

Universidad Nacional Autónoma de México
Programa de Maestría en Ciencias Médicas

**CARACTERIZACION DE CELULAS TRONCALES Y
PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS EN LEUCEMIA
MIELOIDE AGUDA INFANTIL**

TESIS
Que para obtener el grado académico
De Maestro en Ciencias
Presenta
Elisa Maria Dorantes Acosta

Tutor:
Dr. José Ignacio Santos Preciado
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Cotutores:
Dr. Héctor Mayani Viveros
Dra. María Antonieta Chávez González
Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Oncológicas
IMSS CMNSXXI

México DF, marzo 2009



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.

Dedico esta tesis

A Dios, a mis papás Elisa y Chucho por su infinito amor, a mi hermanita porque sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible, Lili gracias por existir y Carlos por tu apoyo incondicional.

A los niños de Hospital Infantil de México.
Porque diariamente brindan una oportunidad de aprendizaje.

A la UNAM, Hospital Infantil de México, IMSS y CONACYT
Instituciones que han permitido mi desarrollo académico

A mis tutores: Dr. Santos, gracias por todas sus enseñanzas, consejos y por impulsar mi desarrollo académico. Al Dr. Mayani, gracias por compartir conmigo sus conocimientos, gracias por su confianza y por conducirme en el apasionante mundo de la hematopoyesis. A la Dra. Antonieta Chávez, por compartir conmigo tu pasión por la ciencia, por tu supervisión a lo largo de todo el trabajo, por tu paciencia y amistad.

A mi comité tutorial: Gracias por enriquecer este trabajo con sus comentarios

A mis compañeros de laboratorio Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Oncológicas IMSS CMNSXXI, porque de todos ustedes he aprendido cosas importantes

A todos ustedes, gracias por enriquecer este trabajo.

CARACTERIZACION DE CELULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA INFANTIL

ÍNDICE

| | <u>PÁGINA</u> |
|--|---------------|
| I.- RESUMEN | 5 |
| II.- INTRODUCCIÓN | 7 |
| III.- MARCO TEORICO | 13 |
| 1.- Hematopoyesis | 13 |
| 2.- Mielopoyesis | 16 |
| Formación de la serie eritroide | 16 |
| Formación de la serie granulocítico-monocítica | 18 |
| Formación de la serie megacariocítica | 19 |
| 3.- Citocinas que regulan la hematopoyesis | 20 |
| SCF | 20 |
| IL-6 | 21 |
| TPO | 22 |
| Flt-3L | 23 |
| IL-3 | 23 |
| GM-CSF | 24 |
| G-CSF | 24 |
| EPO | 25 |
| 4.- Leucemogénesis | 25 |
| 5.- Diferencias hematopoyéticas de acuerdo a la edad | 27 |
| Diferencias en la incidencia | 27 |
| Mortalidad | 28 |
| Cambios celulares de acuerdo a la edad | 28 |
| IV.- ANTECEDENTES | 29 |
| Proliferación de células leucémicas <i>in vitro</i> | 29 |
| V.- JUSTIFICACION | 32 |
| VI.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 33 |
| Pregunta general | 33 |
| Preguntas específicas | 33 |
| VII.- HIPOTESIS | 34 |
| Hipótesis general | 34 |
| Hipótesis específicas | 34 |
| VIII.- OBJETIVOS | 35 |
| Objetivo general | 35 |
| Objetivos específicos | 35 |
| IX.- MATERIAL Y METODOS | 36 |
| 1) Diseño de la investigación | 36 |
| 2) Diseño de la muestra | 36 |
| 3) Criterios de inclusión y exclusión | 37 |
| 4) Variables, definiciones operacionales y escalas de medición | 38 |
| 5) Procedimientos | 39 |
| Obtención de muestras | 39 |
| Separación de células hematopoyéticas | 40 |
| Cultivos líquidos | 41 |

CARACTERIZACION DE CELULAS TRONCALES Y PROGENITORAS HEMATOPOYETICAS EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA INFANTIL

ÍNDICE

| | <u>PÁGINA</u> |
|--|---------------|
| Inmunocitoquímica | 41 |
| Cultivos semisólidos | 42 |
| 6) Análisis estadístico | 42 |
| 7) Aspectos éticos y de bioseguridad | 43 |
| 8) Otros aspectos (factibilidad) | 44 |
| X.- ANEXO I Carta de consentimiento informado | 45 |
| XI.- ANEXO II Parámetros considerados como normales en una biometría hemática | 46 |
| XII.- RESULTADOS Y DISCUSION | 45 |
| Características generales de los pacientes del estudio | 45 |
| Enriquecimiento en células CD 34 ⁺ | 49 |
| Resultados de la población I | 50 |
| Proliferación y expansión de la población I | 53 |
| Diferenciación de la población I | 60 |
| Resultados de la población II | 62 |
| Proliferación y expansión de la población II | 65 |
| XIII.- CONCLUSIONES GENERALES | 71 |
| Conclusiones generales de la población I | 71 |
| Conclusiones generales de la población II | 72 |
| XIV.- LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS | 73 |
| XV.- REFERENCIAS | 74 |

I.- RESUMEN

Las leucemias agudas son los padecimientos malignos más frecuentes en la infancia, constituyendo el 35% del cáncer en este grupo de edad. De las leucemias agudas, la leucemia mieloide representa el 15-20% de ellas. La incidencia es de 500 casos nuevos por año en los Estados Unidos, por lo que es un problema de salud importante. En México se sabe que las leucemias agudas también son el tipo de cáncer infantil más frecuente, y que el 20% de las leucemias agudas son leucemias agudas mieloides.

La leucemia Mieloide Aguda (LMA) es una enfermedad hematológica maligna de origen clonal originada en las células troncales hematopoyéticas y caracterizadas por un incremento en el número de células sanguíneas inmaduras tanto en Médula Ósea como en Sangre Periférica. Este padecimiento ha sido objeto de diversos estudios celulares y moleculares, en los que se ha descrito que las células troncales ó células madre, poseen diferentes anormalidades.

Diversos grupos de investigación han demostrado que mientras *in vivo* las células hematopoyéticas de LMA tienen altas tasas de proliferación, *in vitro* tienen comportamientos aberrantes. Uno de estos comportamientos ha sido claramente evidenciado por estudios realizados en nuestro grupo de trabajo utilizando dos subpoblaciones de células progenitoras hematopoyéticas provenientes de LMA de sujetos adultos. En estos estudios se encontró que dichas células tienen limitados sus potenciales de proliferación y expansión, en relación con la misma subpoblación proveniente de Médula Ósea Normal (MON), a pesar de ser cultivados en medios ricos en citocinas hematopoyéticas.

El objetivo de este trabajo es caracterizar las poblaciones más primitivas que dan origen a la leucemia mieloide aguda en niños y para cumplir el objetivo se pretende analizar el comportamiento *in vitro* de dichas muestras, y compararla con su contraparte normal así como con las alteraciones encontradas en LMA de adultos. Las poblaciones de células primitivas fueron

obtenidas por selección negativa con un cóctel de anticuerpos monoclonales, cultivadas en medio líquido en diferentes condiciones para calcular el incremento celular total en cada condición diferente, y se analizó su potencial de proliferación y expansión, para caracterizar a la población de células troncales de LMA infantil, ya que no existe información acerca del comportamiento biológico *in vitro* de estas células.

En este trabajo se pudieron obtener dos poblaciones primitivas enriquecidas en células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ y las enriquecidas en células CD34⁺CD38⁻Lin⁻, provenientes de médula ósea de pacientes pediátricos sanos y con leucemia mieloide aguda. Las diferentes poblaciones celulares se sometieron a tres cócteles diferentes de citocinas hematopoyéticas y se pudo observar que las poblaciones provenientes de células leucémicas, demostraron tener deficiente proliferación y expansión comparadas con su contraparte normal en condiciones *in vitro*. Otro hallazgo importante fue que las células leucémicas tendieron a diferenciarse en los cultivos hacia precursores monocitoides, mientras que su contraparte normal demostró capacidad de diferenciación hacia linaje monocitoide, eritroide y mixto.

Este estudio biomédico abrirá las puertas para estudios clínicos de manipulación biológica *in vitro* y para su aplicación en terapias que favorezcan la salud infantil.

II.- INTRODUCCIÓN

La Leucemia mieloide aguda constituye de 15 a 20% de las leucemias agudas en la infancia, con una incidencia es de 500 casos nuevos por año en Estados Unidos. (Margolin, et al 2006). En México, las leucemias agudas son también el tipo de cáncer más frecuente en la infancia y de acuerdo con algunos estudios epidemiológicos, su frecuencia oscila desde el 31.6 hasta el 51.4% del total del cáncer infantil según el estado de la república que se analice. Dentro de las leucemias agudas, las leucemias agudas mieloides constituyen alrededor del 20% de este cáncer en la infancia. (Fajardo-Gutiérrez, et al, 2007)

De acuerdo a los protocolos pediátricos más recientes de tratamiento, el 76% de los pacientes que alcanzan la remisión posterior a la inducción (protocolo CCG 2891) y la supervivencia libre de evento a 7 años se aproxima al 50% (protocolos MRC 10 y NOPHO-AML93). En la población adulta, tanto la incidencia como la mortalidad son mayores que en la edad pediátrica, tenemos que en los Estados Unidos en 2006 se detectaron 11,930 casos nuevos, y la mortalidad fue de 9,040 casos (Lie, 2005).

En cuanto a la remisión completa aunque el 60% a 70% de los adultos con LMA logran la remisión completa después de la inducción, menos de 20% de pacientes alcanzan supervivencia libre de evento a largo plazo y es conocido que la tasa de remisión de LMA en adultos está inversamente relacionada con la edad y que en la edad pediátrica los porcentajes de supervivencia global son mejores (Stone et al, 2004).

Al estudiar la biología de las células leucémicas entenderemos más sobre estas diferencias de comportamientos biológicos, es por ello que este estudio versa sobre el proceso por el cual se producen las células sanguíneas tanto normales como leucémicas; este proceso es conocido como hematopoyesis.

Todas las células presentes en la circulación sanguínea cumplen con funciones específicas que las hacen indispensable para la vida de un organismo. Las células rojas o eritrocitos transportan oxígeno a través del organismo; las plaquetas promueven la coagulación sanguínea; y las células blancas (que incluyen a linfocitos, monocitos y granulocitos) forman parte del

sistema inmune y protegen a los individuos contra el ataque de agentes extraños. Cada uno de estos tipos celulares es originado a partir de una pequeña subpoblación de células troncales hematopoyéticas, mediante un estricto proceso denominado hematopoyesis, mismo que para su estudio ha sido dividido en cuatro compartimientos (Mayani et al, 2003).

El primer compartimiento corresponde a Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), también nombradas células madre o células seminales, que representan aproximadamente 1 de cada 10^4 células contenidas en la médula ósea. Dichas células tienen morfología linfoblastoide, y funcionalmente son capaces de autorrenovarse y de dar origen a los diferentes tipos de células sanguíneas, es decir son multipotenciales. Inmunofenotípicamente esta subpoblación presenta los antígenos CD34, CD133, CD90 y CD117, y carece de la expresión de CD38, CD45-RA y HLA-DR (Engelhardt et al 2002).

El segundo compartimiento, esta compuesto por las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH), que constituyen el 0.3% del total de las células presentes en la medula ósea. Estas células mantienen la expresión del antígeno CD34 y adquieren la expresión de los antígenos CD38, CD45RA, y CD71. Funcionalmente, son capaces de formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos, y su potencial proliferativo es variable, pudiendo ser alto, intermedio o bajo. Las CPH dan lugar a células precursoras hematopoyéticas reconocibles por su morfología, mismas que finalmente originan a las células sanguíneas circulantes. (Mayani et al, 1993).

En la etapa postnatal mas del 90% de la actividad hematopoyética se realiza en el estroma de la médula ósea, dentro del tejido esponjoso de los huesos, en lo que se ha denominado microambiente hematopoyético (MH), el cual esta constituido por elementos de la matriz extracelular, células estromales y células accesorias quienes en conjunto son capaces de producir citocinas y matriz extracelular, que hacen del MH el nicho indispensable para la supervivencia, proliferación, diferenciación, expansión e incluso muerte, de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas (Nicola et al, 1989, Short et al, 2003)

Hasta la fecha mas de 30 citocinas hematopoyéticas han sido identificadas y estas moléculas se encargan de regular tanto positiva como

negativamente los diferentes eventos biológicos de las células hematopoyéticas (Mayani et al 2003). Algunas de ellas, ejercen sus efectos de manera muy temprana (Factores hematopoyéticos linaje no específicos) y algunas otras actúan solamente sobre progenitores hematopoyéticos comprometidos hacia una determinada línea de diferenciación (Factores hematopoyéticos linaje específicos) (Nicola et al, 1989, Tavassolo et al 1993), y varias de ellas son capaces de causar efecto tanto en CTH como en células comprometidas a algún linaje de diferenciación por lo que se pueden considerar citocinas de acción intermedia.

Dentro de las citocinas linaje no específicos se encuentran el Factor de Células Seminales (SCF), el Ligando de la Tirosina Fetal 3 (FIT3-L), la Trombopoyetina (TPO) y la Interleucina 6 (IL-6). Las citocinas de acción intermedia incluyen a la Interleucina 3 (IL-3) y al Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF), mientras que el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), el Factor Estimulante de Colonias de Monocitos (M-CSF) y la Eritropoyetina (EPO) se consideran factores hematopoyéticos linaje específico.

Cabe destacar que aunque son muy diversos los elemento que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células hematopoyéticas, y a pesar de que durante el proceso de maduración existe un estricto mecanismo de regulación, llegan a presentarse situaciones en donde el equilibrio se pierde, conduciendo a diferentes patologías hematológicas, dentro de las que se encuentra la Leucemia Mieloide Aguda.

La Leucemia Mieloide Aguda (LMA), se considera un trastorno clonal de las células troncales hematopoyéticas, caracterizada por una incrementada proliferación celular y que tiene como consecuencia la presencia de más del 30% de blastos en médula ósea. Clínicamente se trata de una enfermedad heterogénea que comprende ocho subtipos que van del M0 al M7, según la clasificación establecida por el Grupo de Cooperación de Francia, Estados Unidos y Gran Bretaña (FAB). Dicha clasificación se basa en la morfología, detección inmunohistoquímica de marcadores de linaje y el tipo celular anormal predominante (Hope et al 2003, Cheson et al 2003).

Este padecimiento se diagnóstica con mayor frecuencia en personas mayores de 25 años y su incidencia se incrementa con la edad, por lo que

comprende el 80% de las leucemias en adultos. En el caso de los niños, la LMA se presenta con mayor frecuencia entre los 2 y 5 años, diagnosticándose alrededor de 500 casos por año en los Estados Unidos, cifra que representa entre el 15 y 20% del total de las leucemias de la infancia (Woods et al, Bowen et al, 2006). Algunos datos demuestran que la edad al diagnóstico se puede utilizar como factor pronóstico en la supervivencia global de los pacientes menores de 10 años. Incluso se ha indicado que entre 1 y 2 años de edad se presenta menor carga tumoral y alteraciones citogenéticas, lo que plantea una mejor posibilidad de recuperación. (Webb et al, 2001)

El estudio hematopoyético de LMA en adultos ha permitido determinar que al igual que lo que sucede en la hematopoyesis normal la LMA se encuentra organizada en forma jerárquica, y se origina en una subpoblación con inmunofenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$ capaz de generar hematopoyesis leucémica en ratones inmunodeficientes SCID. A las células pertenecientes a ésta subpoblación se les ha denominado células iniciadoras de leucemia en ratones SCID (SL-IC), y dan lugar a una población con alto potencial proliferativo, capaz de mantenerse en cultivos suplementados con citocinas recombinantes denominadas células iniciadoras de cultivos en suspensión (SC-IC) (Lapidopt et al, 1994).

Al continuar con su proceso de maduración las SC-IC, dan lugar a una población más madura con inmunofenotipo $CD34^+CD38^+Lin^-$, incapaz de desarrollar hematopoyesis leucémica en ratones, pero capaz de generar colonias leucémicas, por lo que debe el nombre de Unidades Formadoras de Colonias de LMA (UFC-LMA). Esta subpoblación finalmente da lugar a blastos terminales, incapaces de formar colonias, pero con mayor estado de diferenciación que las células formadoras de colonias (Montesinos et al, 2002). Cabe mencionar que estudios realizados por Coulombel et al, han demostrado que cuando células de MO de sujetos adultos con LMA son mantenidas durante 4-6 semanas en cultivos a largo plazo tipo Dexter, las células progenitoras leucémicas son eliminadas en forma espontánea de los cultivos al tiempo que permanecen solo las células normales (Coulombel et al 1985). Estas observaciones indican que en LMA pueden coexistir la hematopoyesis normal y leucémica *in vitro*. Sin embargo no se conocen las condiciones precisas para poder mantener y expandir *in vitro* a la población residual normal.

Es conocido que tanto en la hematopoyesis normal como en la leucémica las células troncales expresan en su superficie el antígeno CD34, y carecen de la expresión de antígenos específicos de linaje así como del antígeno CD38. Sin embargo, diversos reportes de la literatura mencionan que células troncales CD34⁺CD38⁻Lin⁻ provenientes de LMA de adultos tienen incrementados los receptores para SCF (CD117) e IL-3 (CD123) y aunque ambas moléculas están relacionadas con estímulos a la proliferación, las células leucémicas son incapaces de proliferar de forma semejante a su contraparte normal. (Escribano et al 1998, Blair et al 2000, Jordan et al 2000, Delwel et al 1989). Contrario a estos datos, también se ha descrito que citocinas como IL-1, IL-3, IL-5, IL-11 y Eritropoyetina, son capaces de inducir proliferación en células de LMA, y en algunos de estos casos el efecto proliferativo está asociado a la inducción de otros estimuladores como GM-CSF, e IL6. (Motoji et al 1990, Bauman et al 1992, Birkekamp et al 1999, Kimura et al 1999).

En cuanto a las células CD34⁺ de LMA proveniente de pacientes pediátricos, se ha reportado que el antígeno CD117 puede ser considerado como un marcador específico de este tipo de leucemia, ya que se ha encontrado incrementado en los blastos del 82% de los pacientes (Uckan et al 2000), hecho que lo ha propuesto como un marcador de enfermedad mínima residual (Langebrake et al 2005).

Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la proporción de células CD34⁺ en AML es altamente variable (Montesinos et al 2006), ya que mientras en algunos casos el porcentaje de estas células es del 50% en otros, es de cero. Dicha diferencia en la expresión no correlaciona con la capacidad formadora de colonias característica de estas células (Montesinos et al, 2000). En el caso de LMA pediátrica, se ha encontrado que el antígeno CD34 está expresado en más del 20% de los casos y esta expresión fue frecuentemente asociada con los subtipos leucémicos M1, M2, y con la presencia de la translocación 8:21 t(8;21) (Sperling et al, 1995).

Por otra parte, cuando células progenitoras (CD34⁺CD38⁺Lin⁻) y troncales (CD34⁺CD38⁻Lin⁻) hematopoyéticas provenientes de pacientes adultos con LMA fueron cultivadas en presencia de diferentes combinaciones de citocinas para evaluar su capacidad de proliferación y expansión, se

encontró que mientras las células (CD34⁺CD38⁺Lin⁻) de médula ósea normal (MON) alcanzan una proliferación de 1150 veces más y una expansión de 103 veces, la misma subpoblación proveniente de LMA solo prolifera 2.1 veces más, mientras que no tiene ninguna expansión. En cuanto a la subpoblación más primitiva CD34⁺CD38⁻Lin⁻ los datos demuestran que mientras en MON las células proliferan 2341 veces, las células de LMA no muestran ningún incremento. Sin embargo, al evaluar la capacidad de expansión, los resultados indican que tanto la MON como la LMA se expanden 14 veces.

