaciones de citocinas hematopoyéticas sobre las CPH provenientes de pacientes con LMA.

1) Estudiamos el efecto del GM-CSF en la proliferación y expansión de CPH de LMA, en un sistema que reproduce las condiciones presentes en la médula ósea de los pacientes (LTBMC). Lo anterior resulta importante debido a que este factor se aplica en estos pacientes para reducir la mielotoxicidad de la quimioterapia, sin embargo a pesar de que se observa una recuperación en ellos, también se ha detectado que presentan recaídas con mayor frecuencia, debido a

ello, resulta importante conocer cual es el efecto de este factor sobre los progenitores leucémicos.

2) Estudiamos los potenciales de proliferación y expansión de dos subpoblaciones de CPH provenientes de pacientes con LMA, en presencia de diferentes combinaciones de citocinas en cultivos líquidos en suspensión y la comparamos con la capacidad de respuesta de subpoblaciones provenientes de individuos sanos. El estudio de dichos potenciales es fundamental para entender de qué manera las citocinas hematopoyéticas participan en el incremento de los progenitores leucémicos.

3) Una de las citocinas incrementadas en LTBMC en LMA es el  $\text{TNF-}\alpha$ , el cual se ha demostrado, favorece el crecimiento de los blastos leucémicos e inhibe la proliferación de las células hematopoyéticas normales (Elbaz et al, 1991b; Mayani et al, 1992a), debido a ello su participación en el desarrollo de la enfermedad parece ser importante. El efecto del  $\text{TNF-}\alpha$  sobre los blastos transformados, ha sido descrito en células mononucleares totales, sin embargo, no se sabe si las células progenitoras responden de igual manera a este factor. Por consiguiente, en este estudio evaluamos si esta citocina contribuye al crecimiento de los progenitores leucémicos.

## V. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de algunas citocinas hematopoyéticas en la proliferación y expansión in vitro de diferentes subpoblaciones de células primitivas hematopoyéticas de pacientes con leucemia mieloide aguda.

### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de rhGM-CSF en la proliferación y expansión de progenitores hematopoyéticos provenientes de pacientes con LMA en cultivos de médula ósea a largo plazo (LTBMC).
  - 1.1 Determinar la cinética de proliferación de células hematopoyéticas provenientes de pacientes con LMA en LTBMC en presencia y ausencia de rhGM-CSF.
  - 1.2 Determinar la cinética de expansión de progenitores hematopoyéticos provenientes de pacientes con LMA en LTBMC en presencia y ausencia de rhGM-CSF.
2. Determinar el efecto de diferentes combinaciones de citocinas en la proliferación y expansión de progenitores hematopoyéticos, partiendo de subpoblaciones obtenidas mediante un proceso de separación inmunomagnética para enriquecer en células CD34+ lin- y CD34+ CD38- lin- provenientes de pacientes con LMA y de donadores normales.
  - 2.1 Determinar las cinéticas de proliferación y expansión de las subpoblaciones enriquecidas en presencia de diferentes combinaciones de citocinas recombinantes.
  - 2.2 Determinar el efecto del TNF- $\alpha$  en la proliferación y expansión de las subpoblaciones enriquecidas en presencia de las diferentes combinaciones de citocinas recombinantes.

## VI. METODOLOGÍA

**1. Pacientes y obtención de las muestras.** Se colectaron aspirados de médula ósea de 24 pacientes con el diagnóstico inmunocitomorfológico de LMA que ingresaron al Servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del CMNSXXI (IMSS) y al Servicio de Hematología del Hospital General de México (SSA). Todos ellos se encontraban libres de tratamiento. También se utilizaron como controles muestras de médula ósea de sujetos sanos (donadores de médula ósea) provenientes de la Unidad de Transplantes de Médula Osea del Servicio de Hematología, del Hospital de especialidades del CMNSXXI (IMSS). La variedad de leucemia se determinó con base en los criterios diagnósticos definidos por la clasificación Franco-Americana-Británica (Bennett et al, 1985). Los datos de los pacientes se muestran en diferentes tablas a lo largo de la sección de resultados.

**2. Obtención de células mononucleares.** La muestra de médula ósea heparinizada fue centrifugada para obtener la capa de células nucleadas ("buffy coat"). Dichas células se resuspendieron en PBS y se llevaron a un gradiente de densidad (Ficoll-Paque Plus; densidad  $<1.077$  g/ml). Las células mononucleares (CMN) de baja densidad se resuspendieron en IMDM (del inglés, Iscove's Modified Dulbecco's Medium) suplementado con 2% de suero fetal bovino (StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada). Se determinó el número total de células mononucleares viables mediante conteo con hemocitómetro y utilizando la solución de Turck y el colorante azul de tripano.

**3. Ensayo de colonias.** La evaluación de expansión celular, se realizó mediante la identificación y cuantificación de progenitores hematopoyéticos empleando cultivos semisólidos en metilcelulosa. El medio de cultivo consistió de 0.9% de metilcelulosa, 30% de suero fetal bovino, 1% de albumina de suero bovino,  $10^{-4}$  M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamina, 50 ng/ml del factor de células seminales (SCF) recombinante humano (rh), 10 ng/ml de interleucina-3 rh (IL-3), 10 ng/ml del factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos rh (GM-CSF) y 3 U/ml de eritropoyetina rh (EPO). Se sembraron  $5 \times 10^4$  células/ml y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células adherentes y no adherentes obtenidas de los cultivos a largo plazo fueron cultivadas de esta manera, pero el número celular varió dependiendo de las células obtenidas.

Después de 14 días de cultivo, se contaron las colonias formadas bajo un microscopio invertido. Las colonias hematopoyéticas se clasificaron de la siguiente manera: 1) colonias multipotenciales, colonias con presencia de células mieloides y eritroides; 2) colonias eritroides, a) CFU-E, colonias pequeñas de 20-50 células hemoglobinizadas y b) BFU-E, colonias de más de 50 células hemoglobinizadas; 3) colonias mieloides, a) CFU-G, colonias granulocíticas, b) CFU-M, colonias macrófágicas, c) CFU-GM, colonias con presencia de granulocitos y macrófagos; y 4) UFC-LMA, colonias blásticas identificadas como colonias pequeñas (10-40 células) y morfología anormal, las cuales no se encuentran en LT BMC de donadores sanos. Este criterio ha sido previamente publicado (Coulombel et al, 1985; Mayani et al, 1991). Se consideró como expansión celular el incremento en el número de células capaces de formar colonias.

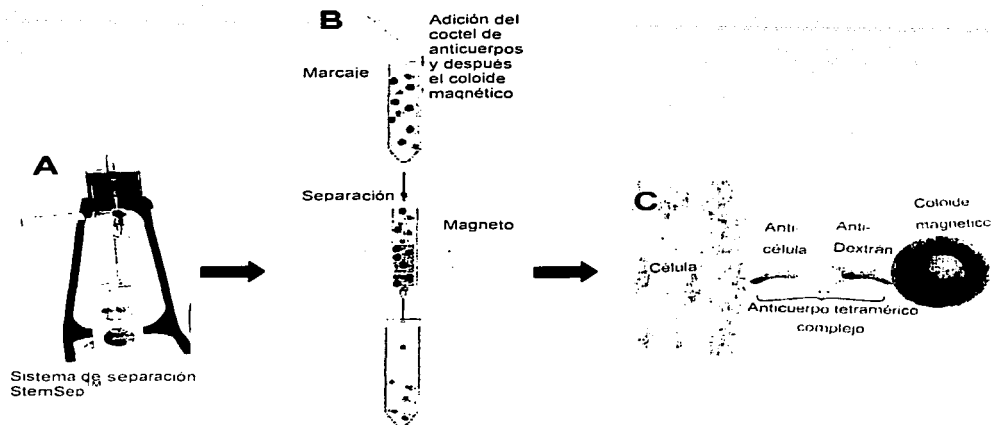
**4. Cultivos de médula ósea a largo plazo tipo Dexter.** Para establecer LT BMC las células mononucleares se resuspendieron en medio LTMC (STI, Vancouver, Canadá) a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  CMN/ml. El medio LTMC se compone de lo siguiente: medio alfa suplementado con 12.5% de suero de caballo, 12.5% de suero fetal bovino, 0.2 mM inositol, 20  $\mu$ M de ácido fólico,  $10^{-4}$  M 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina y  $10^{-6}$  M de hidrocortisona adicionada al momento. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 pozos y se incubaron a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 3 días de cultivo las células se incubaron a 33°C. Cada 7 días de cultivo, se realizó un cambio de medio, colectando la mitad del sobrenadante con células en suspensión y adicionando la misma cantidad de medio de reciente preparación. Se realizó un conteo celular y un ensayo de colonias. A los días 21, 35 y 42 de cultivo, además de las células no adherentes se colectaron las células adherentes de cultivos que se sembraron por duplicado. Las células adherentes se despegaron adicionando a los cultivos una solución de tripsina al 0.25% e incubando a 37°C durante 10 min. Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ l de SFB para inhibir la acción de la enzima. Las células se resuspendieron en IMDM con 2% de SFB y se realizó conteo celular y ensayo de colonias.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**5. Enriquecimiento de células CD34+.** Para obtener la población enriquecida de células CD34+ lin- y CD34+ CD38- lin- a partir de células mononucleares, se utilizó un sistema de selección negativa StemSep™ (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, Canadá; figura 6A). Para obtener una población enriquecida en células CD34+lin-, las células mononucleares se colocaron en 1 ml de IMDM al 2% de SFB y se incubaron durante 15 min con un coctel de anticuerpos tetraméricos (complejo con dos fragmentos Fab; figura 6C), los cuales reconocen por uno de sus fragmentos Fab, a los siguientes antígenos de superficie: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b y glicoforina A, mientras que por la otra región, reconocen al dextrán que recubre a las partículas metálicas (coloide magnético). Para obtener a la población CD34+ CD38- se utilizó el mismo coctel, pero adicionado con un anticuerpo que reconoce a CD38. Posteriormente se adicionaron 60 µl del coloide magnético y se incubó durante 15 min. Las células se pasaron a través de una columna de plástico en presencia de un magneto y se hizo fluir 8 ml de PBS al 10% de SFB (figura 6B). Las células que no fueron retenidas en la columna (población enriquecida en células CD34+ lin- o CD34+ CD38- lin-) se colectaron y se centrifugaron a 1300 RPM durante 7 min. Finalmente se realizó un conteo celular.

**6. Obtención de subpoblaciones celulares en LMA.** Para definir a las subpoblaciones celulares provenientes de pacientes con LMA que utilizamos en el presente estudio, tomamos en cuenta dos aspectos: a) las células leucémicas están organizadas en forma jerárquica, al igual que su contraparte normal, debido a ello el proceso de selección negativa para enriquecer en células progenitoras, se puede emplear en muestras tanto de donadores sanos como de pacientes; y b) el sistema de selección negativa Stem Sep™ que hemos empleado, se ha utilizado en trabajos previos realizados en el laboratorio para el enriquecimiento en células CD34+lin- y CD34+CD38-lin-, de muestras provenientes de MO y sangre de cordón umbilical (Flores-Guzmán, 2000) y también de patologías hematológicas como anemia aplásica, síndrome mielodisplásico (Martinez-Jaramillo, 2002) y leucemia mieloide crónica (Chávez-González, 2003). Debido a lo anterior, hemos definido a las subpoblaciones celulares provenientes de pacientes con LMA en dos categorías: 1) Subpoblación I, aquella obtenida mediante el proceso de



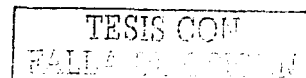


**FIGURA 6. Enriquecimiento de células por selección negativa. A)** El sistema StemSep™, esta formado de un magneto con una base de plástico que lo sostiene. El magneto tiene una hendidura en donde se coloca la columna de separación acondicionada con una malla metálica. En la base de la columna se acopla una válvula que regula la salida de la suspensión celular. **B)** A la muestra a separar, se le adiciona un coctel de anticuerpos y el coloide magnético para marcar a las células que no se requieren y las cuales quedarán retenidas en el campo magnético; la mezcla se hace fluir a través de la columna de separación y la suspensión celular que sale de ella se colecta en un tubo cónico (células enriquecidas). **C)** Las células que no se requieren, se marcan con un anticuerpo tetramérico, el cual reconoce por uno de los fragmentos Fab (anti-célula), al antígeno de linaje localizado sobre la superficie de la membrana de la célula, mientras que el otro fragmento del anticuerpo (anti-dextrán), reconoce a la capa de dextrán que recubre a la partícula de metal.

separación inmunomagnética para enriquecer en células CD34+lin-; y 2) Subpoblación II, aquella obtenida mediante el proceso de separación inmunomagnética para enriquecer en células CD34+CD38-lin-.

**7. Inmunocitoquímica.** Se identificó a las células que expresan el antígeno CD34 en las poblaciones celulares, antes y después de ser separadas por selección negativa, a través de inmunocitoquímica. Para ello se prepararon laminillas con  $5 \times 10^4$  células, las cuales se fijaron con acetona durante 10 min. Posteriormente se utilizó un "Kit" de marcaje y revelado del antígeno CD34 (Dako En Vision+System, Peroxidasa-Diaminobenzidina; DAKO, Denmark), cuyo procedimiento es el siguiente: incubamos a las células con una solución de  $H_2O_2$  al 5% para bloquear la peroxidasa interna (8 min) y posteriormente incubamos con un anticuerpo monoclonal (30 min) que reconoce al antígeno CD34 (anti-CD34; dilución 1:75). Después agregamos un primer anticuerpo dirigido contra anti-CD34 e incubamos durante 20 min; se adicionó un segundo anticuerpo acoplado a la enzima peroxidasa (que reconoce al primero), y se incubó durante 20 min. Se agregó el sustrato de la enzima y se mantuvo la reacción durante 10 min en la obscuridad. Finalmente las células se tiñeron con Hematoxilina y se evaluaron 200 células por laminilla para obtener el porcentaje de células que fueron positivas para la reacción (CD34+).

**8. Cultivos en suspensión.** Las células obtenidas después de selección negativa, se resuspendieron en medio de cultivo a largo plazo (Myelocult, Stem Cell Technologies, Inc.). La composición del medio de cultivo fue como sigue: medio alfa suplementado con 12.5% de suero de caballo; 12.5% de suero fetal de bovino; 0.2 mM inositol; 20  $\mu$ M ácido fólico;  $10^{-4}$  M 2-mercaptoetanol y 2  $\mu$ M L-glutamina. El medio se suplemento con diferentes combinaciones de las siguientes citocinas recombinantes hematopoyéticas: factor de células seminales (SF, Stem Cell Technologies, Inc., adicionado a 10 ng/ml); interleucina-3 (IL-3, Stem Cell Technologies, Inc., 10 ng/ml); interleucina-6 (IL-6, Stem Cell Technologies, Inc., 10 ng/ml); factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, Molgramostin, Novartis/Schering-Plough, Ciudad de México, 10 ng/ml); G-CSF (Stem Cell Technologies, Inc., 10 ng/ml) y Eritropoyetina (EPO, Eprex; Johnson & Jonson, USA, 3 U/ml). Los cultivos control no tuvieron citocinas recombinantes.



En otros experimentos utilizamos el medio de expansión libre de suero (Stem Span, Stem Cell Technologies, Inc.), cuya composición es: medio eagle modificado por Iscove suplementado con albúmina de suero bovino (1%); rh insulina (10  $\mu\text{g/ml}$ ); Transferrina humana (200  $\mu\text{g/ml}$ );  $10^{-4}$  M 2-mercaptoetanol y 2 mM L-glutamina. El medio se suplementó además de las combinaciones de las citocinas anteriores, con la adición de: trombopoyetina (TPO, Stem Cell Technologies, Inc., 10 ng/ml) y el ligando de FLT3 (FLT3-L, Stem Cell Technologies, Inc., 10 ng/ml). Con estas combinaciones realizamos cultivos en presencia y en ausencia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , Stem Cell Technologies, Inc., 10 ng/ml).

Las células fueron cultivadas en cajas de 24 pozos a  $37^{\circ}\text{C}$  y a una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml/pozo. Después de 5 días de cultivo, las células fueron cosechadas de los pozos, se contaron y se analizaron para contenido de progenitores (CFC). Se realizaron cultivos secundarios a una concentración de  $5 \times 10^4$  a  $10 \times 10^4$  de las células obtenidas a los días 5 y 10 de cultivo; al día 10 se evaluó el número de progenitores. Al día 15 se finalizaron los cultivos, se realizó conteo celular y se determinó el número de CFC.

**9. Análisis Estadístico.** Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa computacional SPSS (versión 10.0). Así, para determinar si existía diferencia significativa entre los valores de CFC, porcentajes de recuperación y de células CD34+, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Por su parte para determinar diferencias significativas en las cinéticas de proliferación se utilizó un análisis de varianza de un factor en el diseño de bloques completos al azar. En el análisis del efecto de TNF- $\alpha$  se utilizó la prueba de Mann-Whitney para determinar si existían diferencias significativa entre los cultivos en presencia y ausencia del factor y además se realizó un análisis de varianza de un factor en el diseño completamente al azar para determinar diferencias por día. Finalmente se calculó el estimador de razón para determinar el incremento en expansión de CFC. Los resultados se presentan como valores de mediana debido a que existen datos extremos y representa mejor la medida de tendencia central, sin embargo el análisis de significancia se realizó utilizando los datos obtenidos por experimento y

de acuerdo al número de muestras indicadas de donadores normales y de pacientes. La significancia estadística se asumió con valores de  $P < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Efecto del GM-CSF sobre la cinética de la hematopoyesis en LTBMC de pacientes con LMA

1. **Contenido de progenitores hematopoyéticos en la médula ósea.** Las características de los pacientes con LMA que se analizaron en esta parte del estudio, se muestran en la tabla 3.

En las muestras de médula ósea de donadores sanos se detectaron 409 células progenitoras (células formadoras de colonias, CFC) por cada  $10^5$  CMN. De esta población de células, el 52.8% fueron progenitores mieloides, el 45.9% fueron eritroides y el 1.2% fueron multipotenciales. No se observaron UFC-LMA en médula normal (Tabla 4).

En el caso de las muestras de médula ósea de los pacientes con LMA, se observó una disminución en el número de progenitores dado que solo se detectaron 5 CFC por cada  $10^5$  CMN, lo cual representa tan solo el 1.2% del número observado en la médula normal.

Los progenitores mieloides y eritroides detectados en las muestras de médula ósea de los pacientes, fueron tan solo el 1.3% y 1% de aquellos obtenidos en los donadores normales, respectivamente. No hubo detección de progenitores multipotenciales (Tabla 4).

Las UFC-LMA solamente se observaron en dos pacientes, uno con el subtipo LMA-M2 (paciente 7) y otro con el subtipo LMA-M4 (paciente 10), los cuales representan el 14% del total de los pacientes estudiados.

Estos resultados nos indican que existe una disminución en el número de progenitores hematopoyéticos normales en los pacientes con LMA y que no en todos los pacientes podemos detectar la presencia de progenitores formadores de colonias de blastos leucémicos.

**TABLA 3. Características de los pacientes incluidos en esta parte del estudio.**

Paciente	Edad/ Sexo	Subtipo	Hb	Plaquetas X10 <sup>3</sup>	Leucocitos X10 <sup>3</sup>	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)
1	40/M	LMA-M0	10.2	33	40	13	65
2	32/F	LMA-M2	11.6	34	2.3	3	64
3	27/M	LMA-M2	5.4	92	25	37	50
4	21/F	LMA-M2	6.2	78	4.2	10	35
5	51/M	LMA-M2	13.3	6	37.9	35	78
6	18/M	LMA-M2	13.1	32	5.8	3	60
7	18/M	LMA-M2	11.4	36	3	14	80
8	25/F	LMA-M3	8.1	17	6.1	12	30
9	43/F	LMA-M4	8.0	29	45.6	28	95
10	37/M	LMA-M4	12.8	21	4.7	2	50
11	21/F	LMA-M4	7.4	45	61	26	64
12	17/M	LMA-M4	12	18	21	5	68
13	56/M	LMA-M4	10	55	7.5	35	70
14	34/F	LMA-M4	6.9	19	15.5	21	81

M, masculino; F, femenino; Hb, hemoglobina; SP, sangre periférica; MO, médula ósea.

**TABLA 4. Número de células progenitoras/10<sup>5</sup> CMN de médula ósea de donadores normales y pacientes con LMA.**

Donador	Mieloide	Eritroide	Multipotencial	UFC-LMA
Normal (n=10)	216 (106 - 422)	188 (92 - 285)	5 (1 - 22)	0
LMA (n=14)	3* (0 - 68)	2* (0 - 188)	0*	0 (0 - 64)

Los valores indicados corresponden a la mediana (valor mínimo y máximo) del número de donadores indicados.

\*Diferencia significativa con los valores de donadores normales.

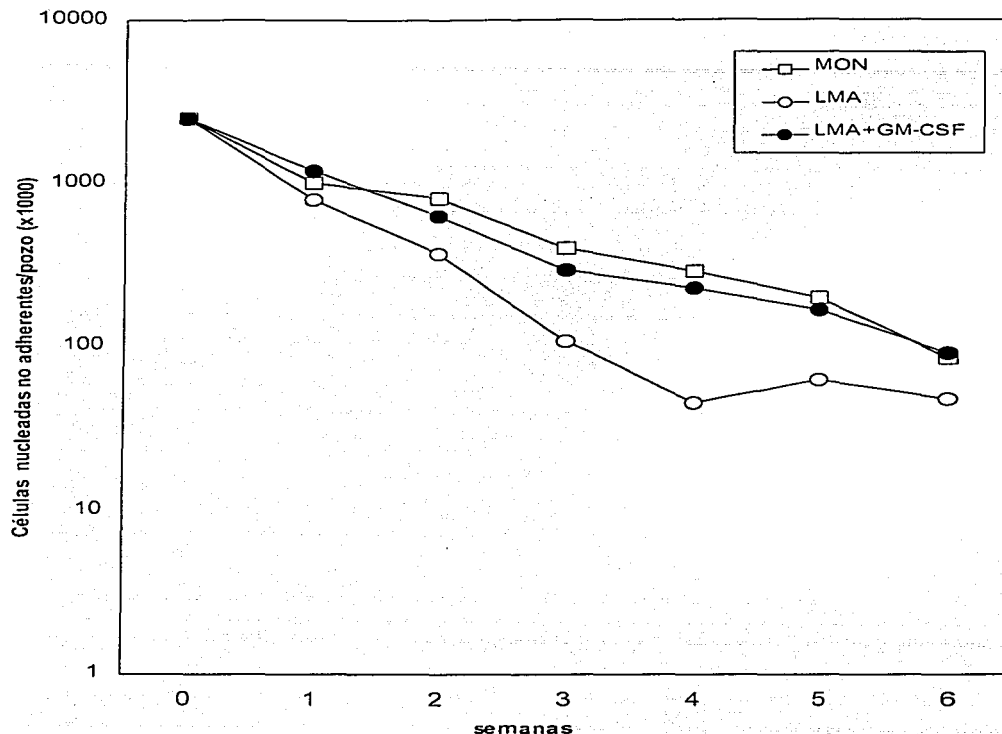
**2. Cinética de proliferación de células hematopoyéticas en LTBMC.** Se evaluó el número celular en las fracciones no adherente y adherente de los LTBMC. En los donadores normales se observó una disminución del número celular en la fracción no adherente en los diferentes días de cultivo, hasta alcanzar el 3.3% del número inicial a la sexta semana (Figura 7). En la fracción adherente el número celular prácticamente se mantuvo constante entre las semanas 3 y 6 (Figura 8).

Por su parte en los cultivos provenientes de pacientes con LMA, se observó una cinética similar a la obtenida en los cultivos normales, sin embargo los valores fueron más bajos a las semanas 3, 4 y 5 dado que se obtuvieron el 26.9%, 15.5% y 31.6% respectivamente, de aquellos obtenidos en los cultivos normales; estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 7). Con respecto a las células adherentes, observamos a las semanas 3 y 5 de cultivo una disminución significativa en número con respecto al normal, en donde se obtuvieron el 36.2% y el 19.3% de los valores de los LTBMC normales, mientras que a la semana 6 de cultivo el número celular disminuyó a tan solo el 4.8% (Figura 8).

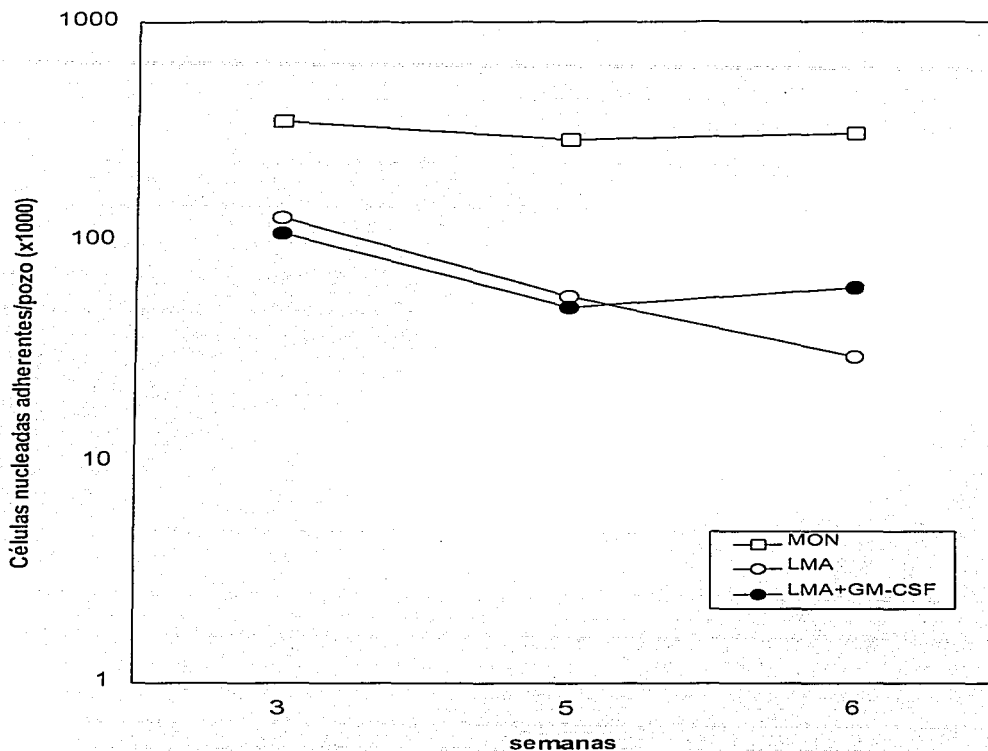
**3. Efecto del rhGM-CSF en la proliferación de células hematopoyéticas en LTBMC.** La adición de rhGM-CSF a los LTBMC de LMA resultó en un incremento significativo en el número de células no adherentes a lo largo de las diferentes semanas de cultivo. Este incremento fue de 1.3 a 4.3 veces de los valores obtenidos en los cultivos en ausencia de este factor. Sin embargo, durante las distintas semanas de cultivo no se observaron diferencias significativas en el número celular obtenido de los LTBMC de pacientes en presencia de GM-CSF y aquellos de donadores sanos.

Además de incrementar el número de células hematopoyéticas en LTBMC de pacientes con LMA, el GM-CSF modificó los tipos de células originadas en cultivo. Así, en los cultivos en ausencia de este factor, se observó una disminución en el número de blastos (de 51% a la semana 3 a 23% a la semana 5)





**FIGURA 7. Cinética de proliferación de células no adherentes en LTBMC.** Los valores corresponden a las medianas obtenidas de los cultivos de donadores normales (MON; n=10) y pacientes con LMA en presencia y ausencia de GM-CSF (n=14). La curva de células de pacientes con LMA en presencia de GM-CSF es significativamente mayor que aquella en ausencia de este factor, y con respecto a la de donadores normales no existe diferencia significativa.



**FIGURA 8. Cinética de proliferación de células adherentes en LT BMC.** Los valores corresponden a las medianas obtenidas de los cultivos de donadores normales (MON; n=10) y pacientes con LMA en presencia o ausencia de GM-CSF (n=14). La curva de donadores normales es significativamente mayor que aquellas de pacientes. No hay diferencias significativas entre las curvas de pacientes en ausencia o presencia de GM-CSF.

y un incremento en el número de macrófagos (de 29% a la semana 3 a 53% a la semana 5) (Tabla 5), mientras que en presencia de GM-CSF prácticamente se mantuvo el porcentaje de blastos (de 47% y 50% a las 3 y 5 semanas, respectivamente) y además observamos un porcentaje menor de macrófagos con respecto al control a la semana 5 (Tabla 5). Los granulocitos fueron el tipo celular con el menor número obtenido a lo largo de todo el período de cultivo y que no se afectó con la adición del GM-CSF.

Por otra parte en la fracción adherente, no hubo diferencias significativas en el número de células, cuando se compararon los cultivos en ausencia y presencia de GM-CSF (Figura 8).

Estos resultados nos indican que existe una disminución en la producción de células hematopoyéticas en LTBM de pacientes con respecto a donadores normales, sin embargo dicha producción se incrementa con la adición de GM-CSF, misma que favorece la presencia de blastos leucémicos en el cultivo.

**4. Cinética de progenitores hematopoyéticos en LTBM.** Se determinó la cinética de progenitores hematopoyéticos en los cultivos de donadores normales y se observó una continua disminución en los progenitores mieloides y eritroides, sin embargo ambos fueron detectados durante todo el período de cultivo (Tabla 6). Los progenitores mieloides fueron los que se presentaron en mayor número en las diferentes semanas de cultivo. No se detectaron UFC-LMA en ninguno de los cultivos analizados.

En los cultivos de los pacientes con LMA, el número de progenitores mieloides y eritroides fue muy disminuido a lo largo de todas las semanas de cultivo. La detección de progenitores mieloides prácticamente se observó hasta la semana 5, mientras que los eritroides no se detectaron a partir de la semana 4 en ninguno de los pacientes analizados (Tabla 6). En el caso de UFC-LMA, solamente en dos pacientes se observaron al inicio del cultivo (pacientes 5 y 12), sin embargo, dichos progenitores fueron disminuyendo durante las semanas de cultivo y solo se detectaron hasta la tercera semana. En los cultivos de los otros pacientes no hubo detección de progenitores leucémicos a lo largo de las semanas de cultivo.

**TABLA 5. Morfología de las células presentes en la fracción no adherente de los cultivos de pacientes con LMA.**

Semana	Condición	Blastos	Macrófagos	Granulocitos
3	Control	51(27-74)	29(20-52)	15(6-43)
	GM-CSF	47 (19-87)	42(5-81)	9(0-18)
5	Control	23(10-48)	53(39-65)	19(3-50)
	GM-CSF	50(30-71)*	32(21-49)*	14(0-28)

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) de los valores de 6 experimentos y corresponden al porcentaje del número total de células.

\*Diferencia significativa con los cultivos control.

**TABLA 6. Número de progenitores en LTBMK de donadores normales y pacientes con LMA.**

Semana	Progenitor	Normal (n=10)	LMA (n=14)	LMA+GM-CSF (n=14)
0	Mieloide	5400 (2650 - 10550)	75 (0 - 1700)	75 (0 - 1700)
	Eritroide	4700 (2300 - 7125)	50 (0 - 4700)	50 (0 - 4700)
	LMA	0	0 (0 - 1600)	0 (0 - 1600)
1	Mieloide	2836 (1209 - 6100)	34 (0 - 262)	0 (0 - 50)
	Eritroide	2131 (696 - 5177)	0 (0 - 48)	0 (0 - 94)
	LMA	0	0 (0 - 39)	20 (0 - 175)
2	Mieloide	902 (449 - 3792)	13 (0 - 68)	0
	Eritroide	415 (196 - 911)	0 (0 - 14)	0 (0 - 17)
	LMA	0	0 (0 - 9)	17 (0 - 88)
3*	Mieloide	1132 (204 - 3506)	8 (0 - 32)	0 (0 - 4)
	Eritroide	147 (21 - 527)	0 (0 - 5)	0 (0 - 12)
	LMA	0	0 (0 - 1)	6 (0 - 38)
4	Mieloide	322 (47 - 966)	4 (0 - 12)	0 (0 - 6)
	Eritroide	29 (0 - 116)	0	0
	LMA	0	0	5 (0 - 48)
5*	Mieloide	317 (50 - 1368)	4 (0 - 18)	0 (0 - 7)
	Eritroide	8 (0 - 156)	0	0
	LMA	0	0	7 (0 - 18)
6*	Mieloide	36 (10 - 108)	0 (0 - 6)	0
	Eritroide	5 (0 - 16)	0	0
	LMA	0	0	11 (0 - 24)

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) de los valores del número indicado de muestras de médula ósea.