Estos resultados indican que a pesar de que las células troncales y progenitoras hematopoyéticas de LMA provienen de una condición tumoral (en donde *in vivo* se detecta una elevada tasa proliferación y expansión celular), *in vitro* tienen serias alteraciones numéricas y funcionales, y aunque existe abundante información acerca del comportamiento leucémico *in vitro* en adultos, (Giles et al., 2002) se desconocen muchos aspectos sobre la biología de las leucemias pediátricas.

III.- MARCO TEÓRICO

Es conocido que la LMA resulta de la transformación clonal de una célula troncal hematopoyética $CD34^+CD38^-Lin^-$, que ha mostrado tener diversas anormalidades en cultivos *in vitro*, mismas que se presentan a pesar de mantenerse bajo estímulos de citocinas reguladoras de la hematopoyesis. Se ha demostrado que la hematopoyesis en LMA de adultos además de encontrarse jerarquizada presenta serias alteraciones numéricas y funcionales en respuesta a diferentes estímulos con citocinas. Es posible que en su contraparte pediátrica la hematopoyesis leucémica presente características particulares que no comparta con su contraparte en LMA de adultos y normal, sin embargo, a pesar de que existe abundante información sobre LMA en adultos, el caso específico de LMA pediátrica ha sido poco abordado en la literatura y particularmente se desconocen los efectos de diferentes citocinas en el comportamiento biológico de los blastos leucémicos, e incluso no se ha reportado si la jerarquía hematopoyética descrita en LMA de adultos, se presenta también en la LMA pediátrica. Por lo anterior, el estudio de las subpoblaciones de células troncales (con inmunofenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$) y progenitoras (con inmunofenotipo $CD34^+CD38^+Lin^-$) hematopoyéticas en LMA infantil, permitirá entender las diferencias básicas de esta patología con su contraparte adulta e incluso podría a largo plazo plantear la posibilidad de abordar la enfermedad desde un punto de vista más particular y de acuerdo con las características propias de estas dos subpoblaciones, que podrían ser consideradas como punto inicial de la transformación maligna.

1.- Hematopoyesis

Todas las células presentes en la sangre se derivan de una pequeña población celular conocida como células troncales, células madre o células seminales hematopoyéticas, las cuales en la vida post natal se encuentran en la médula ósea. Las células troncales hematopoyéticas dan lugar a las células progenitoras, que proliferan y maduran dando lugar a los precursores hematopoyéticos y posteriormente a todos los linajes sanguíneos y tipos de células maduras de la sangre reconocibles por su morfología y funciones especializadas. Todo esto ocurre mediante un proceso conocido como

hematopoyesis. Debido a que todas las células maduras de la sangre periférica tienen un periodo de vida limitado, es necesaria su constante producción y para ello el sistema hematopoyético es capaz de regular, mediante mecanismos complejos, los procesos de autorenovación, expansión, compromiso, y supervivencia celular (Till y McCulloch, 1990)

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) así como 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 se emiten señales que hacen que las células hematopoyéticas sean capaces de proliferar y diferenciarse hacia los distintos linajes sanguíneos, mediante el contacto con moléculas especializadas o (Wilson y Trumpp 2006) células estromales o por influencia de las citocinas y matriz extracelular presentes en dicho microambiente (Morrison y Spradling, 2008).

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 ese proceso. En condiciones normales, existe un balance entre las citocinas estimuladoras e inhibidoras, lo que da como resultado la producción controlada de las células sanguíneas.

Las células que forman el sistema hematopoyético se pueden agrupar en cuatro compartimientos: El primero corresponde a las células seminales o madre o troncales hematopoyéticas (CTH) con capacidad de autorenovación y de dar origen a todas las células de la sangre durante la vida del individuo (McCulloch, 1993). Estas constituyen 1 de cada 10^4 células contenidas en la médula ósea y tienen morfología linfoblastoide. El segundo compartimiento corresponde a las células progenitoras (CPH) con características de pluripotencialidad, bipotencialidad y monopotencialidad (Ogawa 1983). En conjunto, las CPH constituyen el 0.3% de las células de la médula ósea. El tercer compartimiento corresponde a las células precursoras, las cuales son reconocibles por su morfología y corresponden a >99.5% de las células presentes en la médula ósea. Y finalmente las células maduras circulantes,

(cuarto compartimiento) que representan el último estadio de la maduración de los elementos hematopoyéticos. Este modelo de clasificación indica que existe una jerarquía hematopoyética, en donde las células seminales o troncales son los elementos más primitivos y que dan lugar a la formación de todos los constituyentes del sistema hematopoyético.

Tanto las CTH como las CPH tienen una morfología linfoblastoide, por lo que no es posible distinguirlas a través de la microscopía de luz, sin embargo su identificación, purificación y caracterización ha sido posible mediante estudios de inmunofenotipo 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 CTH, 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 Landsorp, 1994). Conforme las CTH se diferencian y dan lugar a la formación de CPH, adquieren la expresión de moléculas como CD38, CD45RA, CD71 y otras más, perteneciendo a linajes específicos; por ejemplo CD4, CD8 en linfocitos T, CD 19 y CD 20 en linfocitos B, CD 15 CD 14 y CD 33 en células mieloides, CD41 y CD 42 en megacariocitos (Terstappen 1991)

Existen actualmente diversos métodos funcionales para la identificación y cuantificación de las CTH. Entre ellos, destaca el sistema *in vivo* que identifica a las células por su 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). Este modelo consiste en la irradiación subletal de ratones SCID y la inyección intravenosa de células hematopoyéticas humanas, dentro de las que se encuentran células troncales y progenitoras. Generalmente se requiere de la administración de factores de crecimiento hematopoyético humanos, como el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y de interleucina 3 (IL-3), entre otros, para el óptimo desarrollo de 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 CTH de entre los distintos tipos celulares hematopoyéticos caracterizados.

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 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 éstas últimas son menos primitivas que las SRC.

En cuanto a las CPH, su identificación y cuantificación es realizada por otros métodos, principalmente a través de su capacidad para formar colonias hematopoyéticas en cultivos semisólidos (metilcelulosa o agar), de ahí que son conocidas como células formadoras de colonias CFC; (Metcalf, 1977)

2.- Mielopoyesis

Como primer paso en la producción del linaje mieloide, las CTH, dan lugar a los progenitores mieloides, y posteriormente a las células precursoras mieloides comunes (CFU-GEMM o unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, macrófagos y megacariocitos). Las CFU-GEMM se diferenciarán hacia los diferentes linajes, como eritroides, granulocito/monocíticas, y megacariocíticas, las cuales al diferenciarse, tendrán funciones especializadas. Se considera que los programas de diferenciación celular se mantienen en enfermedades malignas clonales mieloproliferativas como las leucemias mieloides crónicas, pero en las leucemias mieloides agudas, lo que se evidencia es una maduración deficiente, y las células características o blastos, son detenidas en la cascada de la hematopoyesis mieloide. (Fey, 2007)

Formación de la serie eritroide

La eritopoyesis es el proceso por el cual se producen células maduras conocidas como eritrocitos. Los eritrocitos, glóbulos rojos o hematíes, son los

elementos formes cuantitativamente más numerosos de la sangre. La hemoglobina es su principal componente y su objetivo es transportar el oxígeno hacia los diferentes tejidos del cuerpo. (Brady 2006)

Se han descrito 2 clases de progenitores eritroides: los BFU-E por sus siglas en ingles (Burst forming units erythroid), los cuales son los progenitores más tempranos, comprometidos exclusivamente con la diferenciación eritroide, y originan colonias productoras de hemoglobina. La segunda clase de progenitores eritroides consiste en las CFU-E por sus siglas en ingles (Colony forming units erythroid), los cuales se consideran un poco más diferenciados que los anteriores. (Urabe, 1979)

Para el desarrollo eritroide, es necesaria la estimulación con eritropoyetina, (EPO) la cual juega un papel fundamental a nivel de BFU-E y CFU-E, sin embargo no determina el linaje a nivel de las CTH. Además de la EPO, citocinas como interleucina 3 (IL-3), trombopoyetina (TPO), ligando de la tirosina fetal 3 (FLT-3L) y el factor de células seminales (SCF) participan también en la eritropoyesis; estas citocinas son capaces de sinergizar con EPO y regular la proliferación, diferenciación y sobrevivencia de células progenitoras y precursores eritroides. (Mayani et al, 2007)

Las células del linaje eritroide se identifican por la pérdida gradual de CD45 (Loken et al, 1987). Solo los precursores eritroides y los proeritroblastos que son CD 117+ y CD71+, expresan una pequeña proporción de CD45. Durante la maduración de los precursores eritroides, se incrementa la expresión del receptor de transferrina (CD71) y de glicoforina A, (CD235a) y al formarse los eritrocitos, éstos siguen presentando CD235a pero pierden CD71 al expulsar el núcleo. (van Lochem et al, 2004)

Pueden existir variaciones o anormalidades en el desarrollo del linaje eritroide, por ejemplo en los casos de anemia aplásica o síndromes mielodisplásicos se puede incrementar la población de células eritroides nucleadas, posterior a la administración de fármacos mielosupresores en pacientes pediátricos o en los pacientes con tratamiento para leucemias agudas. (van Wering et al 2001)

Formación de la serie granulocito-monocítica

La serie granulocito-monocítica incluye a las células conocidas como monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Brady, 2006). La función de estas células es proteger al organismo contra la invasión microbiana. Estas células provienen de progenitores, los cuales incluyen unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas (del inglés CFU-GM), que a su vez dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (del inglés CFU-G) y unidades formadoras de colonias monocíticas (del inglés CFU-M). Una vez en la vía de diferenciación, las CFU-G dan lugar a mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos y células maduras (eosinófilos, neutrófilos y basófilos). Mientras que las CFU-M dan lugar a monoblastos, promonocitos, monocitos, y finalmente macrófagos. (Mayani et al, 2007)

Cuando los progenitores hematopoyéticos se diferencian hacia granulocito/monocitos, adquieren marcadores específicos como la mieloperoxidasa o CD38. Los marcadores “tardíos” como CD11b o fosfatasa alcalina leucocitaria se encontrarán aun presentes en los granulocitos maduros. La regulación y el balance sobre ciertos genes, también es necesaria para la formación de granulocitos, por ejemplo, el balance entre PU.1 y GATA-1 puede hacer que la célula se incline hacia la multipotencialidad o hacia el comprometimiento hacia macrófagos (Iwasaki et al, 2007).

Actualmente se cree que este proceso es reversible, lo que podría sugerir que la expresión génica podría oscilar de acuerdo a las condiciones celulares. (Liew et al, 2006) Otros elementos importantes en la decisión de la célula hacia el comprometimiento hacia macrófagos o hacia neutrófilos requiere de factores de transcripción como PU.1 y C/EBP α respectivamente. Las células de este compartimiento (mielo-monoblastos) expresan CD45, sin embargo este antígeno se encuentra disminuido en las formas muy inmaduras de este linaje (progenitores) (Zhang et al, 2004).

Conforme avanza el proceso de maduración, las células granulocito-monocíticas expresarán CD13, CD33 y CD117 y perderán la expresión de CD34. La expresión de CD45 aumenta conforme las células maduran, además presentan CD14, que es un receptor de lipopolisacáridos que se expresa en monocitos. Una diferencia entre las células de este linaje, es que en contraste

con los neutrófilos, las células monocitoides retienen la expresión de HLA-DR durante su maduración.

En cuanto a las alteraciones que pueden surgir durante este proceso, se encuentra la sobreproducción de monoblastos o de promonocitos, lo cual se presenta en la leucemia mieloide aguda, subtipos M5a y M5b. Otras anormalidades que podrían presentarse, sobre todo en las leucemias mieloides agudas, es la maduración asincrónica de estas células donde las anormales presentan coexpresión de CD34 y CD11b o de CD34 y CD15, así como la coexpresión de marcadores de otros linajes como CD19, CD2, o CD7. (Hrusak et al 2002, Drach et al 1992)

En los pacientes con síndrome mielodisplásico se altera la relación y frecuencia de monocitos en la médula ósea, es más, el número de monocitos o la ausencia de ellos puede servir para distinguir entre los diferentes síndromes mielodisplásicos. (Feldman et al 1993)

Formación de la serie megacariocítica

La formación de las plaquetas se conoce como megacariopoyesis, este proceso es de suma importancia debido a que las plaquetas juegan un papel importante en la hemostasis por su capacidad de adhesión al endotelio vascular y la liberación de sustancias coagulantes.

Los progenitores se comprometen al linaje megacariocítico al diferenciarse en promegacarioblastos, que madurarán hacia megacariocitos. Las plaquetas son fracciones celulares derivadas del citoplasma de los megacariocitos. Un adulto normal produce al día aproximadamente 1×10^{11} plaquetas para mantener una cuenta normal de plaquetas (150×10^9 a 400×10^9 por litro). El principal regulador de la producción plaquetaria es la trombopoyetina (TPO), una glicoproteína ácida producida principalmente en el hígado, riñón y médula ósea. El receptor de la TPO es producto del protooncogen *c-Mpl*. (Kaushansky, 2005)

Estudios realizados en el ratón y en el humano demuestran que bajo condiciones normales las células estromales de la médula ósea presentan niveles bajos de mRNA para TPO, mientras que cuando existe trombocitopenia se incrementan los niveles de transcritos de TPO. (Sungaran et al, 1997). La IL-6 tiene un papel importante sobre la producción de TPO,

esto se ha demostrado en modelos murinos y en los pacientes con cáncer a los que se les administra IL-6, observándose un incremento de mRNA de TPO en el hígado, así como niveles incrementados de TPO en sangre periférica. (Kaser et al 2001)

3.- Citocinas que regulan la hematopoyesis

El funcionamiento del sistema hematopoyético, depende de reguladores intrínsecos (Factores de transcripción nuclear y moléculas citoplásmicas) los cuales son modulados por señales externas, provistas por citocinas, y matriz extracelular. Actualmente se reconocen más de 30 citocinas hematopoyéticas y que se encargan de regular tanto de manera positiva como negativa la supervivencia, proliferación, diferenciación y muerte de células hematopoyéticas (Mayani et al, 2003) Algunas de las citocinas hematopoyéticas ejercen su efecto sobre las CTH (Factores hematopoyéticos linaje no específicos) y algunas otras actúan directamente sobre progenitores hematopoyéticos comprometidos a una determinada línea de diferenciación (Factores hematopoyéticos linaje específicos) (Tavassoli, 1993, Nicola 1989). Aunque también existe interacción entre los diferentes factores de crecimiento, algunas de las principales citocinas hematopoyéticas son las siguientes:

- SCF (Factor de células seminales, factor Steel, ligando de kit y/o factor de crecimiento de células cebadas)

Descripción

SCF es un factor de crecimiento hematopoyético que tiene actividades de señalización a través de receptores de c-Kit. SCF y c-Kit son esenciales para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas comprometidas a melanocitos y células germinales.

Estructura

En el humano, el gen para SCF codifica para una proteína transmembrana de 273 aminoácidos. La forma soluble del SCF se genera por un proceso proteolítico de su precursor en la membrana celular. La forma recombinante de SCF es un polipéptido de 18.4kDa que contiene 165 residuos de aminoácidos. El SCF es producido en forma soluble y transmembranal como producto de *splicing* alternativo del mismo gen.

Función

Dentro de las funciones que desempeña se encuentra la formación de los eritrocitos, y la ausencia de SCF o de su receptor c-Kit resulta en mortalidad perinatal de ratones.

En combinación con otras citocinas, SCF resulta en un incremento en la proliferación, diferenciación y supervivencia de varios linajes hematopoyéticos. Esta sinergia en particular con G-CSF es muy significativa en la hematopoyesis normal, y de manera adicional, está implicado en la movilización de sangre periférica para transplantes, a través de la regulación de p27 y la fosforilación de STAT 3 (Kaser et al, 2001)

In vitro, tiene funciones en la expansión de células humanas hematopoyéticas primitivas, y es un potente factor de supervivencia de las CTH, así como de los linajes comprometidos (Roy-Keller y Linnekin, 2001)

- IL-6 (IFN- β 2, Factor de diferenciación de células B, BCDF, BSF-2,HPGF,HSF,MGI-2)

Descripción

IL-6 es una citocina pleiotrópica que está involucrada en la respuesta del huésped ante patógenos, en la hematopoyesis e inflamación. (Lukaszewicz et al, 2007)

Estructura

La IL-6, es una glicoproteína de 26 KDa de peso molecular, compuesta por 184 aminoácidos. En el humano, el gen que codifica a la IL-6 se encuentra localizado en el cromosoma 7p15-p21, y tiene semejanza con el que codifica para el factor estimulador de las colonias de granulocitos, lo cual explica las similitudes entre ambas citocinas.

Función

La IL-6 actúa sobre un receptor tipo I, el cual se expresa en células linfoides y no linfoides. Existen 2 tipos de receptores de IL-6: el IL-6R, que es de baja afinidad y el cual una vez unido a él, forma un complejo y activa una tirosina cinasa. El segundo tipo de receptores es el de la forma soluble, el cual se une al receptor de la membrana y señala. (Heinrich et al, 2003)

La IL-6 se produce principalmente por monocitos y macrófagos, y en una menor proporción por fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y B, condrocitos y células amnióticas. La producción de IL-6 es estimulada por IL-1 e IFN, así como por TNF, lipopolisacáridos y virus. IL-6 es importante porque induce a los linfocitos B para diferenciarlos hacia células plasmáticas las cuales producen diversas clases de inmunoglobulinas. (Hoischen et al, 2000)

IL-6 estimula a los linfocitos T para que produzcan IL-2, y en cuanto a la hematopoyesis, y en conjunto con la IL-3, activan la proliferación y diferenciación de progenitores tempranos, de manera más temprana en los progenitores de megacariocitos, para la producción de plaquetas, además estimula a progenitores eritroides, y de granulocitos-macrófagos (Hsu et al, 2002)

• TPO (trombopoyetina, factor estimulador de colonias de megacariocitos, ligando de c-MPL MGDF)

Descripción

TPO es un factor de crecimiento linaje específico producido en hígado, riñones y músculo esquelético.

Estructura

La TPO es una glicoproteína de 332 aminoácidos (95kDa) que contiene 2 dominios: uno con homología a la eritropoyetina y otro rico en carbohidratos. (Bartley et al 1994) El receptor de la TPO, conocido como c-Mpl, se encuentra en el sistema hematopoyético en las células troncales, progenitoras y plaquetas (Li et al, 1999)

Función

Aunque la TPO promueve la viabilidad de las células troncales y de los progenitores tempranos de todos los linajes, su mayor efecto lo ejerce sobre las células formadoras de colonias de megacariocitos (Meg-CFCs), favoreciendo la producción de megacariocitos maduros y plaquetas.

En condiciones normales, la TPO se une a su receptor en los megacariocitos y plaquetas, se introduce y es degradada.

No se ha descrito un sistema que cense los niveles de TPO como el demostrado para la eritropoyetina y que depende de la regulación renal.

• Flt-3L (Ligando de tirosina fetal 3)

Descripción

Flt-3L es un factor de crecimiento que regula la proliferación de células hematopoyéticas primitivas.