\*En las semanas 3, 5 y 6 el número de células progenitoras incluyen tanto las fracciones adherentes como no adherentes.

**5. Efecto del GM-CSF en la cinética de progenitores hematopoyéticos en LT BMC.** La adición del GM-CSF a los cultivos provenientes de pacientes con LMA, disminuyó el número de progenitores mieloides y eritroides a lo largo del cultivo; los primeros no se detectaron después de la semana 5, mientras que los últimos después de la tercera semana. Por su parte, la adición de GM-CSF indujo un incremento en la detección de UFC-LMA, dado que como hemos mencionado al inicio solo se detectaron progenitores leucémicos en los cultivos de dos pacientes, mientras que de la semana 1 a la 5, estos progenitores se detectaron en 10 de los 14 pacientes. A la sexta semana de cultivo solamente se evaluaron los cultivos de tres pacientes, de los cuales en dos de ellos se detectaron progenitores leucémicos (pacientes 6 y 11).

Estos resultados nos indican que el GM-CSF favorece el crecimiento de progenitores leucémicos en LT BMC de pacientes con LMA.

## 6. Discusión

La LMA es una enfermedad que se caracteriza por la presencia de alteraciones en los mecanismos que regulan la proliferación y diferenciación de las células de linaje mielóide, y se origina a partir de anormalidades genéticas en las células primitivas hematopoyéticas localizadas en la médula ósea (Fialkow et al, 1981; Rowley, 1998). El estudio in vitro de la biología de la LMA ha sido de gran importancia no solamente en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad, sino también en el desarrollo de estrategias terapéuticas para un mejor tratamiento de estos pacientes.

Uno de los sistemas que se ha utilizado ampliamente en este sentido, ha sido el LTBMCM también denominado cultivo tipo Dexter, el cual permite el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas en presencia de una capa de células estromales que asemejan el microambiente hematopoyético de médula ósea (Dexter et al, 1977). Con la utilización de este sistema experimental, se ha contribuido a la caracterización de las células seminales y progenitoras hematopoyéticas de los pacientes (Coulombel et al, 1985; Eaves et al, 1985; Schiro et al, 1990; Mayani, 1996). Asimismo, este sistema ha sido utilizado en la clínica para la purga de células leucémicas in vitro, con fines de trasplante de médula ósea (Chang et al, 1989).

Estudios previos han demostrado que se puede manipular el sistema mediante la adición de factores de crecimiento recombinantes (Mayani et al, 1991), por una parte para conocer la biología del padecimiento en respuesta a dichos factores y además para mejorar la calidad de la purga de las células transformadas. A este respecto un factor importante es el rhGM-CSF, dado que favorece el crecimiento de las células mieloides e incluso se aplica en los pacientes con LMA posterior al tratamiento con quimioterapia, para elevar los niveles leucocitarios. En este trabajo estudiamos el efecto de la adición exógena de rhGM-CSF sobre la proliferación de células hematopoyéticas en LTBMCM, provenientes de pacientes con LMA.

A partir de nuestros resultados hemos observado una disminución en la producción de células nucleadas no adherentes en LTBMCM de estos pacientes, dado que durante las semanas 3, 4 y 5 de cultivo el número de células

hematopoyéticas se mantuvo en niveles muy por debajo de los normales, alcanzando con el máximo número obtenido tan solo el 31.6% de los valores normales (día 35). La adición del rhGM-CSF incrementó este valor a 85.2%, esto indica que la presencia de este factor induce la proliferación de células hematopoyéticas en LTBM de pacientes con LMA. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos, en los cuales el rhGM-CSF se adicionó a LTBM de sujetos normales (Charbord et al, 1991) y de pacientes con anemia aplásica (Martínez-Jaramillo et al, 1999) y se observó un incremento en el número de células nucleadas.

Otro aspecto interesante que observamos se relaciona con la morfología de las células presentes en los cultivos. En el caso de los cultivos en ausencia de dicho factor, se observó una disminución en la proporción de células blásticas, mientras que los macrófagos se incrementaron en proporción; ambos resultados están de acuerdo con trabajos previos (Coulumbel et al, 1985; Mayani et al, 1991). Por su parte, con la adición de rhGM-CSF, la proporción de blastos leucémicos se mantuvo a través de todo el periodo de cultivo, lo cual indica que esta citocina es capaz de estimular el crecimiento de las células leucémicas en este sistema experimental. Este efecto es opuesto al observado en los cultivos de LMA en presencia de M-CSF, en los cuales se observó una inhibición marcada en el crecimiento de las células blásticas con la consecuente generación de macrófagos morfológicamente maduros (Mayani et al, 1991).

En el caso de las células progenitoras, observamos una disminución en el número de progenitores mieloides, eritroides y multipotenciales en las células nucleadas de médula ósea de pacientes con LMA, en comparación con los donadores normales, dado que tan solo se obtuvo el 1.22% de CFC del número observado en estos últimos. Lo anterior indica severas alteraciones cuantitativas en el compartimento de progenitores hematopoyéticos normales en la médula ósea de estos pacientes. Por su parte los progenitores leucémicos solo se detectaron en 2 de 14 pacientes. Ambas observaciones coinciden con resultados previos (Mayani et al, 1991). Sin embargo, a lo largo de las seis semanas de cultivo no se detectaron incrementos en el número de progenitores mieloides y eritroides, lo cual se contrapone a estudios previos en los cuales se encontraron



incrementos en la semana 3 y 4 de cultivo (Coulombel et al, 1985; Mayani et al, 1991). Lo anterior indica que probablemente sea una característica propia de algunos pacientes con LMA, en donde se presente la reaparición de progenitores normales en LTBM. sin embargo a la fecha no se conoce con precisión el motivo.

Con la adición del rhGM-CSF observamos una disminución en el número de progenitores normales a lo largo del cultivo en comparación con aquellos en ausencia de factor. Estos resultados se contraponen con los obtenidos previamente en relación al incremento en el número de células nucleadas por efecto del factor, sin embargo una posibilidad es que el rhGM-CSF estimule la diferenciación de las CFC provocando su disminución y en consecuencia la generación de células monocíticas/macrofágicas y granulocíticas, lo cual en el cultivo se traduciría en un incremento de las células nucleadas. Este efecto del rhGM-CSF se contrapone al observado con rhM-CSF en trabajos previos, dado que este factor fue capaz de inducir la proliferación de CFC normales en varios LTBM provenientes de pacientes con LMA (Mayani et al, 1991).

Un aspecto importante en este estudio, es que la adición de rhGM-CSF a los LTBM, estimuló el crecimiento de las UFC-LMA, dado que al inicio del cultivo se detectaron este tipo de progenitores solamente en 2 pacientes, mientras que en presencia de este factor, desde la primera semana y hasta la quinta, se observaron en 10 de los 14 pacientes analizados. En los cultivos en ausencia de este factor dichos progenitores se observaron durante las primeras 3 semanas y posteriormente ya no se detectaron. La detección de UFC-LMA en los cultivos con rhGM-CSF, correlaciona con la presencia de un porcentaje elevado de blastos en la fracción no-adherente de los mismos, durante las semanas 3 y 5 de cultivo. Por el contrario la adición de rhM-CSF a los LTBM de pacientes con LMA, resultó en la desaparición de las UFC-LMA en estos cultivos (Mayani et al, 1991), lo cual indica la diferencia en el efecto de ambas citocinas a pesar de ser estimuladoras del linaje monocito/macrófago.

Varios grupos de investigación han demostrado que el rhGM-CSF es capaz de estimular el crecimiento de las células leucémicas, tanto en ensayos clonogénicos en medio semisólido, como en cultivos en suspensión (Miyachi et

al, 1988; Oster et al, 1989; Carlo-Stella et al, 1990; Ikeda et al, 1993; Maze et al, 1993). En estos últimos se ha observado que la combinación de citocinas recombinantes, en donde se incluye el rhGM-CSF, favorece el crecimiento de los blastos transformados (Johnsen et al, 1993). Con el presente estudio se demostró que el rhGM-CSF es capaz de estimular el crecimiento no solo de los blastos con un mayor grado de maduración, sino también de los progenitores leucémicos en LT BMC. Tomando en consideración estos trabajos, podemos decir que el rhGM-CSF es capaz de estimular el crecimiento de las células leucémicas de pacientes con LMA, bajo condiciones *in vitro*.

Uno de los aspectos relevantes que se pueden relacionar a nivel clínico con estos resultados, es que si bien la aplicación del rhGM-CSF recupera los niveles celulares de monocitos/macrófagos y granulocitos en pacientes que han sido inmunodeprimidos por efecto de quimioterapia (Estey, 1994; Hurtado et al, 1995), se debe tomar en cuenta que puede ser contraproducente dicha aplicación, dado su posible efecto estimulador sobre los blastos leucémicos que permanecen como enfermedad mínima residual en el paciente y que podría significar la reaparición de la enfermedad.

Algunos datos indican que el uso del rhGM-CSF no se debe generalizar en todos los pacientes de LMA y su aplicación debe estar condicionada a su evaluación de riesgo/beneficio en cada caso (Estey, 1994). Para esto último puede ser relevante el uso de LT BMC, dado que se podrían evaluar bajo condiciones *in vitro*, la respuesta de las células leucémicas a la quimioterapia y la consecuente adición de citocinas que se pudieran utilizar para la recuperación de las células normales y con ello encontrar el tratamiento más adecuado para dichos pacientes.

En conclusión, hemos demostrado que la adición de rhGM-CSF a LT BMC de pacientes con LMA, da por resultado la estimulación del crecimiento de los progenitores leucémicos (UFC-LMA) y células blásticas bajo condiciones *in vitro*.

Estos resultados sugieren que el uso del rhGM-CSF en los tratamientos clínicos, debe ser considerado con precaución dado que podría inducir la reaparición de la enfermedad.

## VII.2 Efecto de diferentes citocinas sobre la proliferación y expansión de subpoblaciones enriquecidas en células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con LMA en cultivos en suspensión.

### 7. Subpoblación I

#### 7.1 Cultivos empleando medio para LTBMCM

a) Características de la población obtenida por selección negativa. Se obtuvieron células mononucleares de las muestras de MO de donadores normales y de los pacientes cuyas características se enlistan en la Tabla 7. El número de células obtenidas varió entre los donadores normales de  $18.1 \times 10^6$  a  $41.6 \times 10^6$ , mientras que entre los pacientes fue de  $6.6 \times 10^6$  a  $138 \times 10^6$ . Estas células se pasaron a través de una columna inmunomagnética de separación para enriquecer en células CD34+ lin- (Subpoblación I) y se recuperó una mediana de 4.8% de las células iniciales en los donadores normales, y de 30.3% en los pacientes (Tabla 8).

Analizamos el porcentaje de células CD34+ antes y después de la separación por columna y observamos que en los donadores normales se obtuvo una mediana de 0.8% antes de la columna y de 18.2% después de la columna, lo cual indica un enriquecimiento de 22.7 veces en la población CD34+ lin- (Tabla 9).

Por su parte, en las células de los pacientes se observó algo muy interesante, dado que los valores de CD34 antes de la columna fueron muy opuestos entre los pacientes analizados (tres pacientes; Tabla 9), dado que en 2 de ellos no detectamos células CD34+, mientras que en el otro, el valor fue de 77%. Después de pasar las células por columna se evaluaron 8 pacientes, sin embargo al analizar los valores obtenidos en los tres pacientes que evaluamos previamente, dichos valores fueron similares a aquellos obtenidos antes de la separación (0%-78%), por lo que no detectamos enriquecimiento (Tabla 9).

Debido a lo anterior, podemos decir que al analizar a la subpoblación I, encontramos que no todos los pacientes de LMA expresan el antígeno CD34.

**TABLA 7. Características de los pacientes incluidos en esta parte del estudio.**

Paciente	Edad/Sexo	Subtipo	Hb	Plaquetas X10 <sup>3</sup>	Leucocitos X10 <sup>3</sup>	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)
1	40/M	LMA-M0	10.2	33	40	13	65
2	27/M	LMA-M2	5.4	92	25	37	50
3	21/F	LMA-M2	6.2	78	4.2	10	35
4	51/M	LMA-M2	13.3	6	37.9	35	78
5	18/M	LMA-M2	11.4	36	3	14	80
6	25/F	LMA-M3	8.1	17	6.1	12	34
7	43/F	LMA-M4	8.0	29	45.6	28	95
8	21/F	LMA-M4	7.4	45	61	26	64
9	17/M	LMA-M4	12	18	21	5	68
10	23/F	LMA-4	7.2	32	27	14	59
11	19/F	LMA-4	9.4	25	33	16	84
12	32/M	LMA-4	8.6	37	26	31	92

M, masculino; F, femenino; Hb, hemoglobina; SP, sangre periférica; MO, médula ósea.

**TABLA 8. Porcentaje de recuperación de células lin- después de la separación por columna.**

Donador	Recuperación (%)
Normal (n=5)	4.8 (3.04 - 5.8)
LMA (n=12)	30.3 (2.1 - 74.2)*

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras.

\*Diferencia significativa con los valores de donadores normales.

**TABLA 9. Enriquecimiento de progenitores hematopoyéticos de médula ósea de donadores normales y pacientes con LMA.**

	Células CD34+ (%)		Células Formadoras de Colonias (%)	
	Pre-columna	Post-columna	Pre-columna	Post-columna
Normal	0.8 (0.3 - 1.2) (n=4)	18.2 (8 - 21.5)* (n=4)	0.4 (0.3 - 0.5) (n=5)	4.9 (4.4 - 13.8)* (n=5)
LMA	0 (0 - 77) (n=3)	0 (0 - 78) (n=3)	0.004 (0 - 0.01) (n=12)	0.015 (0.005 - 0.1)* (n=12)

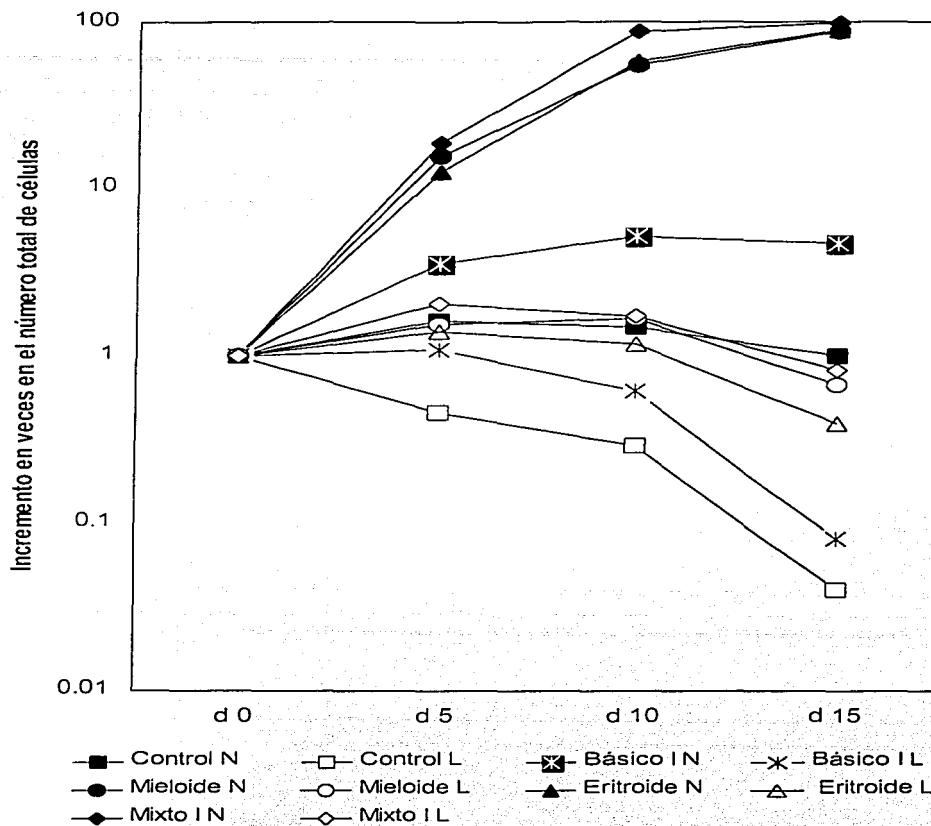
Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras y corresponden al porcentaje de células CD34+ y células formadoras de colonias antes (pre-columna) y después (post-columna) de la selección negativa.