Estructura

Se han descrito múltiples isoformas de Flt-3L, la isoforma biológicamente predominante, se une a la superficie celular por una proteína transmembrana de 209 aa

Función

Flt-3 por sí solo, no estimula la proliferación de las células hematopoyéticas primitivas, pero sinergiza con otros factores de crecimiento e interleucinas para inducir crecimiento y diferenciación. (Pirog et al, 2006)

La expresión aberrante de Flt-3 (casi siempre causado por las duplicaciones internas en tandem del gen) es la anomalía genética más común en las LMA, y se asocia a con un pronóstico clínico desfavorable.

• IL-3

Descripción

Factor hematopoyético de crecimiento que promueve la supervivencia, diferenciación y proliferación de células progenitoras comprometidas.

Estructura

La IL-3 humana es una proteína de 15 kDa y contiene 133 residuos de aminoácidos

Función

Es producida en su mayoría por los linfocitos T activados y también por mastocitos. Induce la proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos tempranos de todas las series sanguíneas. Induce fundamentalmente la hematopoyesis en situaciones de estrés que requieren una respuesta rápida, siendo menos claro su papel en la hematopoyesis constitutiva.

• GM-CSF

Descripción

GM-CSF es una citocina que funciona como factor de crecimiento y estimula a las células hematopoyéticas a producir granulocitos y monocitos. Los monocitos salen a la circulación y migran a los tejidos donde maduran hacia macrófagos.

Estructura

Polipéptido de 144 aminoácidos, dos sitios de glicosilación y dos uniones disulfuro intracatenarios. El GM-CSF tiene un peso molecular que varía de 14 a 30 KDa, debido a su glicosilación cambiante más del 50% de la molécula está constituida por carbohidratos. La forma activa se encuentra de manera extracelular como un homodímero. (Kubota et al,1990)

Función

Es producido por linfocitos T activados y por otras células como fibroblastos, células endoteliales y monocitos. Induce la proliferación de los progenitores de granulocitos y macrófagos, produciéndose en respuesta a estímulos específicos en situaciones que requieren una elevada producción de éstas células. También puede actuar sobre granulocitos y macrófagos maduros.

• G-CSF (CSF-3,MGI-1G)

Descripción

Factor hematopoyético que estimula el desarrollo de progenitores comprometidos hacia neutrófilos y estimula las actividades funcionales de las células maduras.

Estructura

Proteína globular de 19 kDa que contiene 174 residuos de aminoácidos

Función

Es producido por fibroblastos, células endoteliales y monocitos en respuesta a estímulos específicos. Actúa sobre los precursores hematopoyéticos de los granulocitos y sobre los granulocitos maduros. La granulocitosis asociada a ciertas infecciones se debe a que el LPS de las paredes bacterianas es un potente inductor de la producción de esta citocina. Se han descrito otras funciones de este factor, como la estimulación de la fagocitosis y de la citotoxicidad mediada por anticuerpos.

El G-CSF induce la proliferación de los progenitores granulocíticos, y su diferenciación a granulocitos maduros y el comprometimiento hacia la actividad funcional característica (quimiotaxis, fagocitosis, etc.). El G-CSF recombinante se utiliza en la práctica clínica para movilizar células troncales a la circulación periférica.

Las bases moleculares de la movilización de las células troncales con G-CSF ha sido atribuida a la liberación de enzimas proteolíticas como elastasa, catepsina G, proteinasa 3 y gelatinasa B (MMP-9) por células mieloides maduras, lo cual facilita la salida de las CTH del microambiente hematopoyético hacia la sangre periférica. (Lapidopt et al, 2002)

El G-CSF fue el primer factor de crecimiento hematopoyético en ser aislado y clonado. (Möhle et al, 2007) El G-CSF recombinante se usó inicialmente para acortar la duración de los periodos de neutropenia posterior a la quimioterapia (Gabilove et al, 1998)

• EPO (Eritropoyetina)

Descripción

La eritropoyetina es una hormona que se produce en el riñón y que se libera a la circulación sanguínea alcanzando sus células blanco en la médula ósea, particularmente en respuesta a la hipoxia.

Estructura

Eritropoyetina es una hormona glicoprotéica de 30.4 kDa de 166 aminoácidos

Función

La EPO actúa en las células a través del receptor de eritropoyetina (EpoR), y cuando EpoR es activado, se activa a su vez Stat5, que es un factor de transcripción citoplasmático. Stat5, se une a tirosinas fosforiladas en el receptor EpoR, o cual resulta en la dimerización y translocación al núcleo para mediar la transcripción de genes específicos. (Socolovsky et al, 2001)

4.- Leucemogénesis

Las células troncales leucémicas (LSCs) son definidas por su habilidad de propagar la clona leucémica a través de xenotransplante en ratones inmunosuprimidos. (van Etten, 2007) En LMA solo los blastos que expresan el inmunofenotipo $CD34^+CD38^-Lin^-$, son capaces de transferir la leucemia en

ratones SCID (Lapidopt et al 1994). Las LSCs se han postulado como las responsables de las recaídas de la enfermedad que siguen a una terapia de inducción a la remisión con fármacos citotóxicos o terapias blanco, por lo que su erradicación es necesaria para asegurar una cura permanente.

Se postula que si se altera la autorenovación, (habilidad de reconstituir la hematopoyesis), en las células troncales normales, se generan mecanismos responsables de la producción de células leucémicas en el ratón. En cuanto a la sobreexpresión de genes, la familia Hox (HoxB4 y HoxA9) causa al sobreexpresarse, expansión de células troncales hematopoyéticas de médula ósea, tanto *in vitro* como *in vivo*. (Antonchuk et al, 2002)

La sobreexpresión de β -catenina mutante en las CTH, induce su expansión, mientras que la expresión de antagonistas de β -catenina, bloquea la proliferación de CTH, así como su función de repoblación (Reya et al 2003) En las leucemias agudas, las LSCs cuentan con vías que se encuentran en las CTH, pero son desencadenadas sin control por estímulos que generan una autorenovación descontrolada, por ejemplo el factor de transcripción NF- κ B se encuentra activo de manera constitutiva en la mayoría de las CTH de LMA, mientras que este fenómeno no se ha demostrado en las CTH normales (Guzman et al, 2001)

En ratón, se han hecho modelos retrovirales de leucemogénesis, basados en activación de factores de transcripción, como MLL-ENL y MLL-AF9 (Kristov et al, 2006). En ese trabajo parten del conocimiento de que el gen *MLL* puede conferir algunas propiedades de células leucémicas a progenitores hematopoyéticos comprometidos, y se preguntan si sería posible que la población de células que origina la leucemia pudiera originarse a partir de progenitores comprometidos para un linaje, siempre y cuando posean los factores de transcripción MLL-ENL o MLL-AF9. Kristov y sus colaboradores demuestran en su trabajo que la población de células troncales leucémicas también puede ser generada a partir de progenitores comprometidos y contrario a lo que conocía anteriormente, el programa génico de autorenovación (necesario para iniciar la leucemia) se activa durante el proceso de leucemogénesis. Estos experimentos demuestran que los progenitores mieloides comprometidos que, por definición carecerían de la capacidad de

inducir la leucemia, actualmente podrían proponerse como células generadoras de leucemia.

5.- Diferencias hematopoyéticas de acuerdo a la edad de presentación de la LMA

Existen diferencias clínicas, epidemiológicas y moleculares entre los individuos con LMA de acuerdo a la edad de presentación de esta enfermedad.

Diferencias en incidencia

A continuación describiremos algunos datos estadísticos de Estados Unidos, ya que en ese país se tienen datos más puntuales. Aproximadamente 6500 niños y adolescentes en presentan leucemia aguda cada año. La LMA comprende del 15-20% de estos casos. La incidencia de la LMA pediátrica se estima entre 5 y 7 casos por millón de individuos por año, con un pico de incidencia de 11 casos por millón a los 2 años de edad, la incidencia alcanza su punto mas bajo a los 9 años. (Rubnitz et al, 2008)

Aun dentro de la población pediátrica, existen factores pronósticos para predecir si el paciente presentará o no recaídas, estos factores son: citogenética, cuenta de leucocitos al diagnóstico, subtipo de la FAB, y en estudios actuales se ha demostrado que los pacientes mayores de 10 años tendrán peor pronóstico que los pacientes menores de 10 años (OR= 1.8; con intervalo del confianza al 95%: 1.3-2.6; $p = .005$). (Bassem et al, 2006)

La LMA es el tipo de leucemia aguda más común en los adultos, y aproximadamente cada año 11500 adultos presentarán leucemia mieloide aguda. La incidencia en adultos menores de 65 años de 1.8 por 100 000 personas, mientras que la incidencia en mayores de 65 años fue de 17 casos por 100 000. El pronóstico en los adultos es inversamente proporcional a la edad.(<http://www.cancer.gov/cancertopics>)

El tratamiento inicial para los pacientes menores de 60 años, consiste en quimioterapia citotóxica y puede curar al 20-75% de ellos, mientras que en los mayores de esta edad, solo el 10% de los enfermos podrán ser curados con quimioterapia. (Estey et al, 2006)

Mortalidad

Se reporta que del 2000 al 2003, la mortalidad ajustada por edad a causa de LMA fue de 2.7 por 100 000 personas, y como en el caso de la incidencia, la mortalidad asociada a LMA varía con la edad. En EU la mortalidad incrementa con la edad, la cual muestra un pico de 17.6 por 100 000 personas en pacientes mayores de 80 años (Deschler et al, 2006)

Cambios celulares de acuerdo a la edad

Se han realizado estudios que relacionan el envejecimiento de las CTH con las diferencias que existen en la respuesta del sistema hematopoyético. El daño acumulado al DNA causa que se deplete la reserva de células troncales y esto se ha propuesto por los investigadores como una de las causas del envejecimiento. Se propone específicamente a la ligasa IV del DNA, que está encargada de la reparación de la doble cadena del DNA en modelos murinos. La mutación de Lig4^{Y288C} da como resultado un modelo de ratón con inmunodeficiencia y alteraciones en el crecimiento, con pérdida progresiva de la celularidad de la médula ósea y defectos importantes en las funciones tisulares y en la capacidad de células progenitoras hematopoyéticas de repoblar la hematopoyesis en modelos de trasplante. (Woodbine et al, 2007)

Una de las características principales del envejecimiento es la disminución en la capacidad de mantener la homeostasis. Las células troncales regulan la homeostasis tisular, y la depleción de las reservas de células tallo y/o la disminución de su función, se han postulado para contribuir al envejecimiento. Se ha sugerido que la acumulación de daño al DNA podría ser el mecanismo principal debido al cual las células hematopoyéticas troncales se deterioran, se ha postulado que el daño endógeno al DNA se acumula con la edad en las células troncales hematopoyéticas, lo cual hace cada vez más difícil que las células recuperen la homeostasis después de ser expuestas a daño agudo y repetitivo. (Rossi et al, 2007)

IV.- ANTECEDENTES

Proliferación de células leucémicas *in vitro*

Hallazgos recientes por nuestro grupo de trabajo, han demostrado que poblaciones de células hematopoyéticas primitivas ($CD34^+CD38^+Lin^-$ y $CD34^+CD38^-Lin^-$) provenientes tanto de leucemia mieloide crónica (LMC), (Chávez-González et al, 2004) como LMA (Montesinos et al, 2006) presentan serias alteraciones numéricas y funcionales *in vitro*. Por un lado, mientras que para la LMA existe gran heterogeneidad en el número de células ($CD34^+CD38^+Lin^-$ y $CD34^+CD38^-Lin^-$) presentes en médula ósea, para LMC se registró que ambas subpoblaciones se encuentran incrementadas. Por otra parte, cuando ambas subpoblaciones son cultivadas en presencia de una combinación de 8 citocinas estimuladoras de la hematopoyesis, encontramos que tanto las células provenientes de LMC como las de LMA mostraron severas limitaciones en sus potenciales de proliferación y expansión en relación con los detectados en las mismas subpoblaciones provenientes de médula ósea normal. Es importante mencionar que aunque en ambas patologías las mayores deficiencias se registran en la subpoblación celular más primitiva ($CD34^+CD38^-Lin^-$), la LMA tiene deficiencias funcionales mucho mayores que las que se observan en LMC, como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Cinéticas de proliferación en células hematopoyéticas primitivas provenientes de pacientes adultos con LMA, LMC y normales

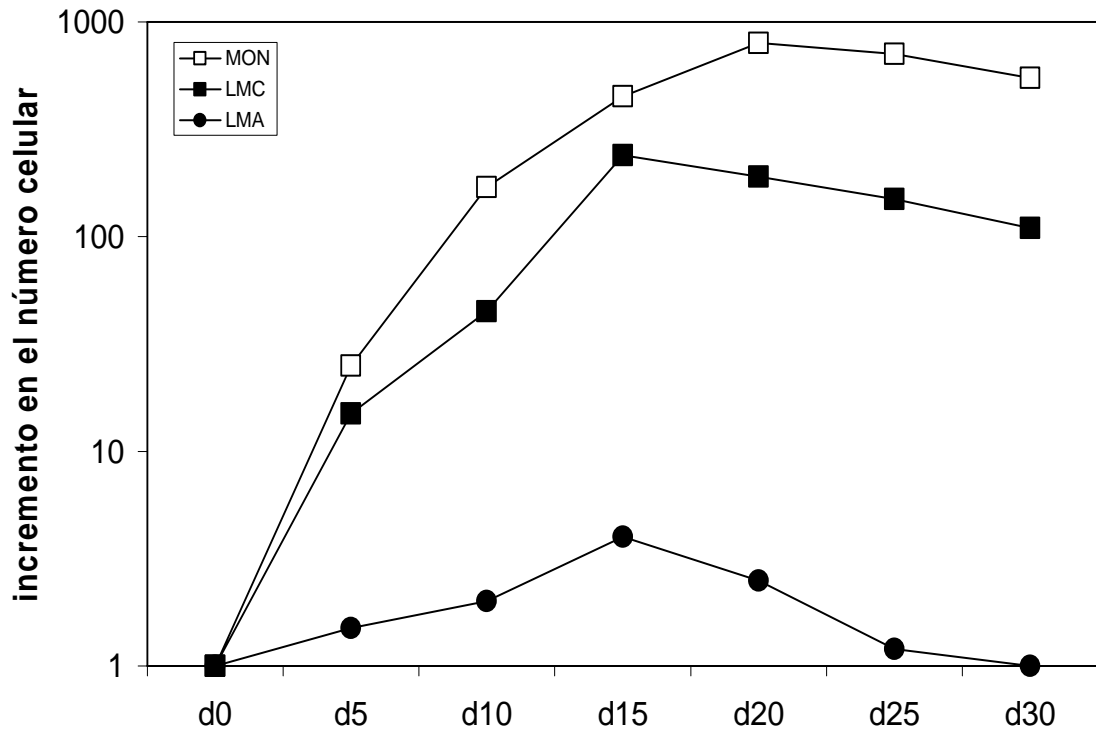


Fig.1 Cinéticas de proliferación, en cultivos líquidos suplementados con citocinas recombinantes de poblaciones celulares enriquecidas en células hematopoyéticas primitivas obtenidas de médula ósea normal (MON), LMC y LMA. En esta gráfica se observa en el eje de las X el tiempo, graficado como días de cultivo, y en el eje de las Y el incremento en el número celular, las curvas de la cinética de proliferación corresponden a células enriquecidas en células $CD34^+CD38^-Lin^-$ provenientes de médula ósea normal de adultos, de pacientes adultos con LMC y de pacientes adultos con LMA. Todas las células fueron expuestas a un coctel con 8 citocinas hematopoyéticas (Figura basada en los trabajos de Montesinos et al, 2006 y Chávez-González et al, 2004)

En la figura 1 se observa que las células provenientes de médula ósea normal de adultos (cuadros vacíos) es capaz de proliferar en condiciones *in vitro* con un incremento máximo hasta de 1000 veces el número celular día 20 de cultivo. Esto contrasta con las células provenientes de pacientes adultos con

LMC (cuadros negros) que tienen un potencial máximo de proliferación hasta de 120 veces en el número celular y contrasta aún más con las células provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda, (círculos negros) donde se registran potenciales de proliferación muy deficientes que no son capaces de alcanzar las 10 veces incremento de número de células.

Estos datos, aunados a la información contenida en la literatura, sugieren que las subpoblaciones hematopoyéticas de LMC y LMA tienen alteraciones funcionales que les impiden responder a los estímulos proporcionados por las citocinas añadidas *in vitro*, sin embargo hasta la fecha se desconoce que sucede con las células provenientes de pacientes pediátricos, dado que el comportamiento clínico de estos mismos padecimientos es diferente de acuerdo a los grupos de edad, por ello este estudio biomédico abre las puertas a una línea de investigación pediátrica que contribuye al conocimiento.

V.- JUSTIFICACION

La Leucemia Mieloide Aguda representa entre el 15 y 20% del total de las leucemias de la infancia, y aunque el estudio de la hematopoyesis tanto normal como leucémica ha permitido entender a esta patología como un proceso aberrante iniciado en una célula troncal hematopoyética, la información reportada en la literatura se ha enfocado particularmente a la hematopoyesis adulta, y aún existen importantes interrogantes acerca del origen, desarrollo y mecanismos responsables de la enfermedad en niños.

Este proyecto pretende analizar la respuesta biológica a tres diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas en cuanto a proliferación, expansión y diferenciación de poblaciones enriquecidas en células $CD34^+CD38^+Lin^-$ y en células $CD34^+CD38^-Lin^-$ hematopoyéticas provenientes de pacientes pediátricos con Leucemia Mieloide Aguda.

El presente trabajo pretende profundizar en el conocimiento de la biología básica de la enfermedad, por medio del análisis de dos diferentes compartimentos hematopoyéticos, lo cual permitirá sentar bases que sumadas al avance del conocimiento podrán plantear la posibilidad de que a mediano o largo plazo se pueda realizar manipulación biológica *in vitro* de estas células y aplicarlas en terapias que favorezcan la salud infantil.

VI.- PREGUNTA DE INVESTIGACION

Pregunta general

¿Cuál es el potencial proliferativo, de expansión y diferenciación de dos poblaciones celulares hematopoyéticas enriquecidas en células troncales y progenitoras provenientes de Leucemia Mieloide Aguda y Médula Ósea Normal pediátricas en condiciones *in vitro*?

Preguntas específicas

¿Cuál es la capacidad de proliferación de las poblaciones de células hematopoyéticas enriquecidas en $CD34^+CD38^+Lin^-$ y de la población enriquecida en células $CD34^+CD38^-Lin^-$ provenientes de pacientes pediátricos con LMA, y sanos en respuesta a dos diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas?

¿Cuál es el potencial de expansión y diferenciación de las poblaciones de células hematopoyéticas enriquecidas en $CD34^+CD38^+Lin^-$ y de la población enriquecida en células $CD34^+CD38^-Lin^-$ provenientes de pacientes pediátricos con LMA, y sanos en respuesta a dos diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas?

¿Existen diferencias en cuanto al potencial de proliferación, expansión y diferenciación de las muestras provenientes de pacientes pediátricos si se comparan con pacientes adultos?

VII.- HIPOTESIS

Hipótesis general

El potencial proliferativo, de expansión y proliferación de células troncales y progenitoras hematopoyéticas provenientes de Leucemia Mieloide Aguda y Médula Ósea Normal pediátricas es diferente aunque sean sometidas a las mismas condiciones *in vitro*,

Hipótesis específicas

La capacidad de proliferación de células troncales CD34⁺CD38⁻Lin⁻ y progenitoras CD34⁺CD38⁺Lin⁻ hematopoyéticas provenientes de pacientes pediátricos con LMA, en respuesta a dos diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas tendrá diferencias significativas.

El potencial de expansión y diferenciación de células troncales y progenitoras, después de haber sido cultivadas bajo diferentes estímulos con citocinas hematopoyéticas será significativamente distinto.

Existirán diferencias significativas en cuanto al potencial de proliferación, expansión y diferenciación de las muestras provenientes de pacientes pediátricos si se comparan con pacientes adultos.

VIII.- OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el potencial proliferativo, de expansión y diferenciación de dos poblaciones celulares enriquecidas en células troncales y progenitoras hematopoyéticas provenientes de Leucemia Mieloide Aguda y Médula Ósea Normal pediátricas en dos condiciones de cultivo.

Objetivos específicos

- 1 Evaluar la capacidad de proliferación de la población enriquecida en células $CD34^+CD38^+Lin^-$ y en células $CD34^+CD38^-Lin^-$ hematopoyéticas provenientes de pacientes pediátricos con LMA, y MON en respuesta a dos diferentes combinaciones de citocinas hematopoyéticas.
- 2 Cuantificar el potencial de expansión y diferenciación de células $CD34^+CD38^+Lin^-$ y $CD34^+CD38^-Lin^-$, de pacientes pediátricos con LMA y MON después de haber sido cultivadas bajo diferentes estímulos con citocinas hematopoyéticas.
- 3 Comparar los resultados obtenidos con los datos provenientes de pacientes adultos.

IX.- MATERIAL Y METODOS

1) Diseño de la investigación

Este Estudio se ha clasificado como un *ensayo experimental*, ya que analiza las relaciones entre una o varias variables independientes, y una o varias variables dependientes, y los efectos causales de las primeras sobre las segundas, es decir los efectos de las diferentes condiciones de cultivos sobre la proliferación y expansión de las células hematopoyéticas. Este estudio se identifica como explicativo.

Según Festinger, (Festinger, 1957) los experimentos en laboratorio logran un control más riguroso que los experimentos de campo, aunque los experimentos podrían perder validez externa. A este respecto Kerlinger (Kerlinger, 1988) comenta que los objetivos primarios de un experimento verdadero son descubrir relaciones (efectos) en condiciones “puras” y no contaminadas, probar predicciones de teorías y refinar teorías e hipótesis.

2) Diseño de la muestra

Definición de la población de estudio:

Población diana: Médula ósea de niños entre 1 y 18 años de edad recién diagnosticados con leucemia mieloide aguda. Las muestras de los pacientes con LMA no deberán de haber recibido ningún tipo de tratamiento específico contra la leucemia y no presentarán otro padecimiento (hematológico o no hematológico) en el momento de la toma de muestra.

Médula ósea de niños sanos de entre 1 y 18 años de edad que sean sometidos a procedimientos ortopédicos y que sean hematológicamente sanos.

Población accesible: Se utilizaron muestras de Médula Ósea de pacientes con LMA y muestras de Médula Ósea Normal, mismas que fueron utilizadas en la obtención de ambas subpoblaciones (enriquecidas en células $CD34^+CD38^+Lin^-$ y $CD34^+CD38^-Lin^-$) hematopoyéticas. Todas las muestras fueron obtenidas de pacientes que acudieron al Hospital Infantil de México Federico Gómez en el periodo que comprende del 1 de noviembre del 2006 a noviembre del 2007. Todas las muestras contenían un volumen mínimo de 4 mililitros y correspondían a niños entre 1 y 18 años de edad.

3) Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

Aspirados de médula ósea de niños de entre 1 y 18 años de edad, con nuevo diagnóstico de LMA

Aspirados de médula ósea de niños de entre 1 y 18 años de edad sometidos a cirugías ortopédicas y que fueran hematológicamente sanos.

Se entiende por hematológicamente sanos los valores comprendidos en el

ANEXO II

Criterios de exclusión:

Contaminación de la muestra del aspirado de médula ósea

Muestras de médula ósea con número celular insuficiente para los ensayos.

Variables

| Variables independientes | Tipo de variable | Definición operacional |
|---|-------------------------|--|
| Células mononucleares de LMA de población I | Cuantitativa continua | Número de células mononucleares obtenidas por selección negativa enriquecidas en CD34 ⁺ CD38 ⁺ Lin ⁻ |
| Células mononucleares de LMA de población II | Cuantitativa continua | Número de células mononucleares obtenidas por selección negativa que enriquecidas en CD34 ⁺ CD38 ⁺ Lin ⁻ |
| Células mononucleares de MON de población I | Cuantitativa continua | Número de células mononucleares obtenidas por selección negativa que enriquecidas en CD34 ⁺ CD38 ⁺ Lin ⁻ |
| Células mononucleares de MON de población II | Cuantitativa continua | Número de células mononucleares obtenidas por selección negativa enriquecidas en CD34 ⁺ CD38 ⁺ Lin ⁻ |
| Cultivo líquido control | Cualitativa nominal | Característica de la composición del medio de cultivo: Medio de cultivo sin suplemento de citocinas. |
| Cultivo líquido seminal | Cualitativa nominal | Característica de la composición del medio: Medio de cultivo mas 10 ng/ml de Factor de Células Seminales (SCF), 10 ng/ml de Interleucina 6 (IL-6), 10 ng/ml de Trombopoyetina (Tpo) y 10 ng/ml del Ligando de Tirosina Fetal 3 (Flt3 L). |
| Cultivo líquido mixto | Cualitativa nominal | Característica de la composición del medio Combinación mixta: Medio de cultivo Stem Span mas 10 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml de Tpo, 10 ng/ml de Flt3 L, 10 ng/ml de Interleucina 3 (IL-3), 10 ng/ml de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Monocitos (GM-CSF), 20 ng/ml de Factor Estimulante de colonias de Granulocitos (G-CSF) y 3 U/ml de Eritropoyetina (Epo) |
| Cultivo semi sólido | Cualitativa nominal | Característica de la composición del medio que consiste en: metil-celulosa al 0.9% suplementada con 30% de SFB, 1% de albúmina sérica bovina, 10 ⁻⁴ M de 2-mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina, 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-3, 10 ng /ml de GM-CSF y 3 U/ml de Epo |

| Variables dependientes | Tipo de variable | Definición operacional |
|-------------------------------|-------------------------|---|
| Proliferación | Cuantitativa continua | Capacidad de las células de incrementar el número celular en cultivo, no importando el linaje al que correspondan. El cálculo del incremento celular total, se obtiene multiplicando el número celular contado en determinado día y condición de cultivo por el número celular acumulado en los días previos de la misma condición de cultivo. |
| Expansión | Cuantitativa continua | Capacidad de una célula de incrementar el número de células en un cultivo, siempre y cuando sean iguales a la célula que les dio origen El cálculo de expansión se obtiene cada 5 días al tomando una alícuota de $1-5 \times 10^3$ células de los cambios de medio realizados a los diferentes días y condiciones de cultivo y el número de colonias detectadas se extrapolara al número celular total acumulado evaluado en los ensayos de proliferación celular |
| Diferenciación | Cuantitativa continua | Capacidad de adquirir características celulares de un linaje específico, se corrobora por morfología e inmunofenotipo. |

5) Procedimientos

Obtención de muestras

Las muestras de Médula Ósea de Leucemia Mieloide Aguda fueron obtenidas de pacientes vírgenes de tratamiento del Hospital Infantil de México Federico Gómez de la SSA. Las muestras de Médula Ósea Normal, se obtuvieron de niños sometidos a cirugías óseas (en los que la toma de muestra no represente ningún riesgo) en el mismo Hospital Infantil de México

Todas las muestras se colectaron previo consentimiento de los donadores y sus padres o tutores, de acuerdo con los lineamientos institucionales aprobados por las comisiones de ética, de dicha institución.

Separación de Células Hematopoyéticas

Con la finalidad de obtener una banda de células mononucleares (*Buffy Coat*), las muestras provenientes de MON y LMA fueron centrifugadas a 400g durante 7 minutos, para posteriormente obtener la población de células mononucleares (CMN) de baja densidad (<1.077g/ml), mediante gradiente de Ficoll (Pharmacia Biotech). Dichas células fueron resuspendidas en Solución Salina de Fosfatos (PBS) al 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) para evaluar el número total de células nucleadas y viables mediante conteo con hemocitometro, usando solución de Turk y azul tripano, respectivamente.

Las células mononucleares (CMN), fueron enriquecidas en células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ y en células CD34⁺CD38⁻Lin⁻ mediante columnas de selección negativa. La técnica consiste en incubar 100 x10⁶ CMN durante 15 minutos y a temperatura ambiente, con un cóctel de anticuerpos primarios de eliminación de linaje (dependiendo de la subpoblación a enriquecer), para enseguida incubar durante otros 15 minutos a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario conjugado con un coloide magnético.

Después de la incubación, las células se hicieron pasar a través de una columna inmunomagnética en la que las células marcadas con los anticuerpos de linaje quedaron adheridas a la columna, mientras que las células que no presentaban marcador de linaje, se recolectaron en un tubo en una elusión en PBS al 10% de SFB. Las poblaciones celulares enriquecidas en células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ o CD34⁺CD38⁻Lin⁻, fueron contadas mediante hemocitómetro usando azul de tripano y se sembraron en las condiciones de cultivo que se describen en la parte de cultivos líquidos.

La combinación de anticuerpos que se utilizó para enriquecer la subpoblación CD34⁺CD38⁺Lin⁻ incluyó: anti CD2, anti CD 3, anti CD14, anti CD16, anti CD19, anti CD29, anti CD56, anti CD66b y anti glicoforina A. Estos mismos anticuerpos mas anti CD36, anti CD38 y anti CD45RA fueron utilizados para enriquecer la subpoblación CD34⁺CD38⁻Lin⁻ (Chávez-González et al, 2004).

Cultivos Líquidos

Cien mil células de cada una de las poblaciones enriquecidas CD34⁺CD38⁺Lin⁻ o CD34⁺CD38⁻Lin⁻ fueron sembradas en medio de cultivo Stem Span mas diferentes combinaciones de citocinas. Las células fueron mantenidas a 37°C en un ambiente saturado de humedad al 5% de CO₂, y cada 5 días (mientras hubiera células en el cultivo) el número total celular fue contado con hemocitometro para resembrar nuevamente cien mil células, mismas que se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo.

Las combinaciones de citocinas empleadas en este trabajo fueron:

- Combinación control: Medio de cultivo Stem Span sin suplemento de citocinas.
- Combinación seminal: Medio de cultivo Stem Span mas 10 ng/ml de Factor de Células Seminales (SCF), 10 ng/ml de Interleucina 6 (IL-6), 10 ng/ml de Trombopoyetina (Tpo) y 10 ng/ml del Ligando de Tirosina Fetal 3 (Flt3 L).
- Combinación mixta: Medio de cultivo Stem Span mas 10 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml de Tpo, 10 ng/ml de Flt3 L, 10 ng/ml de Interleucina 3 (IL-3), 10 ng/ml de Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Monocitos (GM-CSF), 20 ng/ml de Factor Estimulante de colonias de Granulocitos (G-CSF) y 3 U/ml de Eritropoyetina (Epo).

Una vez finalizados los cultivos, se realizó el cálculo del incremento celular total, multiplicando el número celular contado en determinado día y condición de cultivo por el número celular acumulado en los días previos de la misma condición de cultivo.

Inmunocitoquímica

En el día cero, así como en los diferentes días y condiciones de cultivo, 35 x 10³ CMN, células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ o CD34⁺CD38⁻Lin⁻ fueron preparadas en laminillas, con la finalidad de determinar el porcentaje de células CD34⁺. Para ello, se utilizó un paquete comercial (DAKO En Vision+ System, Peroxidasa-Diaminobencidina) y un anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno CD34. El ensayo se reveló con Diamino-Benzidina, y el porcentaje de

células CD34⁺ (en cualquiera de las subpoblaciones), se determinó después de haber contado 300 células por laminilla.

Cultivos semisólidos

El número de células formadoras de colonias (CFC) presente en los diferentes días y condiciones de cultivo fue evaluado mediante cultivos semisólidos. Para ello, 50,000 CMN, 1000 células CD34⁺CD38⁺Lin⁻ o 1000 células CD34⁺CD38⁻Lin⁻, fueron sembradas en metil-celulosa, al 0.9%, suplementada con 30% de SFB, 1% de albúmina sérica bobina, 10⁻⁴M de 2-mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina, 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de GM-CSF y 3 U/ml de Epo. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un ambiente saturado de humedad al 5% de CO₂ durante 14 días, al final de los cuales las colonias (grupos celulares que tuvieran más de 50 células) fueron evaluadas y clasificadas en los siguientes linajes hematopoyéticos:

- Eritroide : Colonias hemoglobinizadas.
- Mieloide: Colonias que contenían células granulocíticas, macrofágicas o ambas.
- Mixto: Colonias que presentaron células tanto mieloides como eritroides.

El cálculo de expansión se evaluó cada 5 días al tomar una alícuota de 1-5 x10³ células de los cambios de medio realizados a los diferentes días y condiciones de cultivo y el número de colonias detectadas se extrapolara al número celular total acumulado evaluado en los ensayos de proliferación celular.

6) Análisis estadístico

Realizamos estadística descriptiva e inferencial. Se utilizó, la Prueba de Mann-Whitney dado que las poblaciones celulares no se distribuyeron de una manera semejante a la normal. Esta prueba no paramétrica es contraparte de la prueba t para dos muestras no pareadas, comparamos las medianas de los dos grupos y reveló si las medianas eran diferentes, utilizando los programas estadísticos STATA y SPSS. La diferencia significativa se consideró con una p<0.05.

7) Aspectos éticos y de bioseguridad

El presente protocolo de investigación está basado en el trabajo con aspirados de Médula Ósea pediátrica tanto normal como de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda. En el caso de la Médula Ósea Normal ésta se obtuvo al momento en que los pacientes fueron sometidos a algún tipo de cirugía ósea bajo previo acuerdo y consentimiento de los padres (o tutores), así como del pediatra especialista en ortopedia. Las muestras de Leucemia Mieloide Aguda fueron obtenidas cuando a los pacientes se les realizó la toma de aspirado de médula ósea necesaria para verificar el diagnóstico, por lo que en ninguno de los dos casos (MON y de LMA) la obtención de la muestra representó algún riesgo para la salud física y/o mental de los menores.

Cabe mencionar que en todos los casos se pidió el consentimiento informado de los padres, tutores o representantes legales de los menores.

En tres casos, los responsables de pacientes que serían sometidos a cirugías ortopédicas no aceptaron participar en el estudio, uno por cuestiones relacionadas a su religión y otros 2 por falta de acuerdo entre los responsables del menor (padre y madre)

El presente trabajo está basado en la obtención y manejo de muestras biológicas provenientes de médula ósea normal y leucémica, para lo cual en el laboratorio de hematopoyesis y células troncales se tienen estandarizados todos los protocolos para su transporte, obtención, procesamiento y desecho, así como las instalaciones necesarias para el manejo de dichas muestras. A continuación se realiza una breve descripción de cada procedimiento:

La toma de las muestras, fue realizada por la Oncólogo-Pediatra Elisa María Dorantes Acosta, quien fraccionó una alícuota del aspirado de médula ósea que ella misma tomó como parte de los procedimientos del diagnóstico de cada paciente. Para las muestras de MON, la Dra. Dorantes se presentó al servicio de ortopedia del Hospital Infantil de México y recibió del ortopedista la muestra que se haya tomado al momento de realizar la cirugía ósea.

Las muestras biológicas fueron transportadas al laboratorio de investigación en contenedores cerrados herméticamente y rotulados con la

leyenda de material biológicos a 4°C de temperatura (empleando congelantes), en un tiempo no mayor a 60 minutos.

Una vez en el laboratorio, la muestra fue colocada en una campana de flujo laminar clase II para su procesamiento y manipulación, lo cual consistió en la obtención y cultivo *in vitro* de las subpoblaciones hematopoyéticas CD34⁺CD38⁺Lin⁻ y CD34⁺CD38⁻Lin⁻ descrito previamente en materiales y métodos.

Antes de desechar el material utilizado (biológico, frascos de cultivo, material de plástico (tubos, pipetas, puntas y desechos líquidos), éste fue inactivado con cloro en el cual permaneció por al menos 24 horas, para posteriormente eliminarse y depositarse en los contenedores específicos para desechos biológicos infecciosos con naturaleza líquida y/o punzo cortante (dependiendo del tipo de desecho). El destino final de los desechos fue su destrucción mediante incineración, proceso que se realizó fuera del laboratorio, pero bajo las normas generales del Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI, las cuales se rigen por las Normas Oficiales Mexicanas y los Reglamentos oficiales vigentes e la materia previa aprobación de la Secretaria de Salud.

Cabe hacer notar que todas las personas involucradas en el manejo de las muestras biológicas contaron con la ropa de protección (bata, guantes, lentes protectores, caretas, uniformes, etc), adecuada, y para seguridad general del laboratorio, algunos de ellos tienen entrenamientos específicos en el manejo de residuos peligrosos y sustancias radiactivas.

8) Otros aspectos (factibilidad)

Este protocolo contó con un número de registros en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, HIM/2006/053 y fue aceptado por un Comité de investigación y bioética del Hospital Infantil de México Federico Gómez así mismo contó con financiamiento de la Organización Internacional Terry Fox.

X.- ANEXO I
Carta de consentimiento informado
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Por medio de la presente autorizo y estoy enterado de que a mi hijo (a) _____ con número de expediente _____ atendido (a) en éste hospital le será tomada una muestra de médula ósea, misma que se utilizará con fines de investigación en el protocolo HIM/2006/053, titulado Caracterización de Células Troncales y Progenitoras hematopoyéticas de Leucemia Mieloide Aguda pediátrica.

Estoy enterado que los objetivos de dicha investigación son aportar información sobre el comportamiento biológico *in vitro* de las células hematopoyéticas de Leucemia Mieloide Aguda, con el fin de que a mediano o largo plazo se puedan proponer alternativas terapéuticas que contribuyan a mejorar el diagnóstico y tratamiento de dicha enfermedad.

Así mismo estoy consiente que la toma de la muestra será tomada bajo anestesia general, como parte del estudio diagnóstico del paciente y en su caso como parte del procedimiento quirúrgico a realizarse, tomando en cuenta que el procedimiento de aspirado de médula ósea tiene una probabilidad mínima de complicaciones causadas por el propio aspirado de médula, sin embargo en caso de presentarse alguna complicación, el paciente será atendido en el Hospital Infantil de México para resolver su problema de salud consecuencia del Aspirado de Médula ósea.

Además en el caso yo lo desee me será proporcionada cualquier tipo de información o explicación en relación a este protocolo de estudio. Para ello tendré que acudir o comunicarme al departamento de Oncología de este Hospital al Tel. 52289929 ext 1238 o al Laboratorio de Hematopoyesis y Células Troncales del Hospital de Oncología en el Centro Médico Nacional Siglo XXI (TEL 56276900 Ext. 22705), y entrevistarme con los doctores (Héctor Mayani Viveros, María Antonieta Chávez González y/o Elisa María Dorantes Acosta), responsables de ésta investigación.

Finalmente hago manifiesto que la autorización la emito en pleno uso de mi libertad y sin coacción alguna, asegurándome que se mantendrá la confidencialidad de los datos del menor, así como que en el momento en el que yo decida podré retirar la autorización para proporcionar la muestra biológica antes mencionada.

Se firma la presente para los fines que haya lugar en México D. F a los __ días del mes de _____ de 200__ en dos tantos (uno para el responsable del paciente y otro para los responsables de la investigación), y en la presencia del responsable legal del menor, responsable de la investigación y dos testigos.