\*Diferencia significativa con respecto a los valores pre-columna.

Con respecto al porcentaje de CFC, en la población antes de la columna de los donadores normales detectamos una mediana de 0.4% de CFC, mientras que después de la columna, la mediana fue de 4.9%, lo cual indica un enriquecimiento de 12.2 veces; mientras que en los pacientes antes de la columna la mediana fue de 0.004% y después de la columna fue de 0.015%, por lo tanto el enriquecimiento fue de 3.7 veces (Tabla 9). Cabe señalar que en los tres pacientes analizados por inmunocitoquímica, el enriquecimiento fue de 3.4 veces, similar al obtenido al analizar a los 12 pacientes (Tabla 9). Estos resultados nos indican que el procedimiento de separación utilizado es adecuado para enriquecer progenitores hematopoyéticos.

**b) Cinética de proliferación.** Para puntualizar el concepto de proliferación, se puede definir como la producción de células a partir de una población celular en particular sin importar el tipo de células que se estén produciendo (Figura 2). Así, se evaluó la actividad proliferativa de las siguientes combinaciones de citocinas sobre las subpoblaciones obtenidas: SCF+IL-6 (coctel básico I, favorecen la viabilidad de células primitivas); SCF+IL-6+GM-CSF+G-CSF (coctel mieloide, favorecen el crecimiento de células de linaje mieloide); SCF+IL-6+EPO+IL-3 (coctel eritroide, favorecen el crecimiento de células de linaje eritroide); y coctel mixto I (todas las citocinas). Además se evaluó un cultivo libre de citocinas como control. Decidimos utilizar estos cocteles, dado que, en trabajos previos realizados en el laboratorio, observamos una adecuada proliferación de células progenitoras hematopoyéticas normales provenientes de cordón umbilical (Flores-Guzmán et al, 2002).

En el caso de las células provenientes de donadores normales, observamos un incremento en el número de células totales de 1.6 veces en ausencia de citocinas al día 5 de cultivo y posteriormente estos valores disminuyeron a 1.4 y 1.1 veces a los días 10 y 15 respectivamente (Figura 9). Con el coctel básico se alcanzó un incremento de 5.2 y 4.6 veces a los días 10 y 15. Con los cocteles mieloide, eritroide y mixto I, hubo un incremento continuo durante los diferentes días de cultivo y se alcanzaron valores significantes de 87.1, 89.6 y 98.8 veces respectivamente al día 15.



**FIGURA 9. Cinética de proliferación de la subpoblación I enriquecida de células progenitoras.** Los valores corresponden a las medianas obtenidas de los cultivos de donadores normales (n=5) y pacientes con LMA (n=12). N, donador normal; L, LMA. Los valores de los cultivos de donadores normales fueron significativamente mayores que los correspondientes de pacientes.



En los cultivos provenientes de los pacientes, en ausencia de citocinas observamos una disminución constante en el número de células totales, hasta llegar a un valor de 4% del número inicial al día 15 de cultivo.

Con el coctel básico I se mantuvo el número celular al día 5 (1.08 veces) y posteriormente disminuyó a 8% del valor inicial al día 15. Con los cocteles mieloide, eritroide y mixto I, se observó un incremento constante hasta el día 10, en donde se alcanzaron valores de 1.6, 1.1 y 1.7 veces respectivamente; mientras que al día 15 de cultivo, en los tres cocteles los valores se observaron por abajo del número inicial (Figura 9). Al analizar a los pacientes por subtipo, no se observaron grandes diferencias con respecto a la evaluación en grupo, dado que los máximos incrementos se obtuvieron con el coctel mixto I y fueron los siguientes: LMA-M0, 2.1 veces (día 10); LMA-M2, 3.2 veces (día 5); LMA-M3, 0.8 veces (día 10); y LMA-M4, 1.3 veces (día 10). Los valores obtenidos en los cultivos de los pacientes con los cocteles evaluados, fueron significativamente menores a aquellos de donadores normales.

Los resultados anteriores señalan una disminución bastante pronunciada en la proliferación de las subpoblaciones obtenidas por selección negativa de los pacientes con LMA, con respecto a las células de los donadores normales.

Para descartar la posibilidad de que existan diferencias en la capacidad proliferativa entre las subpoblaciones de donadores sanos y pacientes, debido a los diferentes porcentajes de células CD34+, analizamos a los pacientes de LMA dependiendo de dicho porcentaje y los clasificamos en dos grupos: a) aquellos que expresaron menos del 10% de células CD34 (0% a 5%) y b) aquellos que expresaron más del 10% de células CD34 (52% a 78%).

En los dos grupos señalados, en ausencia de citocinas se obtuvieron valores menores que el número inicial durante todo el periodo de cultivo. Con el coctel básico I, en ambos grupos se incrementó el número celular a 1.1 y 1.3 veces al día 5 de cultivo respectivamente, sin embargo en los días posteriores hubo una disminución con respecto al número inicial. Con los cocteles mieloide, eritroide y mixto I, no hubo diferencias significativas en los valores obtenidos de células totales entre ambos grupos durante todo el periodo de cultivo; el máximo valor obtenido fue una mediana de 3.5 veces con el coctel mixto I al día 10, en

aquellos que expresaron menos del 10% de células CD34+, mientras que en aquellos con más del 10% el máximo valor fue de 3.2 veces con el mismo coctel (día 10). Ambos valores son mayores a la mediana obtenida con todos los pacientes y con el mismo coctel (1.7 veces). Sin embargo, en cualquier caso los valores están muy disminuidos en relación con aquellos obtenidos con las células de donadores normales, en donde con el mismo coctel y al mismo día de cultivo se obtuvo un incremento de 87.5 veces.

c) **Expansión de progenitores hematopoyéticos.** El término expansión indica la producción de más células que retienen ciertas características de la población celular inicial (Figura 2). En el presente estudio analizamos la expansión de la población enriquecida de células CD34+ lin- proveniente de donadores sanos a través de su capacidad para generar CFC después de 10 y 15 días de cultivo, y la comparamos con la subpoblación I de los pacientes con LMA.

En los cultivos celulares de donadores normales, en ninguna de las condiciones de cultivo observamos expansión. El máximo valor obtenido fue de 0.7 veces con el coctel mieloide al día 15 de cultivo (Tabla 10). En el caso de los pacientes no se detectaron colonias en ocho de ellos desde el día cero (1 LMA-M0, 4 LMA-M2, 1 LMA-M3 y 2 LMA-M4). Debido a lo anterior, únicamente analizamos 4 pacientes en cuyos cultivos observamos la formación de colonias. Así, en ausencia de citocinas y en presencia del coctel básico I no hubo expansión (Tabla 10); sin embargo en presencia de los cocteles mieloide, eritroide y mixto I, hubo una expansión de 3.04, 2.2 y 2.3 veces respectivamente. Es importante señalar que en ninguno de los días de cultivo detectamos la presencia de progenitores leucémicos y solamente observamos progenitores morfológicamente normales.

De igual manera, analizamos la expansión celular de la subpoblación I de los pacientes, tomando en cuenta dos aspectos: a) el subtipo de LMA y b) el porcentaje de células CD34+ (menor o mayor de 10%), ello con el fin de conocer si existe relación entre ambos parámetros y el potencial de expansión. Así, analizamos la expansión de las células de un paciente del subtipo LMA-M2 y observamos que en ausencia de citocinas y en presencia del coctel básico I no hubo expansión, mientras que en presencia de los cocteles mieloide, eritroide y

mixto I, obtuvimos incrementos de 5.4, 8.5 y 6.5 veces, respectivamente (Tabla 10). Por su parte, en 2 pacientes del subtipo LMA-M4 en ninguna de las condiciones analizadas observamos expansión, sin embargo es importante señalar que en un tercer paciente de este subtipo se obtuvieron incrementos de 6.4, 3.8 y 3.9 veces con los cocteles mieloide, eritroide y mixto I al día 10 de cultivo (valores máximos; Tabla 10).

Por otra parte, un aspecto importante que observamos, es que en aquellos pacientes que expresaron menos del 10% de células CD34+, en ninguno de los cocteles hubo expansión, mientras que en aquellos con más del 10%, hubo expansión en todos los cocteles analizados al día 10 de cultivo, excepto en ausencia de citocinas (Tabla 10). El máximo valor obtenido fue con el coctel eritroide en donde el incremento fue de 6.1 veces.

Estos resultados indican que las células progenitoras que dan lugar a la formación de colonias morfológicamente normales, de algunos pacientes con LMA, poseen un mayor potencial de expansión que aquellas provenientes de donadores sanos, bajo estas condiciones de cultivo. Además, dicho potencial se observa solamente en los pacientes con más del 10% de células CD34+, lo cual podría indicar que la expresión del antígeno correlaciona con la presencia de un mayor número de progenitores normales, dado que en los donadores sanos dichos valores también fueron superiores al 10%.

**TABLA 10. Expansión de CFC en cultivos en suspensión de la población enriquecida con células progenitoras provenientes de donadores normales y pacientes con LMA.**

Donador	Control	Básico I	Mieloide	Eritroide	Mixto I
Normal (n=5)	0.004 (0 - 0.03)	0.03 (0 - 0.07)	0.7 (0 - 1.9)	0.4 (0 - 0.5)	0.5 (0 - 1.1)
LMA (n=4)	0 (0 - 0.3)	0.2 (0 - 1.8)	3.04 (0 - 6.4)	2.2 (0 - 8.5)	2.3 (0 - 6.5)
LMA-M2 (n=1)	0	0.3	5.4	8.5	6.5
LMA-M4 (n=3)	0 (0 - 0.3)	0.1 (0 - 1.8)	0.6 (0 - 6.4)	0.7 (0 - 3.8)	0.7 (0 - 3.9)
LMA (n=2) (<10%)	0	0.07 (0 - 0.1)	0.3 (0 - 0.6)	0.3 (0 - 0.7)	0.3 (0 - 0.7)
LMA (n=2) (>10%)	0.15 (0 - 0.3)	1.09 (0.3 - 1.8)	5.9 (5.4 - 6.4)	6.1 (3.8 - 8.5)	5.2 (3.9 - 6.5)

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras y corresponden al máximo incremento en veces en el número de CFC (comparado con el día 0) obtenido en los donadores normales al día 15 y en los pacientes al día 10. El número inicial de CFC al día 0 es 1. Pacientes <10% de CD34+ (2 LMA-M4) y >10% de CD34+ (LMA-M2 y LMA-M4). Como podemos observar solamente en aquellos pacientes con más del 10% de CD34+, se detectan incrementos en la expansión de CFC.

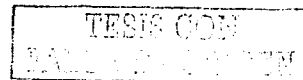
## 7.2 Cultivo empleando medio de expansión más FL y TPO.

### a) Características de las células obtenidas por selección negativa.

Debido a que observamos una disminución en la proliferación de las células provenientes de los pacientes con LMA con respecto a aquellas de donadores normales, pensamos que posiblemente en las combinaciones de factores evaluados, era necesaria la adición de dos citocinas que se han definido con la capacidad de inducir la proliferación de células hematopoyéticas primitivas (Wendling, 1999; Nakahata, 2001), y que se sabe los correspondientes receptores están presentes en las células leucémicas (Wendling y Vainchenker, 1998; Naoe et al, 2001), ello con la finalidad de mejorar las condiciones para su proliferación. Estas citocinas fueron: trombopoyetina (TPO) y FLT-3L (FL). Además, adicionamos una segunda variable para mejorar dichas condiciones, por lo que utilizamos un medio de cultivo de características especiales para expansión celular y que no contiene suero (Stem Span, Stem Cell Technologies; ver metodología). Las características clínicas de los pacientes incluidos en esta fase del estudio se presentan en la tabla 11.

De igual manera que en la sección anterior, se determinaron los porcentajes de recuperación después de la separación por columna, en las células de los donadores normales y pacientes (Tabla 12). Se observaron valores similares a los obtenidos previamente (Tabla 8); una mediana de 3.3% en los normales y de 49.1% en los pacientes (Tabla 12).

Asimismo, se determinaron los porcentajes de células CD34+ y de CFC de las poblaciones enriquecidas (Tabla 13). En el caso del porcentaje de células CD34+ (posterior a la columna) en los donadores normales, se obtuvo un enriquecimiento de 23.4 veces, mientras que en CFC fue de 18.2 veces. En los pacientes el enriquecimiento de células CD34 después de la columna fue de 2.2 veces y el de CFC fue de 4.7 veces. Los valores obtenidos en el enriquecimiento de células CD34+ y de CFC fueron similares a aquellos previamente determinados para los donadores normales (Tabla 9; 22.7 y 12.2 veces, respectivamente). En el caso de los pacientes, observamos enriquecimiento de células CD34+ a diferencia de la sección anterior (Tabla 9); no obstante el valor de CFC fue similar al obtenido previamente (Tabla 9; 3.7 veces).



**TABLA 11. Características de los pacientes incluidos en esta parte del estudio.**

Paciente	Edad/Sexo	Subtipo	Hb	Plaquetas X10 <sup>3</sup>	Leucocitos X10 <sup>3</sup>	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)
1	34/F	LMA-M2	11.3	38	33	12	70
2	23/M	LMA-M2	6.4	76	8.2	7	78
3	29/F	LMA-M3	5.4	55	19.7	13	49
4	45/F	LMA-M3	12.2	49	33.4	23	56
5	24/F	LMA-M4	10.8	22	7.4	19	83
6	28/F	LMA-M4	9.6	37	51.1	15	67
7	32/M	LMA-M4	11.5	42	25.3	29	92

M, masculino; F, femenino; Hb, hemoglobina; SP, sangre periférica; MO, médula ósea.

**TABLA 12. Porcentaje de recuperación de células lin- después de la separación por columna.**

Donador	Recuperación (%)
Normal (n=5)	3.3 (2.8 - 5.1)
LMA (n=7)	49.1 (2.7 - 62.4)*

Los valores representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado muestras.

\*Diferencia significativa con respecto a los valores de donadores normales.

**TABLA 13. Enriquecimiento de progenitores hematopoyéticos de médula ósea de donadores normales y pacientes con LMA.**

	Células CD34+ (%)		Células Formadoras de Colonias (%)	
	Pre-columna	Post-columna	Pre-columna	Post-columna
Normal (n=5)	0.9 (0.6 - 1.2)	21.1* (8.0 - 41.3)	0.45 (0.05 - 0.9)	8.2* (3.8 - 11.6)
LMA (n=7)	16 (0 - 37)	36* (0 - 63)	0.008 (0 - 0.01)	0.038* (0.01 - 1.4)

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras y corresponden al porcentaje de células CD34+ y CFC antes (pre-columna) y después (post-columna) de la selección negativa.