Nombre y firma del responsable legal del menor

Nombre y firma del responsable de la investigación Dra Elisa Dorantes Acosta Departamento de oncología Hospital Infantil de México Federico Gómez tel. 52289919 ext 1238

Nombre y firma Testigo 1

Nombre y firma Testigo 2

XI.- ANEXO II

Parámetros normales de biometría hemática para considerar a un paciente como control para los experimentos.

| Edad | Leucocitos X 10 ³ | Eritrocitos x 10 ⁶ | Hb g/100 ml | Hct % | VCM fl | MCH pg | MCHM g/100 ml | PLTS x 10 ³ |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------|-------|-----------|-----------|---------------------|---------------------------|
| 1-6 años | 5.0-19.0 | 3.9-5.3 | 9.5-14.1 | 30-40 | 70-84 | 23-29 | 31-35 | 150-450 |
| 6-16 años | 4.8-10.8 | 4.0-5.2 | 10.3-14.9 | 32-42 | 73-87 | 24-30 | 32-36 | |
| 16-18 años | 4.8-10.8 | 4.2-5.4 | 11.1-15.7 | 34-44 | 75-89 | 25-31 | 32-36 | |
| >18 años Varones | 5.0-10.0 | 4.5-5.5 | 14.0-17.4 | 42-52 | 84-103 | 27-34 | 32-36 | |
| >18 años mujeres | 5.0-10.0 | 4.0-5.0 | 12.0-16.0 | 36-48 | 84-103 | 28-34 | 32-36 | 140-400 |

Hb Hemoglobina, Hct hematocrito, VCM Volumen corpuscular medio MCH Hemoglobina corpuscular media MCHM concentrato de hemoglobina corpuscular media Plts plaquetas
(Johns Hopkins: The Harriet Lane Handbook, 18th ed. 2008 Mosby, An Imprint of Elsevier pág. 307)

Lista de abreviaturas

| | |
|-------------|--|
| CCG | Children's Cancer Group |
| CMN | Células mononucleares |
| CTH | Células Troncales Hematopoyéticas |
| EPO | Eritropoyetina |
| FAB | Sistema de clasificación Franco Americano Británico para las leucemias agudas |
| FBS | Suero Fetal Bovino |
| Flt-3L | Ligando de la Tirosina Fetal 3 |
| G-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos |
| GM-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos |
| Hb | Hemoglobina |
| Hct | hematocrito |
| IL-3 | Interleucina tres |
| IL-6 | Interleucina seis |
| LMA | Leucemia mieloide aguda |
| LMC | Leucemia mieloide crónica |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| LSCs | Células troncales leucémicas |
| LTC – IC | Células iniciadoras de cultivos a largo plazo |
| MCH | Hemoglobina corpuscular media |
| MCHM | Concentrato de hemoglobina corpuscular media |
| MH | Microambiente hematopoyético |
| MON | Médula ósea normal |
| NOPHO-AML93 | Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology Acute Myeloid Leukemia |
| PBS | Solución Salina de Fosfatos |
| Plts | plaquetas |
| SCF | Stem Cell Factor o Factor de Células Seminales |
| SCID | Inmunodeficiencia severa combinada |
| SRC | Células repobladoras de ratones SCID |
| TPO | Trombopoyetina |
| VCM | Volumen corpuscular medio |

XII.- RESULTADOS Y DISCUSION

Características generales de los pacientes del estudio

En un periodo de 1 año se recolectaron células de pacientes con leucemia mieloide aguda que fueron diagnosticados en el hospital Infantil de México Federico Gómez en el periodo de noviembre del 2006 a noviembre del 2007. Ingresaron al estudio 17 pacientes, previa firma de consentimiento informado del responsable del menor. Se obtuvieron alícuotas de aspirados de médula ósea al diagnóstico de 17 pacientes, 9 femeninos y 8 masculinos, las edades oscilaron en un rango de 1 año hasta los 14 años con una media de 7.6 años. El subtipo morfológico de la FAB mas frecuente en este estudio fue la M1, con 4 pacientes, posteriormente las M2, M3 y M4 con 3 pacientes en cada grupo, seguidos de 2 pacientes con LMA M6 y uno con LMA M5 y uno con LMA M7. No tuvimos ningún paciente con LMA M0. En 6 pacientes se realizó estudio citogenético.

En la literatura internacional (Rubnitz et al 2008, Deschler et al 2006) se describe que la incidencia de las leucemias mieloides agudas no tiene predominio por sexo, lo cual se corrobora en este estudio de casos consecutivos durante un año. Se describe también que los subtipos más frecuentes son M1 y M2, lo cual también se corrobora en este estudio; sin embargo en la literatura se menciona que la M3 se presenta solo en el 5% de los pacientes con LMA, pero que su incidencia parece incrementarse en la raza latina, probablemente es por ello que la LMA M3 correspondió junto con la M2 y M4 al segundo subtipo más frecuente en este estudio no obstante hay que considerar que la n de este trabajo fue pequeña.

En todos los casos se realizó la cuenta del porcentaje de blastos al diagnóstico en los aspirados de médulas óseas de los pacientes y el rango osciló desde 20% hasta 96% de blastos con una media de 57% de blastos al diagnóstico y se consideró que el porcentaje de blastos al diagnóstico fue suficiente, ya que aunque la FAB considera 30% de blastos al diagnóstico, la OMS considera el 20% de blastos para realizar diagnóstico de LMA. (Estey et al, 2006)

Las características generales de las biometrías hemáticas de los pacientes fueron: En cuanto a la hemoglobina, solo 2 pacientes tuvieron

valores mayores de 10g/dL al diagnóstico, los 15 restantes presentaron anemia al ser diagnosticados, con una media de hemoglobina de 7.14 g/dL. El rango del hematocrito fue de 9.7 hasta 40% con una media de 21.1%, la cuenta de los leucocitos fue heterogénea, desde la leucopenia hasta la hiperleucocitosis, con rango de 1300 hasta 615 000/4L con una media de 58,129/4L. Todos los pacientes del estudio se presentaron con trombocitopenia menor a 150,000/4L, con un rango desde 2000 plaquetas/4L hasta 144,000/4L con una media de 34,935/4L (**Tabla 1**)

Tabla 1.- Características generales de los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA)

| Lista de pacientes con LMA | Edad | Morfología y citogenética | Blastos en AMO | Biometría Al diagnóstico | | | | |
|----------------------------|--------------------|---------------------------|----------------|--------------------------|------|------------|---------|-----------|
| | | | | Hb | Ht | Leucocitos | Blastos | Plaquetas |
| Femenino2 | 10 ^a | M1 | 93% | 7.6 | 22.5 | 18,100 | 62% | 22,000 |
| Masculino3 | 2 ^a | M1 | 93% | 7.8 | 22.2 | 2,000 | - | 144,000 |
| Femenino4 | 7 ^a | M3 t(15:17) | 20% | 4.9 | 14 | 1,300 | - | 17,999 |
| Masculino5 | 14 ^a | M1 | 90% | 7.3 | 21.6 | 11,600 | - | 18,000 |
| Femenino6 | 11 ^a | M3 t(15:17) | 92% | 8.2 | 24.7 | 32,000 | 93% | 48,000 |
| Femenino7 | 1 ^a 10m | M1 | 88% | 9.7 | 27.4 | 77,100 | 84% | 5,000 |
| Femenino8 | 2 ^a 4m | M7 trisomía 21 | 20% | 3.2 | 9.7 | 5,200 | - | 19,000 |
| Masculino9 | 2 ^a | M6 | 96% | 11.1 | 31.7 | 120,500 | 69% | 66,000 |
| Masculino10 | 10 ^a | M5 | 20% | 13 | 40 | 615,000 | 100% | 10,900 |
| Masculino11 | 12 ^a | M2 | 69% | 5.7 | 16 | 40,000 | 22% | 25,000 |
| Masculino12 | 12 ^a | M4 | 20% | 5.4 | 16 | 2,100 | - | 22,000 |
| Masculino13 | 1 ^a | M4 inv 16 | 90% | 8.8 | 27.2 | 2,200 | - | 21,000 |
| Masculino14 | 11 ^a | M4 | 37% | 6.4 | 18.4 | 5,700 | - | 31,000 |
| Femenino15 | 3 ^a 3 m | M6 | 43% | 5 | 14.9 | 7,700 | - | 5,000 |
| Femenino16 | 2 ^a | M2 | 20% | 6.1 | 18.3 | 36,000 | 40% | 26,000 |
| Femenino17 | 12 ^a | M3 t(15:17) | 20% | 3.6 | 12 | 1,800 | - | 111,000 |
| Femenino18 | 9 ^a | M2 t(8:21) | 58% | 7.7 | 23 | 9,900 | 80% | 2,000 |

LMA Leucemia mieloide aguda, AMO Aspirado de médula ósea, Hb Hemoglobina, Ht hematocrito

Este estudio es consistente con lo descrito en estudios previos, donde la mayor parte de los pacientes con LMA se presenta al diagnóstico con citopenias. En este estudio, el 100% de los pacientes debutó con trombocitopenia, a diferencia de lo reportado internacionalmente que es el 75%.(Sperling et al, 1995) En nuestro estudio 2 pacientes presentaron cuentas de leucocitos mayores a 100 000 (12%), esto esta dentro de lo reportado previamente, donde se describe hasta un 20% de pacientes con más de 100 000 leucocitos al diagnóstico, lo cual ha demostrado conferir mal pronóstico (Bassem et al, 2006)

Enriquecimiento en células CD34⁺

Para corroborar que se trabajaría con poblaciones enriquecidas, se identificó la presencia del antígeno CD34 en laminillas antes de la selección negativa y después de ella. Se cuantificó el porcentaje de células CD34⁺ por inmunocitoquímica y pudimos observar que antes del enriquecimiento, la frecuencia del antígeno CD34 en médula ósea normal es de alrededor del 1%, lo cual ya se había observado en estudios previos (Chávez-González et al, 2004). Los porcentajes de células CD34⁺ en células leucémicas fueron muy heterogéneos, como puede observarse en la **Tabla 2**

Posterior a la selección negativa se registraron enriquecimientos significativamente estadísticos en células normales y leucémicas, sin embargo en las leucémicas se observó una gran variabilidad.

Tabla 2 .- Enriquecimiento en células positivas para CD34 en médulas óseas de pacientes pediátricos sanos y con LMA

| | MON n = 5 | | LMA n =17 | |
|--------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | CD34 ⁺ | CFC | CD34 ⁺ | CFC |
| MNC | 1.1 (0.5 – 2.1) | 0.34 (0.10 – 0.74) | 31.2* (0 – 73.8) | 0.001* (0 – 0.012) |
| Células Lin ⁻ | 47 (32 – 67) | 7.1 (3.8 – 11.6) | 58 (25 – 98) | 0.04* (0 – 1.1) |

Tabla 2. Los resultados se representan en medianas y rangos de la n correspondiente. Los números se expresan en porcentajes de células CD34⁺ y células formadoras de colonias antes (MNC) y después (Células Lin⁻) del procedimiento de selección negativa. *La p significativa se consideró menor a 0.05

Resultados de la Población I

Dado que el objetivo de este trabajo es analizar dos subpoblaciones celulares que se encuentran en diferentes niveles de la jerarquía hematopoyética, se presentarán los resultados como sigue: denominaremos Población I a las células enriquecidas para $CD34^+CD38^+Lin^-$ y Población II a las enriquecidas en células $CD34^+CD38^-Lin^-$ que se encuentran en diferentes niveles de la jerarquía hematopoyética

Características generales de la población I

Se obtuvieron suficientes células para enriquecer en progenitores hematopoyéticos en 9 pacientes pediátricos con LMA y en 3 pacientes hematológicamente sanos sometidos a procedimientos ortopédicos donde se expusiera la cresta iliaca anterosuperior. En todos los casos se cuantificaron las células por medio de un hemocitómetro antes y después de haber sido enriquecidas a través de columnas inmunomagnéticas de selección negativa.

Se obtuvo el porcentaje de recuperación de la población enriquecida y para corroborar si la población celular tenía características funcionales de progenitores hematopoyéticos, se realizaron ensayos funcionales en cajas de metil celulosa donde se cuantificaron las células formadoras de colonias, se calculó también el enriquecimiento que corresponde a la proporción de colonias de células que se formaron a partir de los progenitores hematopoyéticos. Solo en un caso (paciente 14) no se realizaron ensayos funcionales por razones técnicas.

Los resultados obtenidos en las muestras provenientes de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda son heterogéneos, obteniendo diferentes números de células mononucleares en rangos que oscilaron desde 11,950 a $120,000 \times 10^3$ células, con una media de $69,900 \times 10^3$ células; esto contrasta con los rangos obtenidos en las células provenientes de médula ósea de pacientes pediátricos sin enfermedades hematológicas, ya que aunque también fueron heterogéneos, la mediana fue mayor, sin embargo esto no fue estadísticamente significativo.

Posteriormente cuantificamos el número de células de la población enriquecida para progenitores hematopoyéticos tanto leucémicos como normales. El número de células enriquecidas en progenitores o número de células post columna fue estadísticamente diferente, con mediana de 946×10^3 en las células normales contra una mediana de $18,816 \times 10^3$ en la población de células leucémicas con una p de 0.05. En cuanto al porcentaje de recuperación, éste fue estadísticamente mayor en la población de células leucémicas ($p = 0.01$), con un amplio rango que osciló de 3.2 a 73.8%, sin embargo cuando estas células se expusieron a ensayos funcionales se obtuvieron significativamente menos células formadoras de colonias a partir de las células mononucleares (mediana de 186 en las células normales contra una mediana de 12 en las leucémicas; $p = 0.03$)

En cuanto a las células formadoras de colonias a partir de las células enriquecidas en progenitores, la población de células normales demostró poseer una mayor proporción de células formadoras de colonias. ($p = 0.01$)
(Tabla 3)

Tabla 3.- Características generales de la población I LMA y MON

| Muestra y subtipo de FAB | Células nucleadas (X10 ³) | Células nucleadas (X10 ³) | % RECUP | CFC /100000 | CFC /100 000 | Enriquecimiento |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|-------------|---------------------|-----------------|
| | Precolumna | Postcolumna | | Precolumna | Postcolumna | |
| 2 M1 | 37,900 | 22,400 | 58.9 | 0 | 0 | 0 |
| 3 M1 | 25,700 | 2,914 | 8.8 | 24 | 0 | 0 |
| 5 M1 | 69,900 | 18,816 | 26.9 | 0 | 40 | 0 |
| 7 M2 | 118,000 | 87,120 | 73.8 | 22 | 60 | 2.7 |
| 8 M7 | 11,950 | 455 | 3.8 | 20 | 1120 | 56 |
| 9 M6 | 80,000 | 28,800 | 36 | 18 | 600 | 33.3 |
| 10 M5 | 120,000 | 3,876 | 3.2 | 2 | 60 | 30 |
| 12 M1 | 120,000 | 57,456 | 47.8 | 6 | 0 | 0 |
| 14 M4 | 45,315 | 10,032 | 22.1 | ND | ND | ND |
| Mediana | 69,900 | 18,816 | 26.9 | 12.0 | 50.0 | 1.3 |
| Rango | (11,950 - 120,000) | (455 - 87,120) | (3.2 - 73.8) | (0 - 24) | (0 - 1,120) | (0 - 56) |
| Médula ósea Normal | | | | | | |
| 2 | 98,000 | 2,114 | 2.16 | 742 | 5,560 | 7.49 |
| 3 | 100,000 | 468 | 0.46 | 186 | 10,360 | 55.6 |
| 4 | 100,000 | 946 | 0.946 | 106 | 5,460 | 51.5 |
| Mediana | 100,000 | 946 | 0.946 | 186 | 5,560 | 51.5 |
| Rango | (1,154.7 - 100,000) | (846.7 - 1,176) | (0.875 - 1.18) | (186 - 346) | (2,800.5 - 7,126.6) | (26.6 - 51.5) |
| Diferencias estadísticas entre MON y LMA | | | | | | |
| | $p = 0.4037$ | $p = 0.0522$ | $p = 0.0126$ | $p = 0.032$ | $p = 0.0118$ | $p = 0.1096$ |

CMN células mononucleares, % RECUP porcentaje de recuperación, CFC células formadoras de colonias. Los datos se presentan como medianas y rangos y el análisis se realizó con la prueba U de Mann Whitney para poblaciones independientes

Los porcentajes de recuperación en las células normales que se encontraron en este estudio son consistentes con lo que se describe en adultos

(Mayani et al, 2003), ya que se reporta que las células progenitoras hematopoyéticas corresponden alrededor del 0.1% del total de células en médula ósea, sin embargo éste número se encontró muy incrementado en las muestras provenientes de pacientes con LMA. Una explicación a este fenómeno es que la LMA se considera una patología con incremento o hiper celularidad de blastos en médula ósea, con funciones aberrantes, lo cual se demostró al realizar los ensayos funcionales.

Proliferación y expansión de la Población I

Se analizaron 10 muestras provenientes de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda y 3 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. Se calcularon los promedios de proliferación y se graficaron los incrementos en veces de acuerdo a los días de cultivo. Realizamos ensayos de proliferación y expansión de la población I, tanto de células provenientes de pacientes con LMA como de pacientes hematológicamente sanos. Las células se sometieron a tres condiciones de cultivo diferentes: sin citocinas hematopoyéticas, un coctel de 4 u 8 citocinas hematopoyéticas (descrito en metodología).

El incremento celular total, (proliferación) se obtuvo multiplicando el número de células en cada condición de cultivo por el número celular acumulado en los días previos de la misma condición de cultivo. Los cálculos se realizaron cada 5 días hasta que los cultivos dejaran de tener células viables.

Las células provenientes de médula ósea normal, tuvieron potenciales de proliferación mayores a los de las células leucémicas aunque éstas hayan sido expuestas a las mismas condiciones de cultivo. A pesar del mayor número de células provenientes de pacientes con LMA, se demostró que *in vitro* éstas células no son funcionales, ya que tienen limitada la proporción de células formadoras de colonias. Esta observación ya había sido hecha por este mismo grupo de trabajo en células provenientes de pacientes adultos con LMA (Montesinos et al, 2006), lo cual sugiere que la población de células leucémicas enriquecidas en progenitores tiene una incrementada proporción de células con defectos o alteraciones que al ser sometidas *in vitro* a diversas combinaciones

de citocinas hematopoyéticas no les permite proliferar ni expandirse al igual que lo harían *in vivo*.

El máximo potencial de proliferación se alcanzó al día 10 por las células normales cuando fueron sometidas a un cóctel de 8 citocinas hematopoyéticas (mixto) con una media de 323.46 veces. Las células leucémicas tuvieron potenciales de proliferación deficientes, alcanzando su máximo potencial al día 5 de cultivo cuando se expusieron al coctel mixto, con una media de 27.72 veces **Figura 2**

Figura 2 Cinética de proliferación de la población I en células de médula ósea de pacientes pediátricos con LMA y hematológicamente sanos.