\*Diferencia significativa con respecto a los valores pre-columna.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS NO CAL  
DE LA BIBLIOTECA



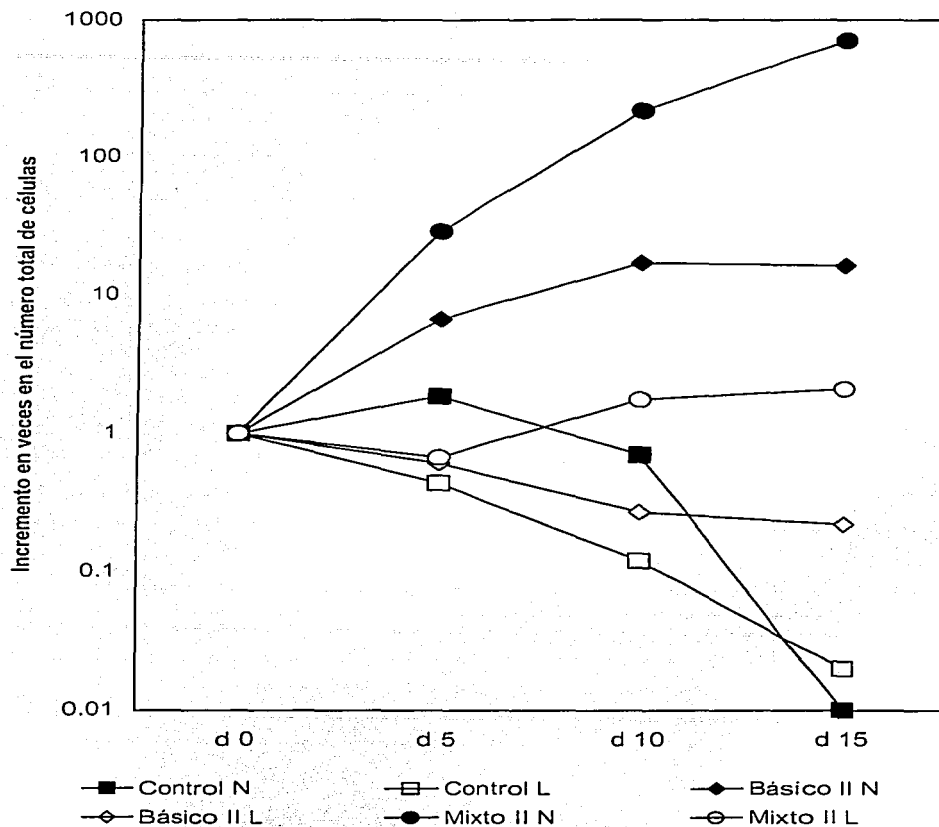
b) **Cinética de proliferación.** Con la adición de TPO y FL a los cocteles analizados y la utilización del medio de expansión, evaluamos las siguientes condiciones de cultivo: a) control (ausencia de citocinas); b) SCF+IL-6+TPO+FL (coctel básico II) y c) SCF+IL-6+GM-CSF+G-CSF+TPO+FL (coctel mixto II).

En los cultivos provenientes de donadores normales, observamos un incremento en el número de células totales de 1.8 veces en ausencia de citocinas al día 5 y posteriormente estos valores disminuyeron a 0.7 y 0.01 a los días 10 y 15 respectivamente (Figura 10). Con el coctel básico II se alcanzó un incremento de 17.1 veces al día 10 de cultivo, superior a los 5.2 veces obtenido en ausencia de las dos citocinas mencionadas. Con el coctel mixto II hubo un incremento continuo durante los diferentes días de cultivo y se alcanzaron valores de 29, 217 y 707 a los días 5, 10 y 15. Estos valores son significativamente superiores a los obtenidos previamente con el coctel mixto I a los días señalados, en donde el máximo valor obtenido fue de 98.8 veces al día 15 (Figura 9).

A pesar de que las condiciones de cultivo fueron más adecuadas para la proliferación de las poblaciones celulares normales, en el caso de las células provenientes de los pacientes, dichas condiciones no fueron suficientes para incrementar su proliferación.

Así, en los cultivos celulares de los pacientes, en ausencia de citocinas observamos una disminución constante en el número de células totales hasta alcanzar solo el 2% del número inicial al día 15 de cultivo (Figura 10). Con el coctel básico II no hubo incremento en la proliferación en ninguno de los días analizados y el máximo valor fue de 0.61 veces al día 5. Con el coctel mixto II, el máximo valor observado fue de 2.08 veces al día 15; dicho valor fue muy similar al máximo obtenido previamente con el coctel mixto I (2.02 veces, día 5).

Al analizar la proliferación por subtipo de LMA, encontramos que en los cultivos de dos pacientes con LMA-M2, solamente se obtuvieron incrementos con el coctel mixto II de 2.1, 1.8 y 2.1 veces a los días 5, 10 y 15 respectivamente.



**FIGURA 10. Cinética de proliferación de la subpoblación I enriquecida de células progenitoras.** Los valores corresponden a las medianas obtenidas de los cultivos de donadores normales (n=5) y pacientes con LMA (n=7). N, normal; L, LMA. Los valores de los cultivos de donadores normales fueron significativamente mayores que los correspondientes de pacientes.

Con el subtipo LMA-M3 (dos pacientes), sucedió algo similar, dado que solo se obtuvieron incrementos con el coctel mixto II de 1.3, 1.6 y 1.07 veces (días 5, 10 y 15 respectivamente). En tres pacientes de la variedad LMA-M4 no se observaron incrementos en ninguna de las condiciones analizadas.

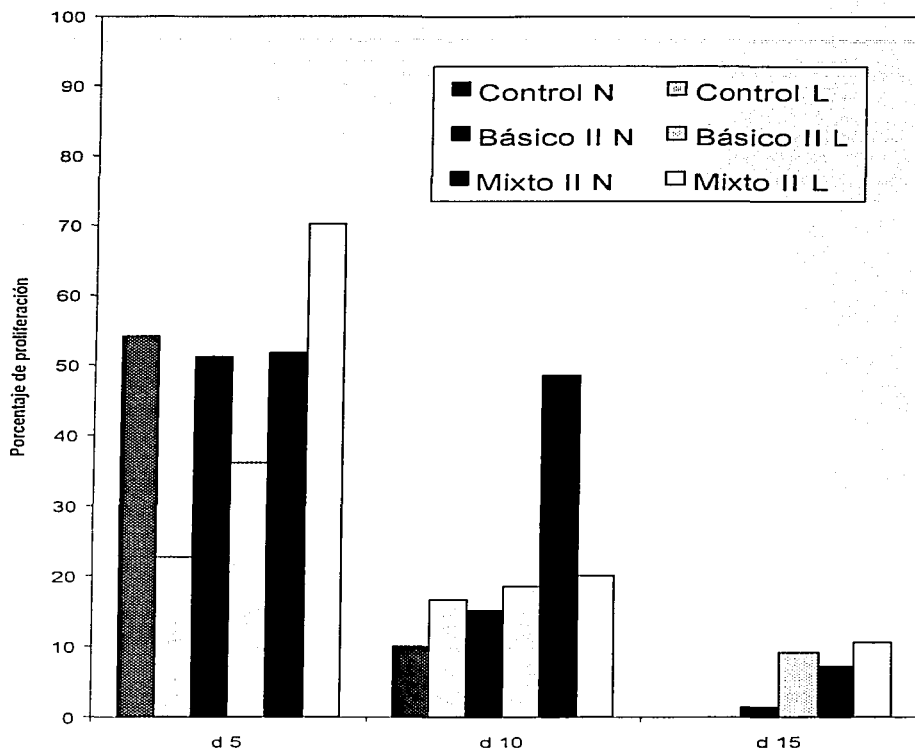
Por otra parte, en aquellos pacientes (1 LMA-M2 y 2 LMA-M3) con menos del 10% de células CD34+ (0% a 4%), solamente observamos incrementos de 1.9 y 2.1 veces con el coctel mixto II (días 10 y 15 respectivamente). Asimismo, en los pacientes (1 LMA-M2 y 3 LMA-M4) con más del 10% de CD34+ (36% a 63%), solamente se obtuvieron incrementos de 2.09, 1.1 y 1.2 veces con el coctel mixto II (días 5, 10 y 15 respectivamente), a diferencia del incremento de 707 veces con el mismo coctel en los cultivos de donadores normales.

Con estos resultados, podemos confirmar que el potencial de proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con LMA, es significativamente menor que el potencial proliferativo de las células progenitoras provenientes de donadores normales.

#### **c) Efecto de TNF- $\alpha$ en la proliferación de células hematopoyéticas.**

Dado que existen evidencias de que TNF- $\alpha$  es un factor que favorece la proliferación de blastos leucémicos (Elbaz et al, 1991b), decidimos evaluar su participación en la proliferación de subpoblaciones primitivas de LMA. Así, al adicionar TNF- $\alpha$  a los diferentes cocteles, se observó una disminución significativa en la proliferación tanto en las células de donadores normales, como en aquellas de los pacientes.

En los cultivos celulares de donadores normales, en ausencia de citocinas obtuvimos el 54% y 10% del número celular obtenido en ausencia de TNF- $\alpha$  (día 5 y 10 respectivamente); al día 15 no detectamos células (Figura 11). Con el coctel básico II se obtuvo una disminución constante en el número celular y los valores fueron de 51.1%, 15.08% y 1.4% de los obtenidos con los cultivos en ausencia de TNF- $\alpha$  (días 5, 10 y 15 respectivamente). Por su parte con el coctel mixto II en presencia de TNF- $\alpha$ , se obtuvo el 51.7%, 48.5% y 7% (días 5, 10 y 15 respectivamente) de los valores obtenidos en ausencia de este factor.



**FIGURA 11. Proliferación de la subpoblación I enriquecida de células progenitoras en presencia de  $TNF-\alpha$ .** Los números corresponden al porcentaje de los valores obtenidos en los cultivos en ausencia de  $TNF-\alpha$  (100%), de donadores normales (n=5) y de pacientes con LMA (n=7) en presencia de este factor. En todos los casos en presencia de  $TNF-\alpha$ , los valores son significativamente inferiores que en ausencia del factor.

De igual manera, en el caso de los cultivos celulares de los pacientes, en presencia de TNF- $\alpha$  y en ausencia de citocinas, obtuvimos el 22.7% y 16.6% (días 5 y 10); al día 15 no observamos células (Figura 11).

Con el coctel básico II, obtuvimos el 36.06%, 18.5% y 9.09% (días 5, 10 y 15 respectivamente); mientras que con el coctel mixto II se obtuvo el 70.1%, 20% y 10.5% (días 5, 10 y 15 respectivamente) de los valores obtenidos en los cultivos en ausencia de este factor. Estos resultados nos indican que las células progenitoras hematopoyéticas de pacientes y de donadores normales son sensibles al efecto inhibitor de TNF- $\alpha$ .

**d) Expansión de progenitores hematopoyéticos.** Con estas nuevas condiciones de cultivo, observamos que en las células de donadores normales en ausencia de citocinas no hubo expansión celular a los días 10 y 15 (0.16 y 0.01 veces, respectivamente; Tabla 14). Sin embargo, con el coctel básico II observamos una expansión de 6 y 2.2 veces a los días 10 y 15 respectivamente; ambos valores son superiores a los obtenidos anteriormente con el coctel básico I, dado que el valor máximo fue de 0.03 veces al día 15 (Tabla 10). Los valores máximos obtenidos en expansión fueron con el coctel mixto II, con una mediana de 26 veces a los días 10 y 15. Este incremento es mayor que el obtenido con el coctel mixto I, en donde el máximo valor fue de 0.5 veces al día 15 (Tabla 10).

En el caso de los pacientes, al igual que en la sección anterior, los analizamos por diferentes grupos: pacientes totales, pacientes por subtipo de leucemia y por porcentaje de células CD34+ (<10% y >10%).

Al analizar a los pacientes totales, no observamos expansión en los tres cocteles evaluados en los diferentes días de cultivo; el valor máximo fue de 0.4 veces con el coctel básico II (Tabla 14). Cuando se analizaron dependiendo del subtipo de leucemia, observamos que en aquellos con LMA-M3, no hubo expansión en ninguno de los cocteles, mientras que en aquellos con los subtipos LMA-M2 y LMA-M4, se observaron incrementos de 3.3 y 2.3 veces, con los cocteles mixto II y básico II respectivamente (Tabla 14).

Por su parte al analizar a los pacientes dependiendo del porcentaje de CD34+, en aquellos con menos del 10% no hubo expansión, mientras que en

**TABLA 14. Expansión de Células Formadoras de Colonias en cultivos líquidos de la población enriquecida con células progenitoras hematopoyéticas provenientes de donadores normales y pacientes con LMA.**

Donador	Control	Control +TNF	Básico II	Básico II +TNF	Mixto II	Mixto II +TNF
Normal (n=4)	0.16 (0 - 2.9)	0 (0 - 0.07)	6 (1.7 - 18.2)	0.12 (0 - 1)	26 (6.2 - 61.9)	0.42 (0 - 18.7)
LMA (n=7)	0 (0 - 1.6)	0	0.4 (0 - 8.7)	0 (0 - 0.6)	0.39 (0 - 9.7)	0 (0 - 1.5)
LMA-M2 (n=2)	0	0	1.2 (0 - 2.4)	0	3.3 (0 - 6.7)	0 (0 - 0.1)
LMA-M3 (n=2)	0.8 (0 - 1.6)	0	0.2 (0 - 0.4)	0	0.07 (0 - 0.1)	0
LMA-M4 (n=3)	0 (0 - 1)	0	2.3 (0 - 8.7)	0.4 (0 - 0.6)	1.3 (0.3 - 9.7)	0.1 (0 - 1.5)
LMA (n=3) (<10%)	0 (0 - 1.6)	0	0 (0 - 0.4)	0	0 (0 - 0.1)	0
LMA (n=4) (>10%)	0 (0 - 1)	0	2.4 (0 - 8.7)	0.2 (0 - 0.6)	4 (0.3 - 9.7)	0.08 (0 - 1.5)

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras y corresponden al máximo incremento en veces en el número de CFC obtenido (comparado con el día 0); donadores normales y pacientes al día 10. El número inicial de células al día 0 es 1. Pacientes <10% de CD34+ (1 LMA-M2 y 2 LMA-M3) y >10% de CD34+ (1 LMA-M2 y 3 LMA-M4).

aquellos con más del 10%, se obtuvieron incrementos de 2.4 y 4 veces, con los cocteles básico II y mixto II, respectivamente (Tabla 14). Estos valores fueron similares a los obtenidos anteriormente con los cocteles básico I y mixto I (1.09 y 5.22 veces respectivamente), en aquellos con más del 10% de células CD34.

Por su parte, no hubo expansión en aquellos con menos del 10%, al igual que en los cocteles analizados anteriormente.

Estos resultados nos confirman que existen diferencias entre los progenitores hematopoyéticos morfológicamente normales de pacientes con LMA y aquellos provenientes de donadores sanos, sin embargo a diferencia de los cocteles anteriores, en ausencia de suero y en presencia de TPO y FL, los progenitores de donadores sanos presentan un mayor potencial de expansión que aquellos de pacientes con LMA.

**e) Efecto del TNF- $\alpha$  en la expansión de progenitores hematopoyéticos.**

Al adicionar TNF- $\alpha$  a los cocteles, observamos que tanto en el caso de los donadores normales como en los pacientes, hubo una disminución en el porcentaje de CFC.

En las células de los donadores normales, en ausencia de citocinas prácticamente no hubo formación de colonias en cultivo. Con el coctel básico II se detectó el 2% del valor obtenido en ausencia del TNF- $\alpha$ , mientras que con el coctel mixto II, se obtuvo tan solo el 1.6% (Tabla 14).

Con respecto a los pacientes, en ninguno de los grupos analizados observamos colonias en cultivo en ausencia de citocinas. Con el coctel básico II, solamente en aquellos grupos de LMA-M4 (3 pacientes) y con más del 10% de células CD34+ (4 pacientes; 1 LMA-M2 y 3 LMA-M4), se obtuvieron valores de 19.5% y 9.5% respectivamente, de los correspondientes en ausencia del factor (día 10). Algo similar sucedió con el coctel mixto II, en donde en los pacientes con LMA-M4 se obtuvo el 12.03% y en aquellos con más del 10% el 1.99% (día 10). Al día 15 no se obtuvieron colonias en ninguno de los cultivos de los donadores normales ni de los pacientes.

Estos resultados nos indican que TNF- $\alpha$  inhibe la expansión de progenitores hematopoyéticos morfológicamente normales de pacientes con LMA y de donadores sanos.