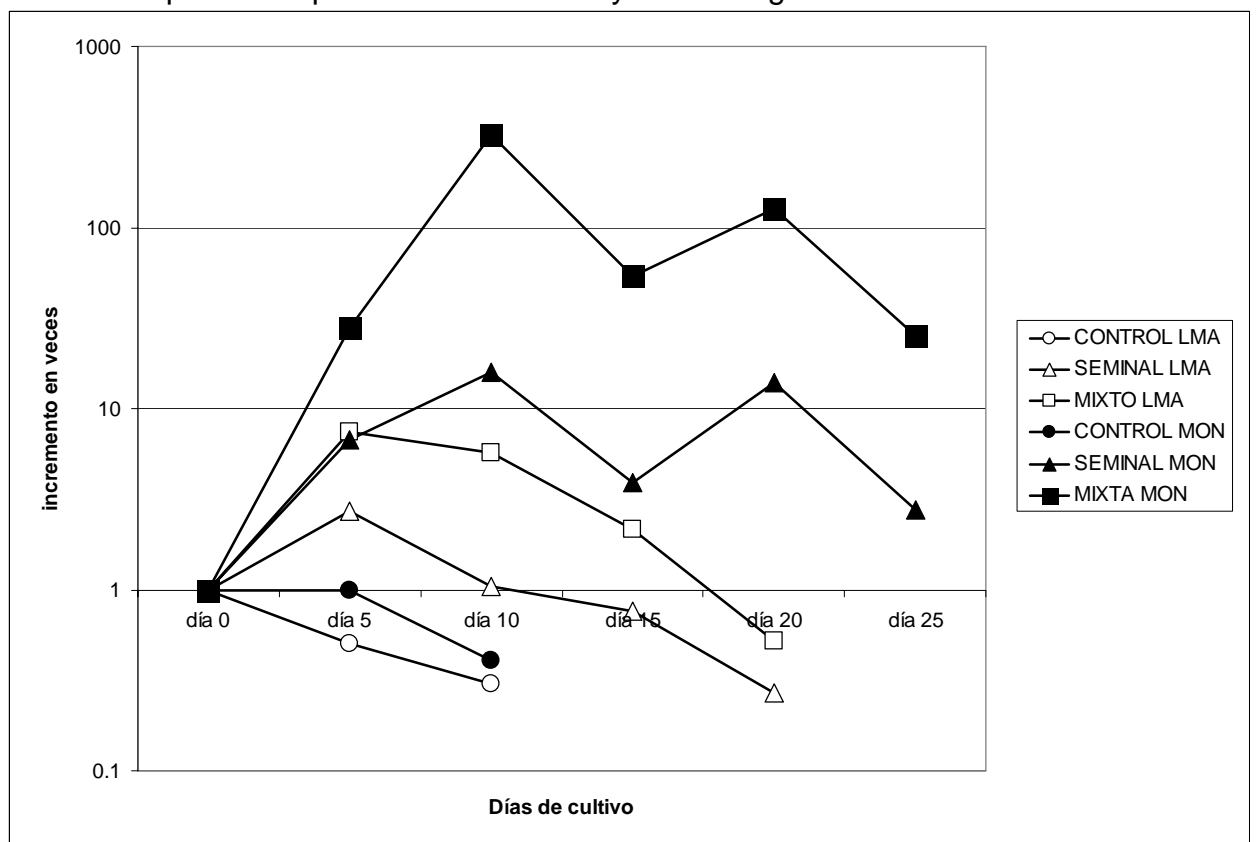


Fig 2. Para este experimento se utilizaron 10 muestras de pacientes con LMA y 3 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. En el eje de las X se grafica el tiempo como días de cultivo, y en el eje de las Y el incremento en veces del número celular total.

El cálculo de expansión celular se obtuvo cada 5 días al tomar una alícuota de $1-5 \times 10^3$ células de los cambios de medio realizados a los diferentes días y

condiciones de cultivo y el número de colonias detectadas se extrapoló al número celular total acumulado evaluado en los ensayos de proliferación celular (**Figura 3**)

Pudieron ser evaluables 9 muestras provenientes de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda y 3 pacientes hematológicamente sanos.

Figura 3 Expansión de la población l proveniente de médula ósea de pacientes pediátricos con LMA y hematológicamente sanos

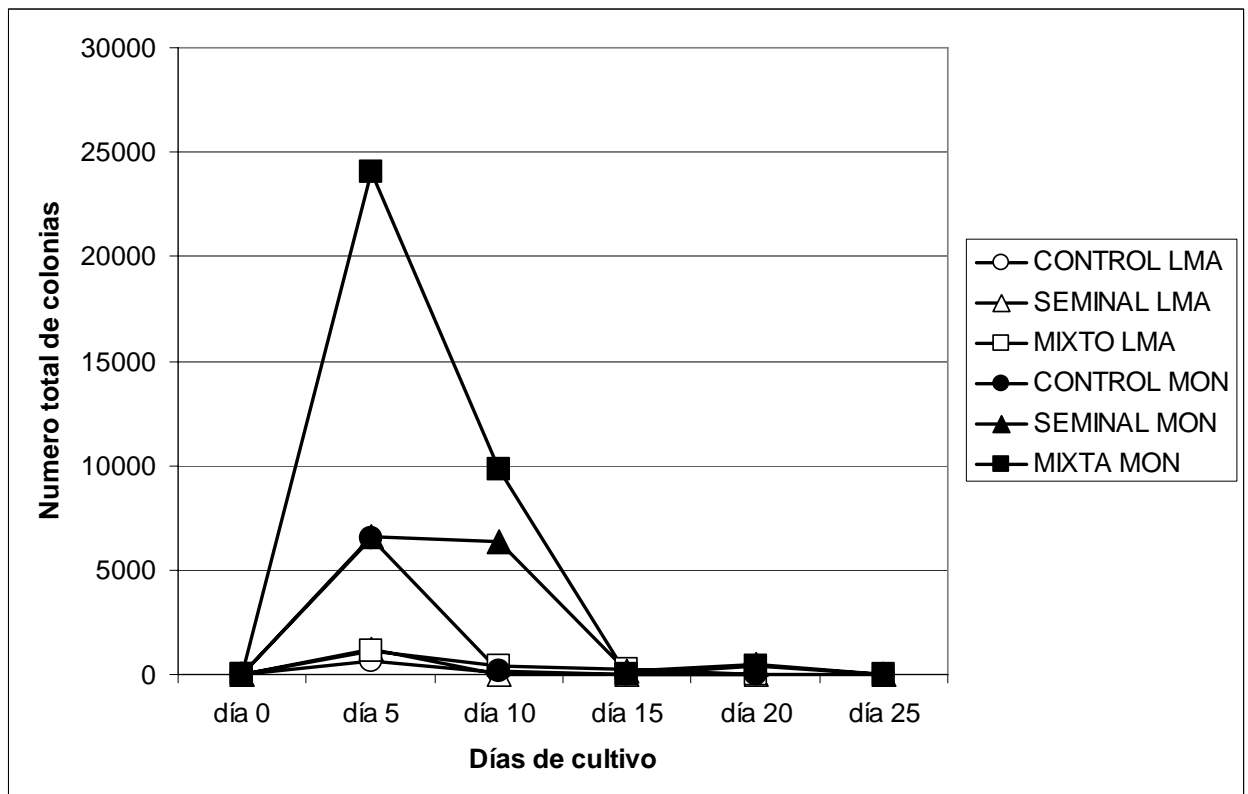


Fig 3. Para este experimento se utilizaron 9 muestras de pacientes con LMA y 3 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. En el eje de las X se grafica el tiempo como días de cultivo, y en el eje de las Y el número total de colonias que se en ese día y condición de cultivo particular.

El mayor potencial de expansión se registró en las células provenientes de médula ósea normal cuando fueron cultivadas en presencia de 8 citocinas hematopoyéticas. Este potencial fue seguido por las células de médula ósea normal expuestas a 4 citocinas hematopoyéticas. En todos los casos las células

provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda tuvieron una muy deficiente expansión.

Posteriormente evaluó la capacidad de las colonias de adquirir características de un linaje específico (mieloides, eritroides o mixtas) en los diferentes medios de cultivo.

En el medio con 4 citocinas hematopoyéticas (seminal) se obtuvieron los siguientes resultados: Las células provenientes de médula ósea normal tuvieron un mayor potencial de proliferación que las células provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda, en cuanto al número de colonias para médula ósea normal, se detectó un mayor número de colonias de tipo eritroide y mieloide al día 5, sin embargo aún se detectaron colonias hasta el día 20 de cultivo. Las colonias de morfología mixta se detectaron en médula ósea normal hasta el día 10 de cultivos en este medio.

En cuanto a la médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia detectaron en todos los casos números menores de producción de colonias al compararlos con las células provenientes de médula ósea normal, y en este medio, la producción de colonias provenientes de médulas leucémicas fue mayor a expensas de colonias eritroides. **Tabla 4 y Figura 4**

Tabla 4 Medias de los números totales de colonias hematopoyéticas por días y por condición de cultivo seminal

| Tipo de colonias | Día 0 | Día 0 | Día 5 | Día 5 | Día 10 | Día 10 | Día 15 | Día 15 | Día 20 | Día 20 |
|------------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Mieloides | 200 | 2553.3 | 557.4 | 7234.7 | 0 | 4406.1 | 4 | 190.2 | 0 | 462.2 |
| Eritroides | 88.8 | 4573.3 | 671.9 | 13058 | 16.5 | 1916.2 | 17.8 | 6 | 0 | 0 |
| Mixtas | 0 | 0 | 0.5 | 22.8 | 0 | 132.6 | 0 | 0 | 0 | 0 |

LMA = leucemia mieloide aguda, MON = médula ósea normal

Figura 4.- Tipos de colonias hematopoyéticas expresadas en porcentajes, provenientes de células de la Población I de pacientes con LMA y hematológicamente sanos cultivadas en medio con 4 citocinas hematopoyéticas de acuerdo al día de cultivo.

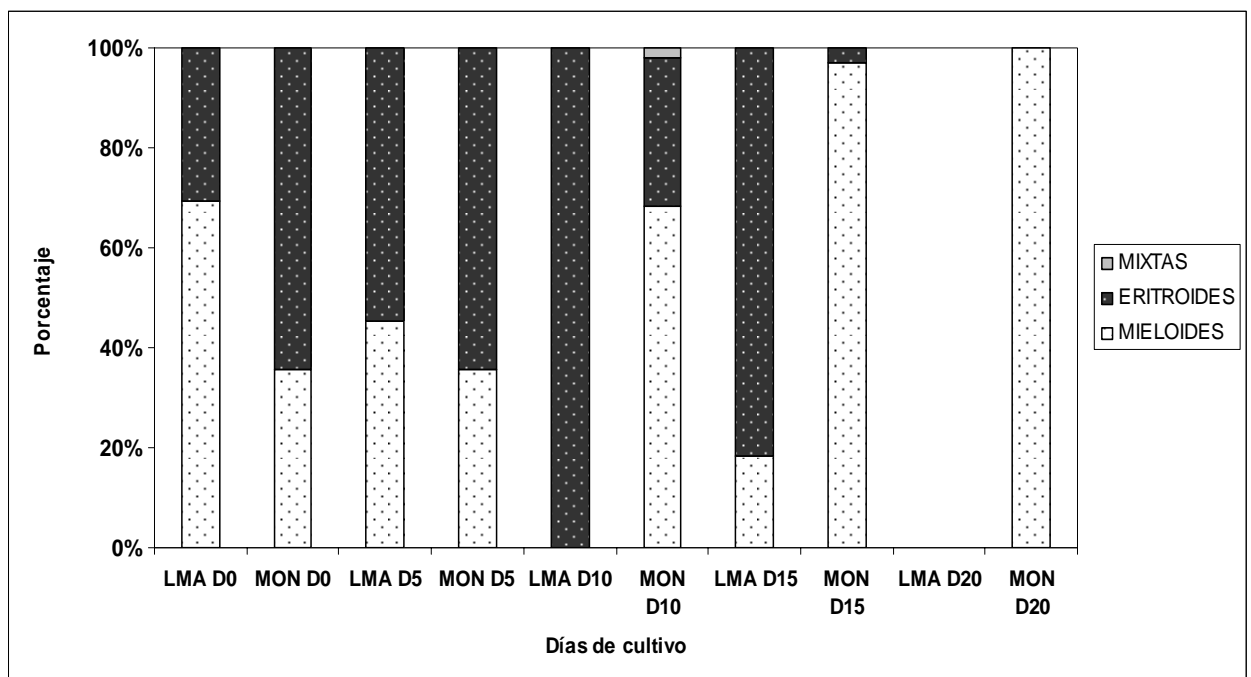


Fig 4. Para este experimento se utilizaron 10 muestras de pacientes con LMA y 3 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. En el eje de las X se grafica el tiempo como días de cultivo, y en el eje de las Y el porcentaje de colonias que se obtuvieron en ese día y en medio seminal.

En el medio con 8 citocinas hematopoyéticas (mixto) se obtuvieron los siguientes resultados: Las células provenientes de médula ósea normal tuvieron un mayor potencial de proliferación que las células provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda, en cuanto al número de colonias para médula ósea normal, se detectó un mayor número de colonias de tipo mieloide al día 10, y eritroide al día 5 y se detectaron colonias eritroides hasta el día 20 de cultivo.

En cuanto a la médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia se detectaron en todos los casos, al igual que en el medio de cultivo anterior, números menores de producción de colonias al compararlos con las células provenientes de médula ósea normal, y en este medio, la producción de

| Tipo de colonias | LMA | | LMA | | LMA | | LMA | | LMA | |
|------------------|-------|-----------|-------|-----------|--------|------------|--------|------------|--------|------------|
| | Día 0 | MON Día 0 | Día 5 | MON Día 5 | Día 10 | MON Día 10 | Día 15 | MON Día 15 | Día 20 | MON Día 20 |
| Mieloides | 200 | 2553.3 | 612.7 | 6129.6 | 52.14 | 7008 | 67.2 | 0 | 0 | 0 |
| Eriroides | 88.8 | 4573.3 | 403.9 | 17977.3 | 298.6 | 2784 | 30 | 0 | 0 | 420.6 |
| Mixtas | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

colonias provenientes de médulas leucémicas fue mayor a expensas de colonias mieloides. **Tabla 5 y Figura 5**

Tabla 5 Medias de los números totales de colonias hematopoyéticas por días y por condición de cultivo mixto

LMA = leucemia mieloide aguda, MON = médula ósea normal

Figura 5.- Tipos de colonias hematopoyéticas expresadas en porcentajes, provenientes de células de la Población I de pacientes con LMA y hematológicamente sanos cultivadas en medio con 8 citocinas hematopoyéticas de acuerdo al día de cultivo.

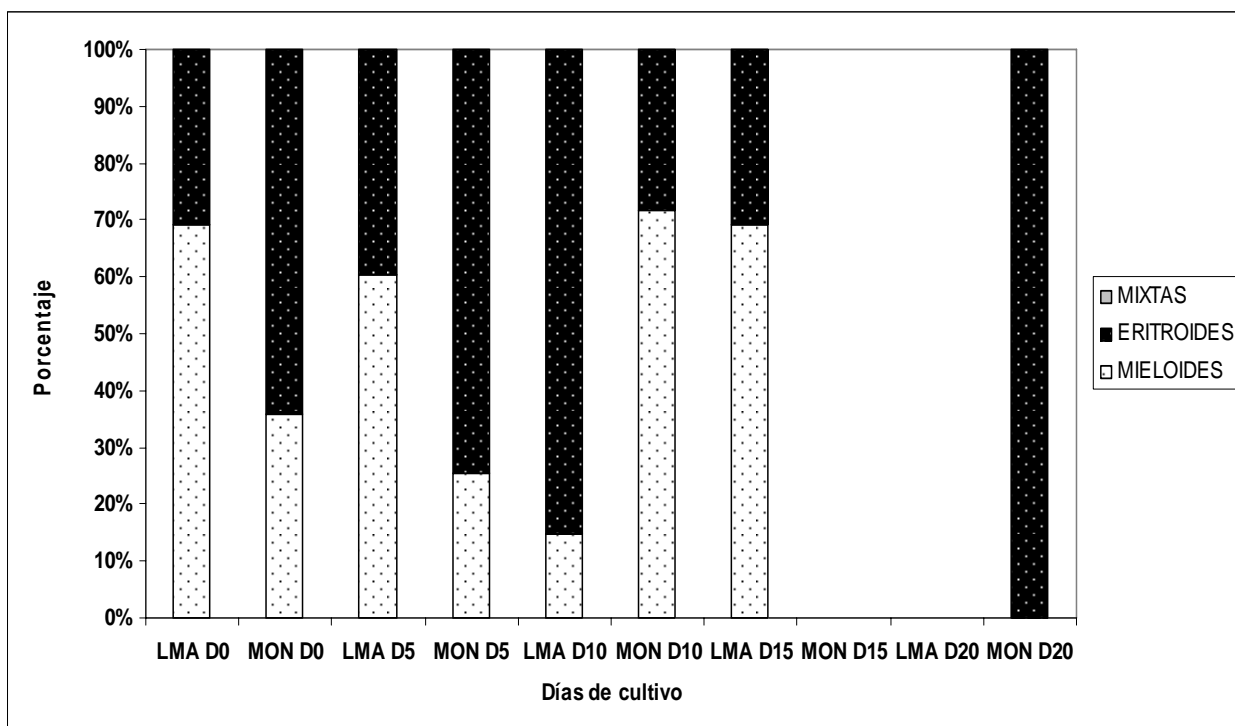


Fig 5. Para este experimento se utilizaron 10 muestras de pacientes con LMA y 3 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. En el eje de las X se grafica el tiempo como días de cultivo, y en el eje de las Y el porcentaje de colonias que se obtuvieron en ese día y en medio mixto.

Los resultados de las células tanto normales como leucémicas que fueron cultivadas en medio control, es decir sin citocinas, no demostraron tener potencial de proliferación en ninguno de los casos, esto a diferencia de las células provenientes de pacientes adultos con leucemia mieloide crónica, ya que este último padecimiento, las células troncales y progenitoras tienen

potencial autócrino para sostener la viabilidad celular en cultivos sin citocinas. (Chávez-González, et al 2004) En nuestros cultivos no observamos este fenómeno lo cual es consistente con estudios similares (Montesinos et al, 2006)

En cuanto a los tipos de colonias obtenidas tanto de las células normales como leucémicas, observamos diferencias en la cantidad y en el tipo de colonias. Aunque en este estudio no se realizaron estudios moleculares para encontrar la explicación a estas diferencias, se sabe que entre los principales genes involucrados en la diferenciación al linaje mieloide se encuentran: PU.1, Hox , C/EBPa, C/EBPb y C/EPBe, RUNX1 y SCL , y los altos niveles de expresión de PU.1 se asocian con la diferenciación granulocítica, mientras que su baja expresión se asocia con diferenciación hacia el linaje eritroide. PU.1, junto con los factores de transcripción GATA 1, GATA 2 y FOG, son esenciales para la maduración y diferenciación eritroide y megacariocítica. (Loken, et al 1987)

Una vez que los factores de transcripción se encienden o apagan son capaces de inducir la expresión de receptores de factores de crecimiento involucrados con la diferenciación eritroide, megacariocítica y granulomonocítica, por lo que las condiciones de cultivo podrían modificar la expresión y la cantidad de la expresión de genes necesarios para la diferenciación.