## 8. Subpoblación II

### *Cultivos empleando medio de expansión más FL y TPO*

a) **Características de las células obtenidas por selección negativa.** Con la finalidad de determinar las características de una población de células más primitivas que la subpoblación I, decidimos utilizar una población obtenida mediante un proceso de separación inmunomagnética para enriquecer en células CD34+ CD38- lin- (Subpoblación II) y evaluar sus potenciales de proliferación y expansión en presencia de los cocteles de citocinas previamente analizados (sección 7.2). Las características de los pacientes se enlistan en la Tabla 15.

En el caso de los donadores normales, el número de células mononucleares obtenido fue entre  $25.3 \times 10^6$  a  $60 \times 10^6$ , mientras que en los pacientes fue entre  $64 \times 10^6$  a  $120 \times 10^6$ . Después de pasar las células a través de la columna, obtuvimos de los donadores normales una recuperación del 0.1%, muy por debajo de los valores obtenidos previamente con la subpoblación anterior (3.3% y 4.8%). De igual manera, en el caso de los pacientes obtuvimos un valor muy inferior al obtenido con la subpoblación I (30.3% y 49.1%), dado que la mediana fue de 0.8% (Tabla 16).

Al igual que en la sección anterior, analizamos el porcentaje de células CD34+ antes y después de la separación por columna (Tabla 17), así para los donadores normales se obtuvo el 2.6% antes de la columna y el 70.4% después de la columna, es decir el enriquecimiento fue de 27.09 veces, mayor a los valores obtenidos con la primera subpoblación (23.4 y 22.7 veces).

El porcentaje obtenido de células CD34+ en los pacientes antes de la columna fue de 8%, mientras que después de la columna fue de 60%, es decir un enriquecimiento de 7.5 veces, valor superior al obtenido con la subpoblación I (2.2 veces).

Con respecto al porcentaje de CFC en los donadores normales, en la población antes de la columna, se obtuvo una mediana de 0.9% y posterior a la columna de 3.9% (Tabla 17), lo cual indica un enriquecimiento de 4.3 veces, valor inferior a los obtenidos con la subpoblación enriquecida en células CD34+ lin- (12.2 y 18.2 veces).



**TABLA15. Características de los pacientes incluidos en esta parte del estudio.**

Paciente	Edad/Sexo	Subtipo	Hb	Plaquetas X10 <sup>3</sup>	Leucocitos X10 <sup>3</sup>	Blastos SP (%)	Blastos MO (%)
1	29/F	LMA-M3	5.4	55	19.7	13	49
2	45/F	LMA-M3	12.2	49	33.4	23	56
3	24/F	LMA-M4	10.8	22	7.4	19	83
4	32/M	LMA-M4	11.5	42	25.3	29	92

M, masculino; F, femenino; Hb, hemoglobina; SP, sangre periférica; MO, médula ósea.

**TABLA 16. Porcentaje de recuperación de células CD38- lin- después de separación por columna.**

Donador	Recuperación (%)
Normal (n=4 )	0.1 (0.06 - 0.2)
LMA (n=4)	0.8 (0.3 - 2.6)*

Los valores representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras.

\*Diferencia significativa con los valores de donadores normales.

**TABLA 17. Enriquecimiento de progenitores hematopoyéticos de médula ósea de donadores normales y pacientes con LMA.**

	Células CD34+ (%)		Células Formadoras de Colonias (%)	
	Pre-columna	Post-columna	Pre-columna	Post-columna
Normal (n=4)	2.6 (1 - 3)	70.4* (52 - 88)	0.9 (0.6 - 1.2)	3.9* (1.2 - 9.3)
LMA (n=4)	8 (0 - 16)	60* (0 - 70)	0.009 (0 - 0.01)	0.2 (0.15 - 1.8)

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras y corresponden al porcentaje de células CD34+ y CFC antes (pre-columna) y después (post-columna) de la selección negativa.

\*Diferencia significativa con respecto a los valores pre-columna.

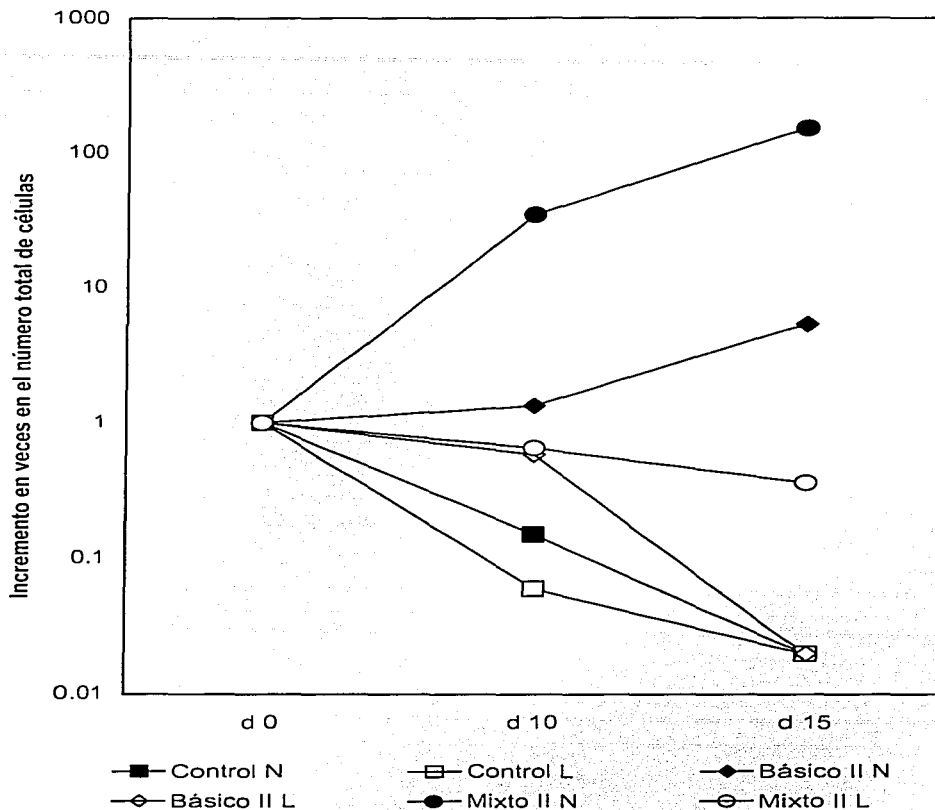
Para los pacientes el porcentaje de CFC antes de la columna fue de 0.009% y después de la columna de 0.2%, sin embargo no hay diferencia significativa entre los valores.

**b) Cinética de proliferación.** En el caso de las células provenientes de donadores normales, debido a que después de pasar por columna obtuvimos una cantidad muy reducida de células (0.02 a 0.06  $\times 10^6$ ), decidimos realizar el conteo celular a los días 10 y 15 de cultivo, para permitir un mayor tiempo de proliferación y tener un número adecuado de células para efectuar el conteo.

En ausencia de citocinas no observamos incremento en el número celular, mientras que en presencia del coctel básico II los incrementos fueron de 2.6 y 5.3 veces a los días 10 y 15 respectivamente (Figura 12). Ambos valores son inferiores a los obtenidos previamente con la subpoblación enriquecida CD34+ lin- (17.1 y 9.9 veces). Con el coctel mixto II, los incrementos fueron de 35.5 y 150.7 veces (días 10 y 15 respectivamente), ambos valores inferiores a los obtenidos con la subpoblación anterior (217 y 707 veces).

De igual manera que en las anteriores subpoblaciones, analizamos a las células provenientes de los pacientes de manera total, por subtipo de leucemia y porcentaje de células CD34+ (menor o mayor del 10%). A diferencia de los donadores normales, en las células de los pacientes pudimos obtener un número celular adecuado, de la subpoblación II (0.5 a 0.9  $\times 10^5$ ) y debido a ello realizamos el conteo celular a los días 5, 10 y 15 de cultivo.

Al analizar a los pacientes en conjunto, observamos que en ningún coctel evaluado hubo incremento en el número celular en los dos días de cultivo evaluados (Figura 12). Asimismo, en los dos pacientes del subtipo LMA-M3, no se observó incremento, sin embargo en los dos pacientes del subtipo LMA-M4, se detectaron incrementos únicamente con el coctel mixto II de 2.1, 3.3 y 1.4 veces (días 5, 10 y 15 respectivamente). Por su parte, solamente en aquellos pacientes con más del 10% de CD34+ y con el coctel mixto II, obtuvimos incrementos de 1.9, 3.1 y 1.2 veces (días 5, 10 y 15 respectivamente). Estos incrementos son muy



**FIGURA 12. Cinética de proliferación de la subpoblación II enriquecida de células progenitoras.** Los valores corresponden a las medianas obtenidas de los cultivos de donadores normales (n=4) y pacientes con LMA (n=4). N, normal; L, LMA. Los valores de los cultivos de donadores normales fueron significativamente mayores que los correspondientes de pacientes.

similares a aquellos obtenidos con la subpoblación I con las mismas condiciones de cultivo.

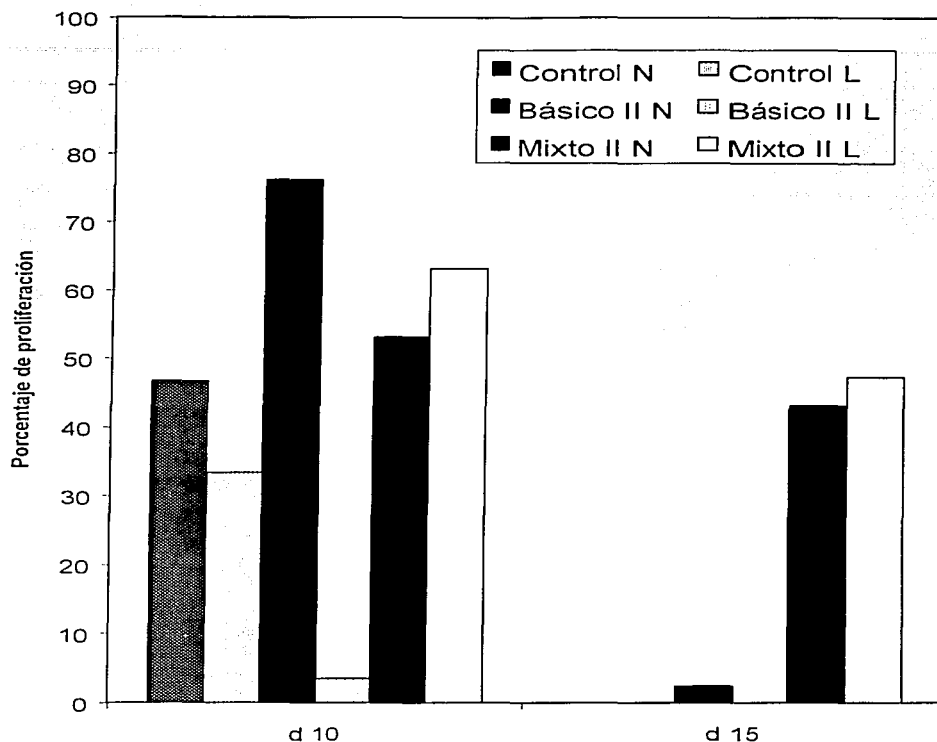
Estos resultados indican que los progenitores hematopoyéticos de la subpoblación II provenientes de pacientes con LMA poseen un menor potencial de proliferación que aquellos de donadores normales. Por su parte, al comparar a las dos subpoblaciones de donadores normales, podemos decir que la población más primitiva enriquecida en células CD34+ CD38- lin-, presenta un menor potencial de proliferación, que aquella con un mayor grado de maduración (CD34+ lin-). En el caso de los pacientes dicho potencial es muy similar para las subpoblaciones I y II.

**c) Efecto del TNF- $\alpha$  en la proliferación de células hematopoyéticas.**

Evaluamos el efecto de TNF- $\alpha$  en la proliferación de las células hematopoyéticas de donadores normales y pacientes. En el caso de los donadores normales, en ausencia de citocinas al día 10 obtuvimos el 46.6% del número obtenido sin TNF- $\alpha$ , sin embargo al día 15, tanto en presencia como en ausencia del factor no se detectaron células en el cultivo (Figura 13). Con el cóctel básico II, se obtuvo el 76% y el 2.4% a los días 10 y 15 respectivamente. Por su parte, con el cóctel mixto II se obtuvo el 53% y el 43% (días 10 y 15 respectivamente) del valor en ausencia de TNF- $\alpha$  (Figura 13).

Por otra parte, al analizar a los pacientes en conjunto, observamos que en los cultivos en presencia de TNF- $\alpha$  hubo una disminución en la proliferación con respecto a aquellos en ausencia de este factor. Así, en ausencia de citocinas obtuvimos el 52.6%, 33.3% y 0% del número obtenido sin TNF- $\alpha$  (días 5, 10 y 15 respectivamente; Figura 13). Con el cóctel básico II, se obtuvo el 31.5%, 3.4% y 0% (días 5, 10 y 15 respectivamente), y con el cóctel mixto II los valores fueron de 53.2%, 63.07% y 47.2% del número obtenido en ausencia de este factor (días 5, 10 y 15 respectivamente).

De igual manera, al analizar a los pacientes por subtipo observamos que en aquellos con LMA-M3 se obtuvieron, en ausencia de citocinas, el 64.2%, 28.4% y 0% (días 5, 10 y 15, respectivamente) del número obtenido en ausencia de TNF- $\alpha$ ; con el cóctel básico II se obtuvieron los valores de 25.1%, 8.2% y 0% (días 5, 10 y 15, respectivamente); con el cóctel mixto II los valores fueron de 65.7%, 73.8% y



**FIGURA 13. Proliferación de la subpoblación II enriquecida de células progenitoras en presencia de TNF- $\alpha$ .** Los valores corresponden al porcentaje de proliferación obtenido con respecto a los cultivos en ausencia de TNF- $\alpha$  de donadores normales (n=4) y pacientes con LMA (n=4). En todos los casos en presencia de TNF- $\alpha$ , los valores son significativamente inferiores que en ausencia del factor.

56.9% (días 5, 10 y 15, respectivamente). Por su parte con el subtipo LMA-M4 los porcentajes en ausencia de citocinas fueron de 42.2%, 37.8% y 0% (días 5, 10 y 15, respectivamente) de los valores obtenidos en ausencia de TNF- $\alpha$ ; en presencia del coctel básico II los valores fueron de 43.1%, 2.3% y 0% (días 5, 10 y 15, respectivamente); y con el coctel mixto II se obtuvo 41.8%, 42.6% y 37.8% (días 5, 10 y 15, respectivamente) del número obtenido sin este factor.

Por su parte, se evaluó un paciente LMA-M3 con menos del 10% de células CD34+, y los valores en ausencia de citocinas fueron de 32.2%, 28.4% y 0% (días 5, 10 y 15 respectivamente) de los valores obtenidos en ausencia de TNF- $\alpha$ ; con el coctel básico II los valores fueron de 27.4%, 5.1% y 0% (días 5, 10 y 15 respectivamente); y con el coctel mixto II fueron de 60.8%, 90% y 48.3% (días 5, 10 y 15 respectivamente). En aquellos pacientes con más del 10% de células CD34+ (1 LMA-M3 y 1 LMA-M4), los porcentajes obtenidos en ausencia de citocinas fueron de 28.9%, 24.1% y 0% (días 5, 10 y 15 respectivamente) del número obtenido sin TNF- $\alpha$ ; con el coctel básico II fueron de 22.7%, 5.1% y 0% (días 5, 10 y 15 respectivamente); y con el coctel mixto II los valores fueron de 32.1%, 29.3% y 28.5% (días 5, 10 y 15 respectivamente).

Estos resultados nos indican que la población de progenitores más primitivos de donadores sanos y pacientes con LMA (Subpoblación II), son sensibles al efecto inhibitor de TNF- $\alpha$ . No obstante, en presencia del coctel básico II, es mayor la inhibición de la proliferación en las células de los pacientes con respecto a la de donadores sanos. Además, un aspecto importante que observamos es que en presencia del coctel mixto II, la inhibición disminuye comparado con el coctel básico II, en los cultivos celulares de pacientes.

**d) Expansión de progenitores hematopoyéticos.** Debido al número reducido de células obtenido durante los cultivos en ausencia de citocinas y con el coctel básico II, evaluamos la expansión de progenitores en los donadores normales únicamente al día 10 y en ninguno observamos expansión (0.03 y 0.9 veces, respectivamente). Con el coctel mixto II, el número de células fue adecuado y detectamos a los días 10 y 15 una expansión de 14.9 y 13.8 veces respectivamente (Tabla 18). El valor obtenido con el coctel mixto II al día 10 fue



**TABLA 18. Expansión de Células Formadoras de Colonias en cultivos líquidos de la población enriquecida con células progenitoras hematopoyéticas provenientes de donadores normales y pacientes con LMA.**

Donador	Control	Control +TNF	Básico II	Básico II +TNF	Mixto II	Mixto II +TNF
Normal (n=4)	0.03 (0.004-.08)	0.02 <sup>a</sup> (0-0.04)	0.9 (0.3-29)	0.01 <sup>a</sup> (0-0.3)	14.9 (4.9-25)	7.8 <sup>a</sup> (2.7-13)
LMA (n=4)	0 (0-0.5)	0	0.52 (0-7.3)	0 (0-0.6)	14.3 (0.1-58)	0.07 (0-0.5)
LMA-M3 (n=2)	0.2 (0-0.5)	0	0.5 (0-1.04)	0	4.4 (0.1-8.7)	0.07 (0.01-0.1)
LMA-M4 (n=2)	0	0	3.6 (0-7.3)	0	38.9 (19.9-58)	0.2 (0-0.5)
LMA (n=1) (<10%)	0	0	0	0	8.7	0.13
LMA (n=2) (>10%)	0.2 (0-0.5)	0	4.2 (1.04-7.3)	0	10.02 (0.1-19.9)	0.08 (0-1.5)

Los resultados representan la mediana (mínimo y máximo) del número indicado de muestras y corresponden al máximo incremento en veces en el número de CFC (comparado con el día 0) obtenido (día 10). El número inicial de células al día 0 es 1. Paciente <10% de CD34+ (LMA-M3) y >10% de CD34+ (LMA-M3 y LMA-M4).

<sup>a</sup> Corresponden al valor de dos donadores normales.

inferior al obtenido previamente con la subpoblación CD34+ lin- (26 veces), sin embargo al día 15 fue superior (6.3 veces).

En el caso de los pacientes, al analizarlos en conjunto no observamos expansión en ausencia de citocinas y con el coctel básico II. Sin embargo, con el coctel mixto II obtuvimos un incremento de 14.3 y 2.03 veces (día 10 y 15, respectivamente; Tabla 18).

En los cultivos de los dos pacientes con LMA-M3, únicamente observamos expansión con el coctel mixto II de 4.4 veces (día 10), mientras que con los dos de LMA-M4, se observó expansión con el coctel básico II de 3.6 veces (día 10) y con el coctel mixto II de 38.9 y 18.9 veces (días 10 y 15; Tabla 18).

Por su parte, analizamos un paciente con menos del 10% de células CD34+ y se obtuvo un incremento de 8.7 veces al día 10 con el coctel mixto II; en aquellos con más del 10% de CD34+, obtuvimos incrementos con el coctel básico II al día 10 de 4.2 veces y con el coctel mixto II los incrementos fueron de 10.02 y 16.9 veces (días 10 y 15). Estos incrementos obtenidos con la población CD34+ 38- lin- de los pacientes de LMA-M3 y LMA-M4, fueron superiores a los obtenidos anteriormente con la subpoblación CD34+ lin-, en donde los máximos incrementos fueron de 0.8 y 2.3 veces, respectivamente (Tabla 14).

De igual manera, en aquellos cultivos de los pacientes con más del 10% de células CD34+, el incremento obtenido fue mayor (10.02 veces) que en la subpoblación anterior en donde el máximo incremento fue de 4.01 veces con el coctel mixto II (día 10; Tabla 14).

Estos resultados nos indican que existe un mayor potencial de expansión en los progenitores hematopoyéticos de la subpoblación II en algunos pacientes con LMA, que la correspondiente población de donadores normales. Además podemos decir que los progenitores morfológicamente normales de la subpoblación II de pacientes con LMA, presentan un mayor potencial de expansión que aquellos de la subpoblación I.

#### **e) Efecto del TNF- $\alpha$ en la expansión de progenitores hematopoyéticos.**

En el caso de los donadores normales, realizamos las cinéticas a partir de dos muestras y observamos que en ausencia de citocinas prácticamente no hubo efecto en el número de progenitores en presencia de TNF- $\alpha$  (Tabla 18), sin

embargo con el coctel básico II y mixto II, se obtuvieron el 1.1% y el 52.3% de los valores en ausencia del factor (día 10).

En los cultivos provenientes de los pacientes, en ninguno de los grupos analizados observamos células al día 10 de cultivo en ausencia de citocinas y con el coctel básico II (Tabla 18), mientras que con el coctel mixto II los valores fueron entre 0.6% y 2.7% de aquellos en ausencia del factor (tomando en cuenta los tres grupos analizados: en conjunto, subtipo de LMA y porcentaje de células CD34+).

Estos resultados indican que el TNF- $\alpha$  inhibe la expansión de progenitores hematopoyéticos morfológicamente normales de la subpoblación II de los pacientes con LMA y de donadores sanos. Además, el efecto inhibitor de TNF- $\alpha$  es mayor sobre los progenitores de los pacientes con LMA, que sobre aquellos provenientes de donadores normales.

## 9. Discusión

La LMA es una enfermedad cuya biología es bastante compleja, dado que se origina a partir de alteraciones genéticas que dan por resultado la formación de ocho variedades o subtipos celulares diferentes, en donde cada uno presenta características biológicas particulares. A pesar de esta complejidad, los avances logrados en los últimos años en cuanto a la identificación y purificación de las células seminales y progenitoras hematopoyéticas, así como el desarrollo de métodos experimentales para el estudio de éstas, nos han permitido ampliar y profundizar nuestro conocimiento en este tipo de leucemia.

Contrario a lo que se pensó por mucho tiempo, se considera que en la LMA existe una jerarquía hematopoyética similar a la observada en la hematopoyesis normal, es decir que en la gran mayoría de los subtipos, la LMA se origina en una misma población celular muy primitiva, caracterizada por la expresión del antígeno CD34 y la falta de expresión del antígeno CD38, así como de antígenos específicos de linaje (células CD34+ CD38- lin-). Esta población parece ser la responsable de mantener la hematopoyesis leucémica en forma continua (hasta la curación o la muerte del individuo) y de desarrollar la enfermedad mínima residual en aquellos pacientes que presentan recaída después de tratamiento.

A pesar de la identificación de subpoblaciones primitivas en los pacientes con LMA, muchas de sus características funcionales no se han establecido aún. Diversos trabajos realizados in vitro, han demostrado que ciertas citocinas participan de manera importante en el desarrollo de la LMA, dado que inducen la proliferación de los blastos transformados (Delwel et al, 1988 y 1989; Budel et al, 1993; Birkenkamp et al, 1999), sin embargo este efecto se ha observado en la población total de células leucémicas y no se conoce la participación de tales inductores en subpoblaciones más primitivas. En este trabajo estudiamos el efecto de diferentes cocteles de citocinas hematopoyéticas, sobre la proliferación y expansión de dos subpoblaciones enriquecidas de células progenitoras de pacientes con LMA, obtenidas mediante un proceso de separación para enriquecer en células CD34+ lin- y CD34+ CD38- lin-.

A partir de nuestros resultados hemos observado un incremento de entre 6 y 14 veces en el porcentaje de recuperación de células (posterior a la separación

inmunomagnética) al obtener la subpoblación I (enriquecida en células CD34+lin-) y de 8 veces en la subpoblación II (enriquecida en células CD34+ CD38- lin-), en los pacientes con LMA con respecto a los donadores sanos (Tablas 8, 12 y 16). Por el contrario, obtuvimos un incremento de entre 3.6 y 10.6 veces en el porcentaje de células CD34+ y de entre 3.2 y 3.8 veces en el correspondiente a CFC, en los donadores sanos con respecto a los pacientes, lo cual indica que a pesar del mayor porcentaje de recuperación de células (posterior a la separación) en los pacientes, no observamos un incremento en el enriquecimiento de progenitores hematopoyéticos con respecto a los donadores sanos. Además, al evaluar la expresión de CD34 en las poblaciones obtenidas, detectamos que en algunos pacientes (33%) no hay expresión del antígeno, mientras que en otros (53%), un porcentaje elevado de células lo expresan.

Los resultados anteriores, sugieren la existencia de alteraciones en la expresión de antígenos de superficie en las células leucémicas. Observaciones similares se han descrito en trabajos previos, en donde encuentran que el 38% de los pacientes estudiados no expresan el antígeno CD34 (Cascavilla et al, 2001). Además, es probable que exista una disminución en la expresión de antígenos de linaje con respecto a las células normales, dado que recuperamos un porcentaje elevado de ellas por selección negativa, es decir de células que no fueron retenidas en la columna por falta de dicha expresión en la población leucémica. El estudio del grupo de Carella (Cascavilla et al, 2001) en donde se evaluó la presencia de diferentes antígenos de superficie en las células leucémicas de pacientes con distintos subtipos de LMA (LMA-M0 a M7), demostró que existe una gran heterogeneidad entre los pacientes, dado que en muchos casos no se detectaron antígenos de linaje, mientras que en otros su expresión es baja, lo cual concuerda con nuestras observaciones.

Los resultados de la detección de CD34, sugieren que este antígeno no es un marcador específico de células leucémicas primitivas, dada su falta de expresión en el caso de algunos pacientes con LMA. Es interesante que este resultado se relacione con algunos estudios, en los cuales se ha demostrado, que a diferencia del inmunofenotipo descrito para las células iniciadoras de leucemia (CD34+ CD38-), una pequeña proporción de células incluida en la subpoblación

CD34<sup>-</sup> lin<sup>-</sup> es capaz de reconstituir la hematopoyesis leucémica en ratones SCID (Terpstra et al, 1996). Con ello, podemos decir que existe una subpoblación de células con características muy primitivas en LMA, que no expresan el antígeno CD34 y que pudieran ser las responsables de mantener la leucemia en aquellos pacientes en donde no observamos la presencia de este antígeno, o bien más indiferenciada que CD34<sup>+</sup> en aquellos que si lo expresan.

A este respecto, es importante hacer notar que el grupo de Dick en Toronto, reportó que en médula ósea de sujetos sanos también existe una población de células CD34<sup>-</sup> lin<sup>-</sup> capaz de reconstituir el sistema hematopoyético en ratones SCID y que esta población (CD34-SRC) es incluso más inmadura que las células CD34<sup>+</sup>, encontrando así una nueva clase de células hematopoyéticas (Bhatia et al, 1998). La detección de esta subpoblación permite suponer que la célula con este inmunofenotipo presenta la transformación que origina la LMA, lo cual apoya nuestras observaciones y el trabajo que reporta la identificación de células capaces de repoblar ratones SCID y que no expresan el antígeno CD34.

Al determinar el porcentaje de CFC en las poblaciones enriquecidas de progenitores en los pacientes con LMA, observamos una disminución con respecto a los donadores sanos. Sin embargo, al comparar las poblaciones leucémicas antes y después de la separación por selección negativa, detectamos un enriquecimiento en CFC morfológicamente normales, en la subpoblación I (entre 3.7 y 4.7 veces). Estos resultados son importantes, dado que se podría considerar el enriquecimiento de progenitores como un procedimiento previo a la separación de células normales de las leucémicas (purga biológica), en los pacientes con LMA propuestos para trasplante autólogo.

Al evaluar la proliferación de las poblaciones enriquecidas, determinamos que en los cultivos de la subpoblación I provenientes de los pacientes con LMA, hubo una disminución con respecto a los cultivos de donadores sanos, en el número de células mononucleares generadas en cultivo durante los días 5, 10 y 15, dado que en presencia de la combinación de citocinas sin TPO y FL, tan solo se obtuvo con el máximo incremento alcanzado (coctel mixto I, día 5) el 2.04% de los valores normales (coctel mixto I, día 15). De igual manera y a pesar de adicionar las citocinas mencionadas, observamos una disminución en el número

de células mononucleares en los cultivos provenientes de pacientes con respecto a los de donadores normales (0.29% de los valores normales, coctel mixto II, día 15).

Asimismo, al analizar la proliferación de la subpoblación II, observamos valores por debajo de los normales e incluso menores al número inicial, en los días 10 y 15. Un aspecto interesante es que con esta misma población, en los cultivos de donadores normales hubo una disminución del 78% en el número celular (coctel mixto II, día 15), con respecto a los valores obtenidos con la subpoblación I, lo cual concuerda con la característica de quiescencia descrita en las poblaciones hematopoyéticas más primitivas.

Los resultados anteriores indican que existe una disminución en el potencial proliferativo de las subpoblaciones I y II proveniente de los pacientes con LMA con respecto a los donadores normales. Trabajos previos han demostrado un incremento en la proliferación de la subpoblación CD34+ de los pacientes con LMA (en presencia de citocinas) con respecto a su contraparte normal (Murayama et al, 1998), sin embargo en este estudio hemos obtenido subpoblaciones enriquecidas de células progenitoras más primitivas y el comportamiento es diferente. Esta disminución en el potencial proliferativo en las poblaciones leucémicas más primitivas, puede ser uno de los mecanismos de escape que les permite sobrevivir en las terapias de remisión, en la cual se utilizan factores de crecimiento para inducir la proliferación de las células transformadas y de esta manera hacer más efectiva la acción de fármacos que inducen la muerte de las células en proliferación (Smith et al, 1996, Schiller, 1998). La posibilidad de sobrevivir a los fármacos, hace que estas células sean candidatos idóneos para favorecer la reaparición de la enfermedad en aquellos pacientes que entran en recaída, de hecho algunas investigaciones con la subpoblación CD34+ CD38-, han demostrado que estas células poseen una sensibilidad reducida a los efectos de la Daunorubicina, uno de los compuestos terapéuticos más utilizados en el tratamiento de la LMA (Costello et al, 2000).

Otro aspecto interesante fue el efecto que observamos al adicionar TNF- $\alpha$  a los cultivos provenientes de donadores normales y de pacientes. En ambos detectamos una disminución constante en el número celular obtenido en ausencia

de este factor. En el caso de los pacientes, dichos valores fueron de 20% y 10% de los obtenidos en los cultivos en ausencia de TNF- $\alpha$ , para la subpoblación I (coctel mixto II, días 10 y 15 respectivamente) y de 63% y 47% para la subpoblación II (coctel mixto II, días 10 y 15 respectivamente); esta disminución es más pronunciada en la subpoblación I. Otro aspecto interesante fue que en la subpoblación II de los pacientes, el efecto de TNF- $\alpha$  disminuye en el coctel mixto II, comparado con el básico II, lo cual sugiere que la adición de citocinas como GM-CSF e IL-3 en presencia de TNF- $\alpha$ , favorece el crecimiento de las células leucémicas, lo cual se ha demostrado en poblaciones con un mayor grado de maduración (Elbaz et al, 1991b). Estos resultados nos indican que ambas subpoblaciones de células leucémicas aún son sensibles al efecto inhibitorio de la proliferación de TNF- $\alpha$ , sin embargo la población más primitiva parece ser más resistente a dicho efecto, lo cual concuerda con otros estudios que señalan que la población CD34+ CD38- posee una sensibilidad disminuida a la apoptosis inducida por Fas (Costello et al, 2000; Neering et al, 2001).

Los resultados anteriores son importantes debido a que en varios trabajos de investigación se ha demostrado que TNF- $\alpha$  es capaz de estimular la proliferación de las células leucémicas (Elbaz et al, 1991b; Richter et al, 2001), sin embargo este efecto puede estar dado en poblaciones con un mayor grado de maduración y no así en subpoblaciones más inmaduras, en donde, como observamos, tiene un efecto inhibitorio. El TNF- $\alpha$  se ha considerado como el responsable de disminuir la hematopoyesis normal y favorecer la proliferación de las células leucémicas en los pacientes con LMA, dado que estas células son capaces de producirlo. Sin embargo, el determinar que las células responsables de mantener la producción de los blastos leucémicos, aún responden al efecto inhibitorio de este factor, cuestiona el mecanismo de estimulación autócrina por efecto de éste, como uno de los procesos que favorecen la proliferación de las poblaciones leucémicas más inmaduras, las cuales pudieran no producirlo. Probablemente la disminución a la inducción de apoptosis, la falta de reconocimiento por células inmunocompetentes y su bajo grado de diferenciación hacia células dendríticas, sean los mecanismos que permiten la acumulación de



estas células, como lo han sugerido otros estudios realizados (Costello et al, 2000; Neering et al, 2001).