Diferenciación población I

La diferenciación celular se documentó cada 5 días por medio de microscopía de luz, en frotis preparados con tinción de Wright-Giemsa. Nuestras observaciones indican que las células obtenidas de los cultivos leucémicos al día 0 mostraron morfología de células inmaduras (blastos), y las células provenientes de médula ósea normal, mostraron presencia de todas las líneas celulares, sin embargo, a medida que aumentaba el tiempo de los cultivos pudimos observar en la médula normal la maduración de linaje eritroide, promielocítico y macrofágico. De diferente manera, en las muestras provenientes de pacientes con leucemia se observó predominio macrofágico **(Figura 6)**

Figura 6. Diferenciación de la población I en células provenientes de pacientes pediátricos con LMA y sanos

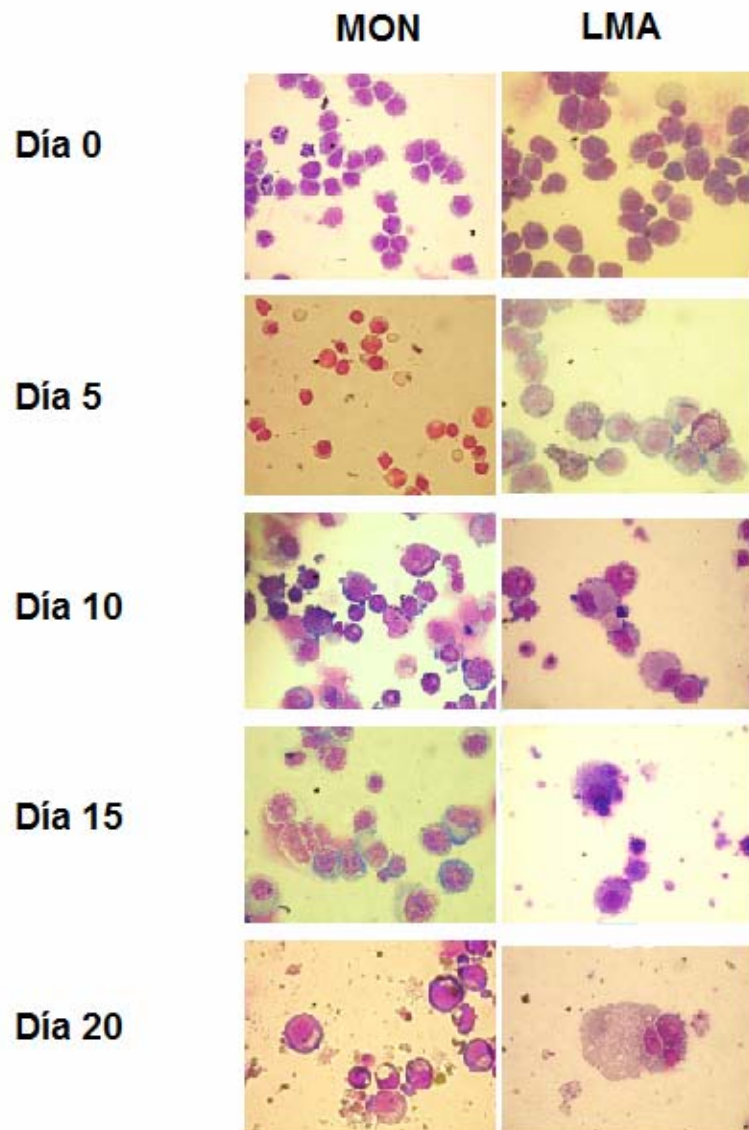


Fig 6 Fotos tomadas de laminillas teñidas con tinción de Wright-Giemsa a la población I proveniente de cultivo en medio mixto. La morfología de la MON muestra varios linajes en la maduración, mientras que en las médulas de pacientes pediátricos con LMA se observa predominio de macrófagos.

Resultados de la Población II

Se obtuvieron suficientes células para enriquecer en células troncales hematopoyéticas en 10 pacientes pediátricos con LMA y en 5 pacientes hematológicamente sanos sometidos a procedimientos ortopédicos bajo las mismas normas que los experimentos anteriores, en todos los casos se cuantificaron las células por medio de un hemocitómetro antes y después de haber sido enriquecidas a través de columnas inmunomagnéticas de selección negativa.

Se obtuvo el porcentaje de recuperación de la población enriquecida y se realizaron ensayos funcionales en cajas de metil celulosa donde se cuantificaron las células formadoras de colonias, se calculó también el enriquecimiento. Los resultados obtenidos en las muestras provenientes de pacientes pediátricos con leucemia mieloide aguda son heterogéneos, obteniendo diferentes números de células mononucleares en rangos que oscilaron desde 28 000 a 480 000 x 10³ células, con una mediana de 137 500 x 10³ células, los rangos obtenidos en las células provenientes de médula ósea de pacientes pediátricos sin enfermedades hematológicas, ya que aunque también fueron heterogéneos, la mediana fue de 100 000 x 10³, sin embargo el rango fue más estrecho.

Posteriormente cuantificamos el número de células de la población enriquecida para células troncales hematopoyéticas tanto leucémicas como normales. El número de células enriquecidas en troncales o número de células post columna aunque no fue estadísticamente diferente, fue ligeramente mayor para las células leucémicas, sin embargo osciló entre 0 y 127.5 y en las normales osciló entre 0.021 y 2.77. En cuanto al porcentaje de recuperación, éste fue estadísticamente mayor en la población de células leucémicas ($p = 0.04$), con un amplio rango que osciló de 0.24 a 2.31%, y en las células normales fue de 0.02 a 0.05% con una media de 0.05%

Los reportes que existen previamente en la literatura, (Mayani et al, 2003) describen que las células troncales hematopoyéticas representan alrededor del 0.005% del total de las células de la médula ósea, es decir su proporción es menor comparada con la de los progenitores hematopoyéticos, y a pesar de tener porcentajes mayores de recuperación de células troncales leucémicas, cuando estas células se expusieron a ensayos funcionales se obtuvieron

significativamente menos células formadoras de colonias, mediana de 186 en las células normales contra una mediana de 6 en las leucémicas ($p= 0.0021$) incluso hubieron muestras de células leucémicas que tuvieron desarrollo de cero colonias.

En cuanto a las células formadoras de colonias a partir de la población II, las células normales demostraron poseer un mayor capacidad de formación de colonias, y aunque esto no fue estadísticamente significativo, ninguna de las células provenientes de médula ósea normal, y en las provenientes de pacientes con leucemia existieron muestras con nula formación de colonias (**Tabla 6**)

Tabla 6.- Características generales de la población II en médula ósea de pacientes pediátricos sanos y con LMA

| Número de muestra y subtipo FAB | Células nucleadas (X10 ³) Precolumna | Células nucleadas (X10 ³) Postcolumna | % RECUP | CFC / 100 000 Precolumna | CFC / 100 000 Postcolumna | Enriquecimiento |
|---|---|--|----------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------|
| 2 M1 | 66,992 | 72 | 0.107 | 0 | 0 | 0 |
| 5 M1 | 69,925 | 17 | 0.024 | 0 | 0 | 0 |
| 6 M3 | 28,000 | 10 | 0.035 | 16 | 2,040 | 127.5 |
| 7 M2 | 240,000 | 5,560 | 2.31 | 22 | 0 | 0 |
| 9 M6 | 120,000 | 2,632 | 2.19 | 18 | 1,060 | 58.8 |
| 10 M5 | 360,000 | 1,890 | 0.52 | 2 | 20 | 10 |
| 11 M4 | 155,000 | 104 | 0.06 | 0 | 120 | 0 |
| 12 M1 | 480,000 | 327 | 0.068 | 6 | 0 | 0 |
| 16 M3 | 182,985 | 144 | 0.078 | 6 | 20 | 3.3 |
| 17 M3 | 40,410 | 255 | 0.6 | 14 | 40 | 2.85 |
| Mediana | 137,500 | 199.5 | 0.09 | 6.0 | 20.0 | 1.4 |
| Rango | (28,000 - 480,000) | (10 - 5560) | (0.024 - 2.31) | (0-22) | (0 - 2040) | (0 - 127.5) |
| Médula ósea Normal | | | | | | |
| 2 | 100,000 | 56 | 0.056 | 3710 | 300 | 0.08 |
| 3 | 240,000 | 30 | 7E-10 | 186 | 1,140 | 6.12 |
| 4 | 100,000 | 56 | 0.056 | 106 | 400 | 3.77 |
| 5 | 76,630 | 48 | 0.06 | 356 | 20 | 0.056 |
| 6 | 66,410 | 32 | 0.048 | 182 | 40 | 0.219 |
| Mediana | 100,000 | 48.0 | 0.05 | 186.0 | 300.0 | 0.21 |
| Rango | (70,525.3 - 116,608) | (12.6 - 48.0) | (0.02 - 0.05) | (186.0 - 1,569) | (300 - 455.5) | (0.21 - 2.77) |
| Diferencias estadísticas entre MON y LMA | | | | | | |
| | $p = 0.6676$ | $P = 0.0660$ | $p = 0.0429$ | $p = 0.0021$ | $p = 0.1534$ | $p = 0.6179$ |

CMN células mononucleares, % RECUP porcentaje de recuperación, CFC células formadoras de colonias. Los datos se presentan como medianas y rangos y el análisis se realizó con la prueba U de Mann Whitney para poblaciones independientes

Proliferación y expansión de la Población II

Se realizaron ensayos de proliferación y expansión de las poblaciones celulares enriquecidas en células troncales, en las células provenientes de pacientes con LMA, y ensayos en medio con 8 citocinas hematopoyéticas en

muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos, no se sometieron células sanas a otras condiciones de cultivo dado el número de células troncales que se obtienen de cada muestra. Los cálculos de proliferación se realizaron cada 5 días hasta que los cultivos dejaran de tener células viables.

Se analizaron 8 muestras provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda y 4 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos, se calcularon los promedios de proliferación y se graficaron los incrementos en veces de acuerdo a los días de cultivo. Las células provenientes de médula ósea normal, tuvieron potenciales de proliferación mayores a los de las células leucémicas. La población II de MON, alcanzó desde el día 5 de cultivo su máximo potencial de proliferación, disminuyó al día 10 y permaneció hasta el día 25 de cultivo.

Las células leucémicas tuvieron potenciales de proliferación que fueron similares a los de las células sanas al día 10 de cultivo en el medio de 8 citocinas hematopoyéticas y disminuyeron gradualmente y fueron prácticamente nulos al día 20 de cultivo. Cuando las células leucémicas se expusieron a medio seminal o medio control, mostraron potenciales de proliferación menores a los de la médula ósea normal. **(Figura 7)**

Figura 7.- Proliferación Células Troncales Hematopoyéticas (CTH) de médula ósea de pacientes pediátricos con LMA y hematológicamente sanos.

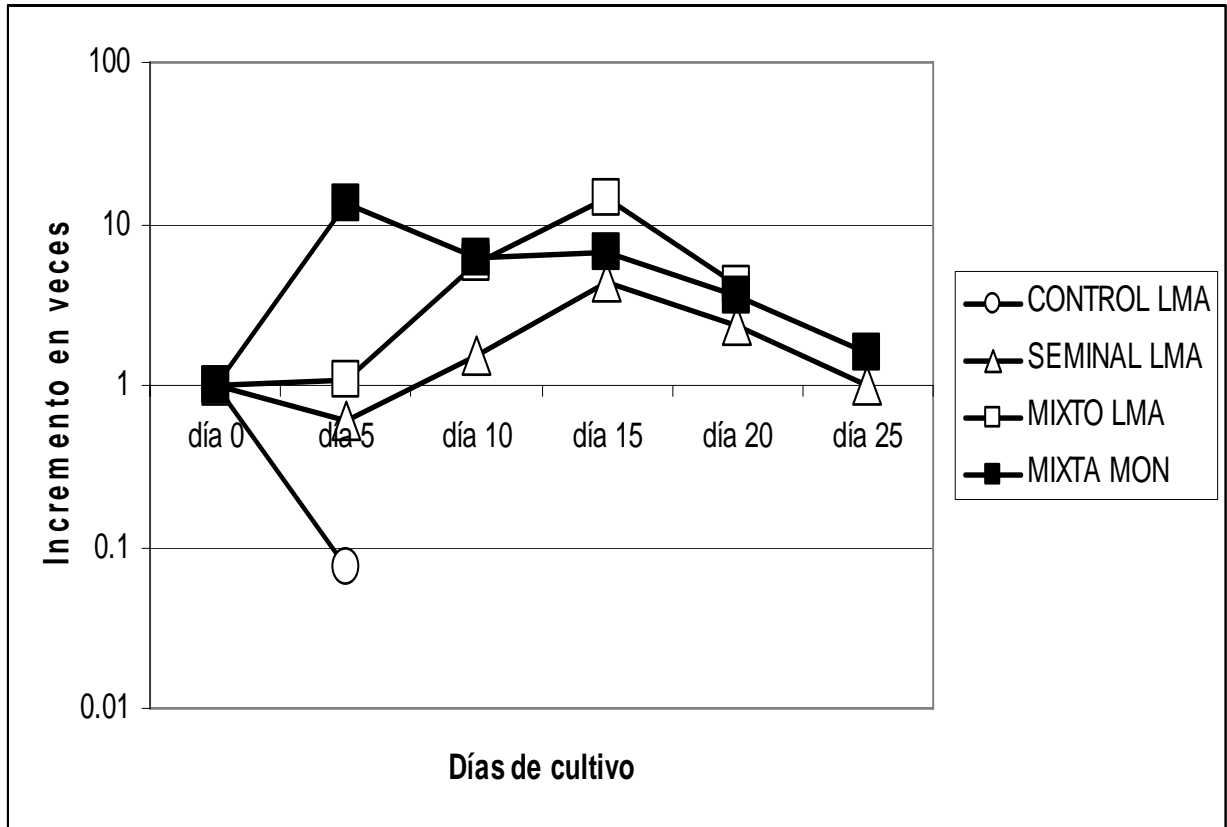


Fig 7. Para este experimento se utilizaron 8 muestras de pacientes con LMA y 4 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. En el eje de las X se grafica el tiempo como días de cultivo, y en el eje de las Y el incremento en veces del número celular total.

Posteriormente evaluó la capacidad de expansión de las colonias en los diferentes medios de cultivo, y al igual que en el experimento anterior, las células troncales normales solo se sometieron a una condición experimental por su escaso número. Las células provenientes de médula ósea normal tuvieron un mayor potencial de proliferación que las células provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda, en cuanto al número de colonias para médula ósea normal, se detectó un mayor número de colonias de tipo mieloide al día 15 con una media de 3207 colonias, en cuanto a las colonias de tipo eritroide su pico de proliferación se registró al día 10 con una media de 4121 colonias y las colonias de tipo mixto presentaron en pico máximo al día 10 de cultivo con una media de 43 colonias.

En cuanto a la médula ósea de pacientes pediátricos con leucemia detectaron en todos los casos números menores de producción de colonias al compararlos con las células provenientes de médula ósea normal, sin embargo en el medio mixto se detectó el mayor pico de proliferación de colonias al día 10 a expensas de colonias de tipo eritroide (media de 5914 colonias). **Tabla 7, Figuras 8 y 9**

Tabla 7 Medias de los números totales de colonias hematopoyéticas por días y por condición de cultivo mixto

| Tipo de colonias | Día 0 | | Día 5 | | Día 10 | | Día 15 | | Día 20 | | Día 25 | |
|------------------|-------|-----|-------|--------|--------|--------|--------|------|--------|-----|--------|-----|
| | LMA | MON | LMA | MON | LMA | MON | LMA | MON | LMA | MON | LMA | MON |
| Mieloide | 30 | 188 | 173.5 | 1920 | 499.6 | 1736.1 | 1086.1 | 3207 | 207 | | | 0 |
| Eriroide | 160 | 192 | 326.7 | 1831.8 | 5914.9 | 4121.7 | 3896.6 | 2494 | 0 | | | 0 |
| Mixtas | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.6 | 43.2 | 17 | 0 | 0 | | | 0 |

LMA = leucemia mieloide aguda, MON = médula ósea normal

Figura 8 Expansión de la población II de médula ósea de pacientes pediátricos con LMA y hematológicamente sanos

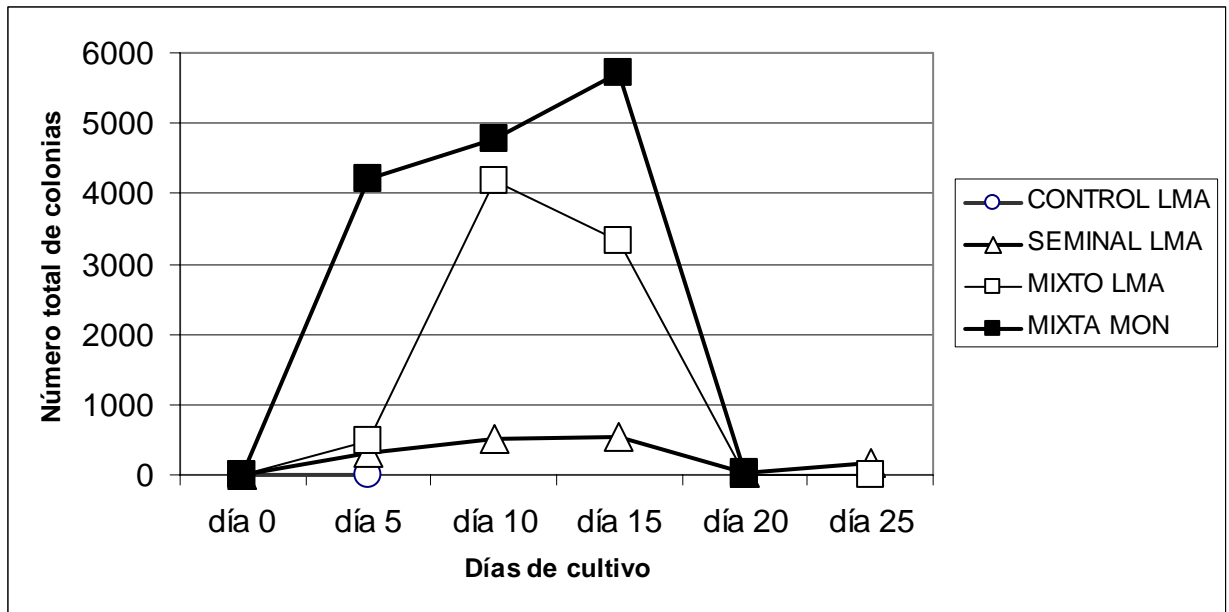


Fig 8. Para este experimento se utilizaron 7 muestras de pacientes con LMA y 4 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. En el eje de las X se grafica el tiempo como días de cultivo, y en el eje de las Y el número total de colonias.

Figura 9.- Tipos de colonias hematopoyéticas provenientes de la población II de pacientes con LMA y hematológicamente sanos cultivadas en medio con 8 citocinas hematopoyéticas de acuerdo al día de cultivo. Los resultados se expresan en porcentajes.