En el caso de los cultivos provenientes de pacientes con LMA, al evaluar la expansión de progenitores formadores de colonias, detectamos en los diferentes días de cultivo, la formación de colonias morfológicamente normales y no de leucémicas (UFC-LMA). Esto resulta interesante porque a diferencia del sistema experimental anterior (LTBMC, en donde existen interacciones entre las células estromales y las hematopoyéticas), en los cultivos en suspensión, las células hematopoyéticas se aíslan de su microambiente medular y solamente permanecen en presencia de los factores que se añaden al cultivo. Así, el hecho de no encontrar UFC-LMA en estos cultivos, a pesar de estar en presencia de citocinas que favorecen el crecimiento de dichos progenitores, como el GM-CSF (Montesinos et al, 2000), señala la importancia de la participación de las células estromales de los pacientes con LMA en la expansión de los progenitores leucémicos, lo cual está de acuerdo con estudios previos que demuestran la presencia de alteraciones funcionales en las células estromales de la médula ósea de los pacientes, que favorecen el desarrollo de las células leucémicas (Mayani et al, 1991 y 1992a; Bendall et al, 1994; Wetzler et al, 1995; Zhang et al, 1999).

La disminución de los progenitores morfológicamente normales en los pacientes es notoria, dado que en algunos no detectamos CFC desde el inicio del cultivo y en otros el número fue reducido con respecto a los donadores sanos. No obstante, en algunos pacientes a pesar del número reducido de progenitores morfológicamente normales, estos parecen tener un potencial de expansión mayor que aquellos provenientes de sujetos sanos (Tablas 10 y 14), lo cual está de acuerdo con estudios previos, en donde se determinó una mayor capacidad de formación de LTC-IC de las células normales de los pacientes con LMA con respecto a aquellas de donadores sanos (Ailles et al, 1997; Guang et al, 2002). La adición de TNF- $\alpha$  a los cultivos disminuyó la expansión de progenitores en las subpoblaciones analizadas, tanto de pacientes como de donadores sanos, sin embargo dicho efecto fue mayor sobre las células de los pacientes, lo cual indica que los progenitores que dan lugar a la formación de colonias morfológicamente

normales en los pacientes, presentan una mayor sensibilidad al efecto inhibitor de  $\text{TNF-}\alpha$ , que aquellos provenientes de donadores sanos.

Estos hallazgos abren la posibilidad de que las células normales que se pudieran obtener de los pacientes mediante procesos de separación, posean características funcionales que pudieran favorecer su expansión con fines de trasplante. Uno de los retos en la actualidad, es encontrar el mejor procedimiento de identificación y separación de dichas células normales de la población leucémica. A este respecto, hay trabajos que demuestran diferencias muy claras en cuanto a la expresión de ciertos antígenos, que podrían servir para identificar y distinguir entre las células progenitoras normales y su contraparte leucémica. Así, el antígeno CD90 (Thy-1), expresado en una subpoblación de células  $\text{CD34}^+$ , la cual incluye a las células hematopoyéticas más primitivas (SRC y LTC-IC; Craig et al, 1993) y el antígeno CD117 (c-kit), receptor del SCF (Papayannopoulou et al, 1991), están ausentes en los progenitores de pacientes con LMA, a diferencia de los progenitores de sujetos sanos (Blair y Thomas, 1997a; Blair y Sutherland, 2000). De igual manera, el antígeno CD123 que corresponde a la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-3, se ha visto fuertemente expresado en las células  $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$  de pacientes con LMA (>99%), mientras que en las células normales con este mismo inmunofenotipo prácticamente no hay detección (<1% de la población  $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ ) (Jordan et al, 2000). Estudios encaminados a la identificación de estas proteínas en muestras de médula ósea o sangre periférica de pacientes con LMA, permitirían la identificación y separación de ambas poblaciones celulares.

Diversos estudios han demostrado la participación de las citocinas en la proliferación de células leucémicas con un mayor grado de maduración, sin embargo en subpoblaciones más primitivas, las citocinas no parecen influir en gran medida en la acumulación de los progenitores. Para poder entender porqué en las células leucémicas más primitivas no existe una respuesta proliferativa más efectiva con respecto a las citocinas, es necesario el estudio de las alteraciones moleculares que ocurren en dichos progenitores y que contribuyen a la transformación. Algunos trabajos indican que las alteraciones más comunes son las translocaciones cromosómicas balanceadas, que resultan en la producción de proteínas quiméricas (Grignani et al, 2000; Hromas et al, 2000; Schmetzer et al,

2000). Estas proteínas constituyen, generalmente, factores reguladores de la transcripción de genes específicos, fundamentales en la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular (Cline, 1994).

No menos importante es el estudio de la composición y la integridad funcional del microambiente hematopoyético en LMA. Existen fuertes evidencias de alteraciones cualitativas y cuantitativas en dicho microambiente, las cuales, si bien no son la causa de la enfermedad, sí parecen estar involucradas en la inhibición de la hematopoyesis normal (Mayani, 1996) y en el desarrollo de la clona maligna como lo hemos demostrado en LTBMC.

Aunque se han identificado subpoblaciones de células leucémicas, aún se desconocen muchas de sus características biológicas, lo cual es de suma importancia no solo a nivel básico sino también clínico. Esto, evidentemente, ayudará al desarrollo de estrategias terapéuticas más eficientes (por ejemplo, el diseño de fármacos y anticuerpos monoclonales dirigidos en forma específica para inhibir la expansión clonal de dichas células).

## VIII. DISCUSION GENERAL

En los últimos años se han conseguido avances muy importantes en el campo de la biología de las células primitivas hematopoyéticas. Sin embargo, a pesar de que muchos de los estudios se han enfocado en las células normales, a la par se han descrito características biológicas importantes de las células primitivas leucémicas (CPL). Así por ejemplo, se ha determinado que las CPL se encuentran en un estado de quiescencia, a diferencia de los blastos con un mayor grado de maduración, que proliferan más rápidamente (Smith et al, 1996; Guan et al, 2003). Lo anterior, explicaría en parte las constantes recaídas en los pacientes con LMA que han sido sometidos a tratamientos con drogas que actúan sobre células en proliferación (Schiller, 1998). Además, se ha demostrado que las CPL sobreexpresan genes de resistencia a estos fármacos (Costello et al, 2000), lo cual les confiere una mayor ventaja con respecto a las células normales, que pudieran ser más afectadas por dicho tratamiento.

Si bien el estado quiescente es una característica que favorece el mantenimiento de las CPL a largo plazo, pueden existir otros mecanismos que permitan suprimir la proliferación o que ayuden a la permanencia de las células en dicho estado.

Así, en este estudio demostramos que las células progenitoras de pacientes con LMA, tienen un menor potencial proliferativo *in vitro* que aquellas provenientes de donadores normales, en respuesta al estímulo de diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas. Esta observación apoya los estudios de Guzmán y cols. (Guzmán et al, 2001), dado que el estado quiescente de las CPL se puede favorecer, debido a su baja capacidad de respuesta al efecto inductor de la proliferación de las citocinas que se pudieran estar produciendo en el microambiente hematopoyético medular.

La capacidad disminuida de las CPL al efecto de las citocinas se contrapone a lo observado en los blastos leucémicos con un mayor grado de maduración, en donde varios estudios han demostrado la importancia de estas proteínas en la proliferación de los mismos (Budel et al, 1993; Birkenkamp et al, 1999; Kimura et al, 1999). Lo anterior corrobora no solo la presencia de subpoblaciones con diferencias inmunofenotípicas en las células leucémicas, sino

que además indica la existencia de características biológicas muy particulares entre dichas subpoblaciones.

Por otra parte, a pesar de no tener una elevada actividad proliferativa en respuesta a citocinas, observamos que los progenitores leucémicos responden *in vitro*, al estímulo de factores como el GM-CSF, que en el contexto del microambiente hematopoyético (reproducido por los LTBMC), favorece el mantenimiento de los mismos a largo plazo. Con estas observaciones, podemos señalar que las citocinas hematopoyéticas tienen un efecto diferente sobre las células leucémicas de pacientes con LMA, el cual depende de la subpoblación a la cual estimulen, así en poblaciones más primitivas, estas proteínas podrían favorecer el mantenimiento de las mismas, mientras que en poblaciones más maduras (blastos leucémicos) estimularían principalmente su proliferación.

De igual manera, otros investigadores han detectado alteraciones en los mecanismos que favorecen la sobrevivencia de los progenitores leucémicos. Así, se ha demostrado que las células primitivas de LMA expresan una forma activa del factor nuclear NF- $\kappa$ B (Guzmán et al, 2001), el cual se sabe tiene una actividad anti-apoptótica y se considera como un factor clave de sobrevivencia para varios tipos de cáncer (Wang et al, 1996 y 1998; Kim et al, 2000).

Con todas estas evidencias, se puede señalar que las células que mantienen la producción de los blastos malignos en LMA, utilizan diversos mecanismos celulares y moleculares para lograr sobrevivir por largos períodos de tiempo. A la fecha el reto no solo es describir las características de las distintas subpoblaciones leucémicas, sino poderlas diferenciar de su contraparte normal y con ello desarrollar estrategias terapéuticas más dirigidas para su eliminación. Al respecto, varios trabajos han descrito diferencias inmunofenotípicas entre las células normales y las leucémicas, en donde las células malignas se caracterizan por ser CD90- CD117- y CD123+ (Blair et al, 1997b; Blair y Sutherland 2000; Jordan et al, 2000). Estos estudios permitieron la purificación de las células transformadas, y con ello se ha encontrado que estas células tienen una activación constitutiva del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Guzmán et al, 2001), el cual es un hallazgo importante que no solo se relaciona con la detección molecular de las células primitivas leucémicas, sino que además el tratamiento de las

mismas con inhibidores de la activación del factor permite inducir la muerte celular a través del proceso de apoptosis, situación que no ocurre en las células normales provenientes de médula ósea y de sangre de cordón umbilical.

Si bien resulta importante encontrar características de las células leucémicas que permitan su eliminación, otro aspecto de no menos importancia es el poder separar y manipular a las células hematopoyéticas normales presentes en bajas cantidades en la médula ósea de los pacientes. Al respecto en nuestro estudio determinamos que los progenitores morfológicamente normales más primitivos (subpoblación II) de algunos pacientes con LMA, poseen un mayor potencial de expansión que los progenitores provenientes de donadores normales. Estos resultados apoyan los trabajos del grupo de Hogge y col. (Ailles et al, 1997) en los cuales también detectan un mayor potencial de expansión pero utilizando cultivos que permiten el crecimiento de células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC, por sus siglas en inglés).

Lo anterior abre la posibilidad de que las células normales de pacientes con LMA, puedan ser expandidas para su posterior utilización en trasplantes de tipo autólogo. Por lo tanto, un procedimiento *in vitro* de purga de células leucémicas podría involucrar el uso de inhibidores de la actividad del factor NF- $\kappa$ B (Epinat y Gilmore, 1999), lo cual llevaría a las células malignas a muerte por apoptosis y posteriormente recuperar a las células normales para expandirlas con la utilización de distintas combinaciones de citocinas, como se ha realizado en nuestro laboratorio con células provenientes de cordón umbilical (Flores-Guzmán et al, 2002).

A la fecha, muchos esfuerzos se realizan para encontrar procedimientos adecuados que permitan modificar las expectativas de vida de los pacientes con LMA, sin embargo gran parte de ello depende de conocer a mayor profundidad la biología del padecimiento, para así poder desarrollar estrategias *in vivo* o *in vitro* que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad tan severa y de consecuencias fatales.

## IX. PERSPECTIVAS

En este estudio hemos demostrado que la adición de GM-CSF a los LTBMC provenientes de pacientes con LMA, estimula el crecimiento de los progenitores leucémicos. A pesar de que se ha documentado que los blastos leucémicos más maduros expresan receptores para este factor, aún no se ha determinado si en las células progenitoras primitivas se expresan de igual manera. Debido a ello es necesario evaluar la expresión de receptores para citocinas hematopoyéticas en las células leucémicas más primitivas, así como determinar la producción y participación de las citocinas que se pudieran estar produciendo en la capa de células estromales por efecto de este factor, y que pueden favorecer el crecimiento de dichos progenitores.

Por otra parte en este trabajo estudiamos poblaciones enriquecidas de progenitores leucémicos, obtenidas a partir de la expresión de antígenos como CD34, CD38 y marcadores de linaje; si bien estas poblaciones representan a células muy primitivas, a la fecha se han descrito subpoblaciones dentro de ellas que parecen ser aún más inmaduras y que se han identificado con el inmunofenotipo CD34+ CD38- HLA-DR- CD90- CD117- CD123+ (Blair et al, 1997b, 1998; Blair y Sutherland, 2000; Jordan et al, 2000). Sería importante determinar si las características que hemos descrito se mantienen en dichas subpoblaciones.

En nuestro estudio determinamos que las células progenitoras morfológicamente normales de algunos pacientes con LMA poseen un mayor potencial de expansión que aquellas provenientes de donadores sanos. Estudios recientes han descrito diferencias inmunofenotípicas entre los progenitores leucémicos y su contraparte normal en los pacientes con LMA (Blair et al, 1997b; Blair y Sutherland 2000; Jordan et al, 2000). Así, tomando en cuenta las diferencias en la expresión de antígenos de superficie, es posible separar ambas poblaciones de la muestra de un mismo paciente. Con base en ello, otro aspecto importante a evaluar y que tendría repercusión a nivel clínico, sería un estudio comparativo entre las poblaciones de células hematopoyéticas normales de los pacientes y aquellas provenientes de donadores normales.

Si fuera posible obtener células hematopoyéticas normales con un potencial importante de expansión en los pacientes con LMA, entonces se podrían manipular estas células para su posterior utilización en los trasplantes autólogos.



## X. CONCLUSIONES

En la última década, se han planteado nuevos conceptos en la biología de la LMA. Hoy en día, sabemos que este padecimiento tiene su origen en una población de células hematopoyéticas muy primitivas, las cuales mantienen la formación de las células malignas. El reto actual es la caracterización funcional y molecular de esta población, con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para mejorar el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad.

El presente estudio contribuye a dicha caracterización funcional bajo condiciones *in vitro*. Así, hemos demostrado que existe una disminución en el número de progenitores hematopoyéticos que dan lugar a la formación de colonias morfológicamente normales en los pacientes con LMA, ello probablemente como consecuencia de la hematopoyesis normal deficiente que se presenta en la médula ósea y lo cual se refleja en los estados de leucopenia que experimentan estos pacientes.

Además, determinamos que existe una disminución en la producción de células hematopoyéticas en los LTBM de pacientes con LMA con respecto a los donadores normales, misma que se incrementa con la adición de rhGM-CSF. Sin embargo, la adición de este factor favorece el crecimiento de los progenitores leucémicos en los LTBM de los pacientes con LMA. El rhGM-CSF es un factor ampliamente utilizado en la clínica para la recuperación de las cuentas leucocitarias en los pacientes que han sido sometidos a tratamientos con quimioterapia, sin embargo nuestros hallazgos sugieren que el uso de este factor debe ser considerado con precaución dado que podría inducir la reaparición de la enfermedad.

Por otra parte determinamos que en las células provenientes de los pacientes con LMA existen alteraciones en la expresión del antígeno CD34, dado que en algunos casos no fue posible detectar células CD34+, mientras que en otros, un porcentaje elevado de ellas lo expresan. Debido a lo anterior, este antígeno podría no ser un marcador específico de células progenitoras primitivas de pacientes con LMA, dado que en algunos pacientes no se detecta su presencia, lo cual hace suponer que el origen de la transformación se lleva a cabo en una población aún más primitiva y con el inmunofenotipo CD34-CD38-lin-.