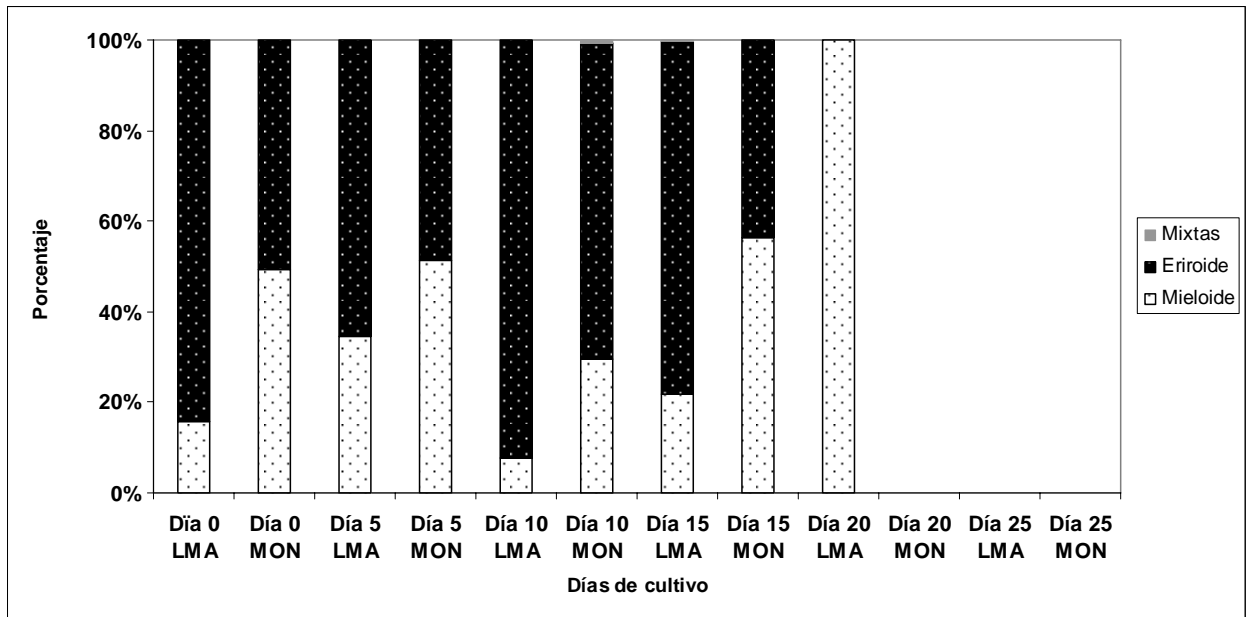


Fig 9. Para este experimento se utilizaron 6 muestras de pacientes con LMA y 4 muestras provenientes de pacientes hematológicamente sanos. En el eje de las X se grafica el tiempo como días de cultivo, y en el eje de las Y el porcentaje de colonias que se obtuvieron en ese día y en medio mixto.

Los resultados anteriores son contrastantes con los obtenidos en la población I, lo cual orienta a que existen diferencias sustanciales entre las dos subpoblaciones hematopoyéticas, y que al menos en este trabajo, las células troncales sanas y leucémicas tienen más similitud al inicio de la jerarquía hematopoyética, y que las diferencias se acentúan conforme avanza la hematopoyesis. A favor de esta teoría se encuentra un experimento de Krivstov et al., que demuestra que la leucemogénesis puede iniciarse en los progenitores hematopoyéticos, y que no es exclusiva de las células troncales.

Otra situación a considerarse es que las células fueron tomadas de la médula ósea, separadas de su nicho hematopoyético y sometidas a diversas condiciones experimentales, lo cual sugiere fuertemente que el nicho juega un papel determinante en la leucemogénesis *in vivo* (Short et al, 2003). Otra situación es que como se comentó previamente, las células son capaces de ser inducidas por citocinas estimuladoras de la mielopoyesis, lo cual puede inducir

a ciertos patrones de expresión génica que determinen la diferenciación o no y la expansión o no de las células, probablemente esta inducción génica funcione diferente de acuerdo a los distintos niveles de la jerarquía hematopoyética.

Además, se sabe que la expresión de receptores para citocinas hematopoyéticas puede cambiar de acuerdo a la subpoblación celular de la cual se trate (Engelhardt et al 2002. Mayani et al, 1993) y ello podría contribuir al diferente comportamiento entre las subpoblaciones hematopoyéticas.

XIII.- CONCLUSIONES GENERALES

Nuestros resultados demuestran que las fracciones celulares denominadas como Población II y de manera más acentuada la Población I, poseen deficientes potenciales de proliferación y expansión *in vitro* comparados con sus contrapartes normales. Además, los resultados son consistentes con los obtenidos previamente con pacientes adultos. (Montesinos et al 2006, Chavez-González et al 2004)

Conclusiones generales de la Población I

La primera observación correspondió a la gran heterogeneidad en la obtención de las células CD34⁺ en las poblaciones leucémicas con rango que varió de 0 – 56 veces más para esta población. Estos hallazgos son concordantes con estudios previos realizados en adultos con leucemia mieloide aguda, pero son contrastantes con los reportados en células provenientes de pacientes adultos con leucemia mieloide crónica, donde la proporción de células CD34⁺ es más homogénea (Chávez-González et al 2004) con rangos de CMN 1-3%.

Otra observación derivada de la población I de células leucémicas consiste en que a pesar del porcentaje de células positivas para el antígeno CD34, la población I leucémica demostró tener muy pocas células capaces de dar lugar a células formadoras de colonias *in vitro*. Esto sugiere una expresión aberrante del antígeno CD34 en los niños con LMA.

Otra observación que llama la atención es que las células de la población I demostraron tener deficientes potenciales de proliferación en cultivos *in vitro*, comparadas con su contraparte normal, aun cuando fueron cultivadas con un coctel de 8 citocinas hematopoyéticas. Esta deficiencia podría deberse al reducido porcentaje de progenitores funcionales o alteraciones en factores de transcripción, o a deficiencias cuantitativas y cualitativas de los receptores hematopoyéticos en estas subpoblaciones.

De manera similar con las células provenientes de pacientes adultos, encontramos en nuestros experimentos que esta población leucémica tuvo una deficiente expansión, a pesar de ser sometida a diversas combinaciones de citocinas hematopoyéticas. Estas observaciones abren la puerta a una nueva

serie de cuestionamientos sobre la biología de las células progenitoras leucémicas *in vitro*, y la relación que éstas podrían tener con el estroma hematopoyético, ya que probablemente la biología y la interacción de las células leucémicas con el estroma difiera de manera significativa con los mecanismos de interacción de las células normales hematopoyéticas.

Consideramos que hacen falta realizar más estudios para resolver estas interrogantes. Así mismo, consideramos importante identificar marcadores celulares que puedan identificar a la hematopoyesis normal residual en las muestras provenientes de pacientes enfermos, ya que está demostrado que una fracción de hematopoyesis normal coexiste con la hematopoyesis leucémica (Coulombel et al, 1985) y sería muy útil identificar a la fracción hematopoyética normal residual y a mediano o largo plazo poder purificarla para beneficio del paciente.

Conclusiones generales de la Población II

Al igual que en la población I, en la Población II se observó una gran heterogeneidad en la obtención de las células CD34⁺ en esta población leucémica con un rango que varió de 0 -127.5 veces más para esta población. A pesar de que el número de células enriquecidas para la población II fue mayor al de las provenientes de médulas óseas normales, éstas poblaciones celulares son funcionalmente deficientes, conteniendo una fracción muy pequeña de células funcionales que sostienen la hematopoyesis *in vitro*.

En esta población, las células leucémicas también demostraron tener deficientes potenciales de proliferación en cultivos *in vitro*, aun cuando fueron cultivadas con un coctel de 8 citocinas hematopoyéticas. No fuimos capaces de hacer todos los ensayos planeados con esta población, dado el número celular tan escaso que se obtiene por selección negativa. Al respecto consideramos que debemos incluir series más grandes de pacientes.

Otra situación interesante podría ser realizar correlaciones con las alteraciones citogenéticas o subtipo de la FAB, y a pesar de que en este estudio no mostraron estar asociados, esto probablemente se deba al número de pacientes incluidos.

Llama la atención que a pesar de que en las leucemias se producen blastos o células inmaduras, en las condiciones de cultivo *in Vitro*, una proporción de las células leucémicas cultivadas fue capaz de diferenciarse y adquirir características morfológicas de un linaje en específico.

En resumen, en el presente estudio hemos demostrado que al comparar a las poblaciones I y II con su contraparte normal, las células provenientes de los pacientes enfermos tienen importantes alteraciones funcionales *in vitro*, incluyendo los potenciales de proliferación y expansión así como un patrón de diferenciación anormal.

El presente estudio es consistente con los previos realizados en adultos, bajo una metodología experimental similar, lo cual apoyaría el hecho de que las alteraciones moleculares de los adultos y los niños no son diferentes, sin embargo hacen falta realizar estudios comparativos entre la población pediátrica y de los adultos donde se exploren perfiles de expresión génica y alteraciones citogenéticas entre estos grupos de edad.

XIV.- LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

Este estudio tiene como limitación el número de pacientes analizados, y consideramos que hace falta realizar más estudios para resolver las interrogantes que aquí se plantean. Así mismo, abre una línea de investigación para posteriormente identificar marcadores celulares y moleculares que pudieran identificar a la hematopoyesis normal en la hematopoyesis residual en las muestras provenientes de pacientes enfermos, ya que está demostrado que una fracción de hematopoyesis normal coexiste con la hematopoyesis leucémica.

XV.- REFERENCIAS

Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK.. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* (2002)109: 39–45

Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell*. 1994;77:1117-1124.

Bassem I. Razzouk BI, Estey E. Pounds et. al. Impact of Age on Outcome of Pediatric Acute Myeloid Leukemia *A Report from 2 Institutions Cancer* 2006;106:2495–502

Bauman, M; Paul, C; M, Grace. Effects of interleukin-5 o acute myeloid leukemias. *Am J Haematol*. 1992. 39: 269-74.

Birkekamp, K; Esselink, M; Kruijer et al., Differential effects of interleukin-3 and interleukin-1 o the proliferation ad interleukin-6 protein secretion of acute myeloid leukemic cells; the involvement of ERK, p38 and STAT5. *Eur Cytokine Netw*. 1999. 10. 479-90

Blair, A; H. Sutherland. Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* lack surface expression of c-kit. *Exp Hematol*. 2000. 28:660-671.

Bowen D. Etiology of acute myeloid leukemia in the elderly. *Semin Hematol*. 2006. 43: 82-8.

Brady HJM, Hematopoyesis: an introduction. En *Pediatric Hematology Ed.Blackewl 3ª*. Edición 2006 pags.3-10

Chavez-Gonzalez, A; Rosas-Cabral, A; Vela-Ojeda, J. et al., Severe functional alterations in vitro in CD34+ cell subpopulations from patients with chronic myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2004. 28: 639-47.

Cheson, B; Benet, J; Kopecky, K. et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of response criteria, Treatment Outcomes, and reporting standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin Oncol*. 2003. 21: 4642-9.

Coulombel, L; Eaves, C; Dalousek. et al., Log-term marrow culture of cells from patients with acute myelogenous leukaemia. *J. Clin Invest*. 1985. 961-69.

Delwel, H; Schipper, P; Van Buitenen, C. et al. Inerleukin-1 stimulates proliferation of acute myeloid leukemia cells by induction of granulocyte-macrophage colony-

stimulating factor release. *Blood*. 1989. 74: 586-593.

Deschler B., Lübbert M. Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer* 2006;107:2099–107

Drach J, Drach D, Glassl H, Gattringer C, Huber H. Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. *Cytometry* 1992;13:893–901

Duarte RF, Franf DA The synergy between stem cell factor (SCF) and granulocyte colony - stimulating factor (G-CSF): molecular basis and clinical relevance. *Leuk Lymphoma*. 2002 43(6):1179-87

Engelhardt, M; Lubbert, M; Y. Guo. CD34+ or CD34-: which is the more primitive?. 2002. *Leukemia*. 16: 1603-1608

Escribano, L; Ocqueteau, M; Almeida, J et al., Expression of the c-kit in normal and malignant hematopoiesis. 1998. 30:459-466.

Estey E, Döhner H Acute myeloid leukaemia *Lancet* 2006; 368: 1894–907

Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G. et al. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study) *BMC Cancer* 2007, 7:68

Felzmann T, Gisslinger H, Krieger O, et al Immunophenotypic characterization of myelomonocytic cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1993;84:428–435.

Festinger, L. (1957). *A theory of cognitive dissonance*. Stanford, CA: Stanford University Press.

Fey M. F. Normal and malignant hematopoiesis *Annals of Oncology* 18 (Supplement 1): i9–i13, 2007

Gabrilove JL, Jakubowski A, Scher H, et al: Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. *N Engl J Med* 318:1414-1422, 1988

Giles FJ, Keating A., Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, and Kantarjian HM Acute Myeloid Leukemia *Hematology* 2002 p 73-110

Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D. et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* (2001). 98: 2301–2317.

Healy L, May G, Gale K, et al., The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(26):12240-4

Heinrich PC, Behrman I, Haan S, et al Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation *Biochem. J.* (2003) 374, 1–20

Hoischen, S. H., Vollmer, P., Marz, P., et al Human herpes virus 8 interleukin-6 homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells. *Eur. J. Biochem.* (2000) 267, 3604–3612

Hope, C; Ji, L; J. Dick. Human Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Archives of Medical Research.* 2003. 34: 507-514.

Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 2002;16:1233–1258.

Hsu HC, Lee YM, Tsai WH, et al. Circulating levels of thrombopoietic and inflammatory cytokines in patients with acute myeloblastic leukemia and myelodysplastic syndrome. *Oncology.* 2002; 63: 64-69

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultAML/HealthProfessional>

Iwasaki H. Akashi K Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell *Immunity* 26, 2007 pp 726-40

Jordan, C; Upchurch, D; Szilvassy, S. et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia.* 2000. 14: 1777-1784.

Kaser, A., et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001. 98:2720–2725.

Kaushansky K The molecular mechanisms that control thrombopoiesis *J. Clin. Invest* 2005. 115:3339–3347

Kerlinger, F (1988) *Investigación del comportamiento.* México: McGraw Hill Interamericana.

Kimura, T; Sakabe, H; Minamiguchi, H. et al., Interleukin-11 enhances clonal proliferation of acute myelogenous leukaemia cells with strong expression of the IL-11 receptor alpha chain and signal transducing gp130. *Leukemia.* 1999. 13:1018-27

Krivtsov AV, TwomeyD, Feng Z, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* (2006).442: 818–822

Kubota N, Orita T, Hattori K. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Biochem* 1990;107:486

Langebrake, C; Brinkmann, I; Teigler-Schlegel, A. et al., . Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse I childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005. 63: 1-9.

Lapidot, T; Sirard, C; Vormoor, J. et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994. 367: 645-648.

Lapidot T, Petit I: Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30:973-981, 2002

Li J, Xia Y, Kuter DJ. Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics. *Br J Haematol.* 1999;106:345-356.

Lie SO, Abrahamsson J, Clausen N, et al Long-term results in children with AML: NOPHO-AML Study Group – report of three consecutive trials. *Leukemia* 2005; 7:2090-2100

Liew CW, Rand KD, Simpson RJ. Molecular analysis of the interaction between the hematopoietic master transcription factors GATA-1 and PU.1 *J Biol Chem.* 2006;281(38):28296-306.

Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood* 1987; 69:255–263.

Lukaszewicz M, Mroczko B, Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease *Pol Arch Med Wewn.* 2007 ;117(5-6):247-51

Margolin JF, Seuber CP & Poppack DG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Pizzo PA, Poppack DG; Principles and practice of Pediatric oncology 5th Edition Philadelphia, Lippincott/ Williams & Williams, 2006, p 538-590

Mayani, H; Dragowska, W; P. Lansdorp. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood.* 1993. 82: 2664-2672.

Mayani , H; Alvarado-Moreno, J.A.; Flores-Guzmán P. Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitors Cells Present in Circulation. *Archives of Medical Research.* 2003. 34: 476-488

Mayani et al. *Cancerología* 2 (2007): 95-107

Möhle R. Kanz L Hematopoietic Growth Factors for Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Expansion *Semin Hematol* 2007; 44:193-202

Montesinos, J; Flores, P; Flores, E. et al., In Vitro proliferation and expansion of human hematopoietic progenitor cells from normal subjects and patients with hematologic neoplasias. Exp. Haematol. 2000. 28: 95a.

Montesinos, J; H. Mayani. Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda. Gac. Med Mex. 2002. 138:67-76.

Montesinos J., Sánchez E., Flores E., et al., Deficient proliferation and expansion *in Vitro* of two bone marrow cell population from patients with acute myeloid leukemia in response to hematopoietic cytokines. Leukemia & Lymphoma. July 2006 47(7):1379-86.

Morrison S & Spradling AC., Stem Cells and Niches: Mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell 2008 132, 598–611

Motoji, T; Hoshio, S; Ueda, M. et al. Enhanced growth of clonogenic cells from acute myeloblastic leukaemia by erythropoietin. Br. J. Haematol. 1990. 75: 60-67.

Nicola, N. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. Annu Rev. Biochem. 1989. 58: 45-77.

Pirog KA, Stabinsky Y., Goldman R et al., Flt-3L, en Cytokine Index 2006 2ª. Edición . Ed PreproTech pag 58

Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature (2003). 423: 409–414.

Rossi DJ, Bryder D, Jun Seita J et al Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature 2007 447 725-28

Rubnitz JE, Gibson B., Smith FO, Acute Myeloid Leukemia Pediatr Clin N Am 55 (2008) 21–51

Scolnik, M; Morilla, R; Bracco. et al . CD34 and CD117 are over expressed in AML and may be valuable to detect minimal residual disease. Leuk Res. 2003. 27: 1069-1070.

Short, B; Brouard, N; Occhiodoro-Scott, T; Ramakrishnan, A; P. Simmons. Mesenchymal Stem Cells. Archives of Medical Research. 2003. 34: 565-571.

Socolovsky, Nam HS, Fleming MD, et al. Blood Ineffective erythropoiesis in Stat5a2/25b2/2 mice due to decreased survival of early erythroblasts. 2001;98:3261-3273

Sperling C, Buchner T; Creutzg U; et al., Clinical, morphologic, cytogenetic and prognostic implications of CD34 expression in childhood ad adult the novo AML. 1995. 17: 417-26.

Stone R., O'Donnell M., Seekeres M., Acute Myeloid Leukemia. Hematology 2004, 98-117

Sungaran, R., Markovic, B., and Chong, B.H. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1997. 89:101–107

Tavassoli, M, Expansion of blood stem cell pool or mobilization of its marrow counterpart?. *Exp Hematol.* 1993: 1205-1206.

Terstappen LW, Könemann S, Safford M, et al., Flow cytometric characterization of acute myeloid leukemia. Part 1. Significance of light scattering properties. *Leukemia.* 1991 (4):315-21.

Trentin L, Pizzolo G, Feruglio C, et al, Functional analysis of cytotoxic cells in patients with acute nonlymphoblastic leukemia in complete remission *Cancer.* 1989 64(3):667-72

Uckan, D; Hicsonmez G; Yetgin S. et al., CD34/CD117 co-expression in childhood acute leukaemia. *Leuk Res.* 2000. 24: 201-6.

Urabe A, Murphy MJ, Haghbin M , and Gee TS Erythroid progenitors (BFU-e and CFU-e) in acute leukaemia. *J Clin Pathol.* 1979 July; 32(7): 666–669.

van Etten RA Aberrant cytokine signaling in leukemia *Oncogene* (2007) 26, 6738–6749.

van Lochem EG. van der Velden, Wind HK, J.G. et al Immunophenotypic Differentiation Patterns of Normal Hematopoiesis in Human Bone Marrow: Reference Patterns for Age-Related Changes and Disease-Induced Shifts *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2004 60B:1–13

van Wering ER, van der Linden-Schrever BE, van der Velden VH, et al. T-lymphocytes in bone marrow samples of children with acute lymphoblastic leukemia during and after chemotherapy might hamper PCR-based minimal residual disease studies. *Leukemia* 2001;15:1301–1303

Webb, D; Harrison, G; Stevens, et al., MRC Childhood Leukemia Working Party. Relationships between age at diagnosis, clinical features, and outcome of therapy in children treated in the Medical Research Council AML 10 and 12 trials for acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001. 98: 1714-2001.

Wilson A & Trumpp A., Bone-marrow haematopoietic stem- cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006 6,93-106

Woodbine NA , Marchetti N Marchetti C et al DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing *Nature* 2007, 447; 686-91

Woods W. Curing childhood acute myeloid leukemia (AML) at the half-way point: promises to keep and mites to go before we sleep. *Pediatr Blood Cancer*. 2006. 46: 565-9.

Zhang, P., Iwasaki-Arai, J., Iwasaki, H et al , et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* (2004). 21, 853–863